

ЦИТОКИНЫ И **Воспаление**

Том 18. № 1-4. 2019

Cytokines and Inflammation. Vol. 18. № 1-4. 2019

ИММУНОТЕРАПИЯ

Интерфероны + Бестим + Иммуномодулин

КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Бронхиальная астма + Ревматоидный
артрит + Ишемическая болезнь сердца
Рассеянный склероз

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Тимус + Тучные клетки + Эндотелий

ОБЗОРЫ

Иммунный гомеостаз в возрастном аспекте
Атопический дерматит + Угревая болезнь
Шизофрения



ОБЗОРЫ • REVIEWS

Цитокины в патогенезе шизофрении -----	5
<i>Ветлугина Т.П., Лобачева О.А.</i> Cytokines in pathogenesis of schizophrenia <i>Vetlugina T.P., Lobacheva O.A.</i>	
Роль воспаления в патогенезе угревой болезни -----	10
<i>Демина О.М., Гуревич К.Г.</i> The role of inflammation in the pathogenesis of acne <i>Demina O.M., Gurevich K.G.</i>	
Роль цитокинов в патогенезе атопического дерматита -----	16
<i>Побежимова О.О., Жестков А.В., Козлова О.С.,</i> <i>Лямин А.В., Протасов А.Д., Кулагина В.В.</i> Role of cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis <i>Pobezhimova O.O., Zhestkov A.V., Kozlova O.S.,</i> <i>Lyamin A.V., Protasov A.D., Kulagina V.V.</i>	
Нарушения иммунного гомеостаза в возрастном аспекте -----	22
<i>Голубкина Е.В., Тризно М.Н.</i> Disorders of immune homeostasis in the age aspect <i>Golubkina E.V., Trizno M.N.</i>	

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ • ORIGINAL ARTICLES

Перспективная оценка маркеров сосудистой воспалительной реакции и параметров липидного профиля у больных ишемической болезнью сердца при наличии и отсутствии сахарного диабета 2-го типа, перенесших ангиопластику со стентированием коронарных артерий -----	28
<i>Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Гапон Л.И., Горбатенко Е.А.,</i> <i>Емеева И.В., Шароян Ю.А., Зуева Е.В.</i> Prospective assessment of vascular inflammatory reaction markers and parameters of lipid profile in patients with coronary heart disease in the presence and absence of type 2 diabetes mellitus who underwent angioplasty with coronary arteries stenting <i>Petelina T.I., Musikhina N.A., Gapon L.I., Gorbatenko E.A.,</i> <i>Emeneva I.V., Sharoyan Y.A., Zueva E.V.</i>	
Морфологические изменения полипозной ткани больных с хроническим полипозным риносинуситом на фоне локального применения интерферона α2b и сочетания интерферона α2b с γ-D-глутамил-L-триптофаном -----	37
<i>Безрукова Е.В., Хмельницкая Н.М., Воробейчиков Е.В., Симбирцев А.С.</i> Morphologic changes of nasal polyps tissue in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps after local application of recombinant interferon α2b and γ-D-glutamyl-L-tryptophan <i>Bezrukova E.V., Khmel'nitskaya N.M., Vorobeychikov E.V., Simbirtsev A.S.</i>	

Индукция синтеза интерлейкинов и активаторов хемотаксиса под действием OmpF порина из <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> на модели <i>in vivo</i> ----- Портнягина О.Ю., Кузьмич А.С., Хоменко В.А., Исаева М.П., Соловьева Т.Ф., Новикова О.Д. Induction of interleukin and hemotaxis activators synthesis under the action of OmpF porin from <i>Yersinia pseudotuberculosis in vivo</i> Portnyagina O.Iu., Kuz'mich A.S., Khomenko V.A., Isaeva M.P., Solov'eva T.F., Novikova O.D.	43
Субпопуляционный состав цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови и спинномозговой жидкости при рассеянном склерозе----- Кудрявцев И.В., Ильвес А.Г., Новоселова О.М., Рубаник К.С., Серебрякова М.К., Прахова Л.Н. Cytotoxic T cell subsets in peripheral blood and cerebrospinal fluid in patients with multiple sclerosis Kudryavtsev I.V., Ilves A.G., Novoselova O.M., Rubanik K.S., Serebriakova M.K., Prakhova L.N.	50
Холинергическая регуляция активности тучных клеток перитонеального экссудата ----- Кутукова Н.А., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Гусельникова В.В., Шамова О.В., Назаров П.Г. Cholinergic regulation of peritoneal exudate mast cells activity Kutukova N.A., Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K., Guselnikova V.V., Shamova O.V., Nazarov P.G.	58
Лептин и индекс апноэ/гипопноэ у больных бронхиальной астмой (Предварительное исследование)----- Минеев В.Н., Лалаева Т.М., Скворцова Р.Д., Куликов А.Н. Leptin and apnea/hypopnea index in patients with bronchial asthma (Preliminary study) Mineev V.N., Lalaeva T.M., Skvortsova R.D., Kulikov A.N.	66
Влияние семафорина 3А на адгезию тимоцитов к клеткам эпителия тимуса при опухолевом росте ----- Рутто К.В., Кудрявцев И.В., Людыно В.И., Киселева Е.П. The influence of semaphorin 3A on thymocyte adhesion to thymic epithelial cells during tumor growth Rutto K.V., Kudryavtsev I.V., Lioudyno V.I., Kisseleva E.P.	71
Бактериальная аргининдеиминаза нарушает структуру актинового цитоскелета эндотелиальных клеток----- Маммедова Дж.Т., Старикова Э.А., Бурова Л.А., Малашичева А.Б., Семёнова Д.С., Фрейдлин И.С. Bacterial arginine deiminase disrupts the endothelial cells actin cytoskeleton Mammedova J.T., Starikova E.A., Burova L.A., Malashicheva A.B., Semenova D.S., Freidlin I.S.	75
Получение и исследование физико-химических и биологических свойств интраназальных форм аналога интерферона гамма человека----- Иванова О.С., Левagina Г.М., Батенева А.В., Гамалей С.Г., Богрянцева М.П., Даниленко Е.Д. Production and study on the physico-chemical and biological properties of human interferon gamma analogue intranasal forms Ivanova O.S., Levagina G.M., Bateneva A.V., Gamaley S.G., Bogryantseva M.P., Danilenko E.D.	80

Цитокиновая сеть синовиальной жидкости и ее связь с активностью ревматоидного артрита -----	85
Мороз Л.А., Талако Т.М., Потاپнев М.П., Сорока Н.Ф.	
Cytokine network of synovial fluid and its relationship with rheumatoid arthritis activity	
Moroz L.A., Talako T.M., Potapnev M.P., Soroka N.F.	
Двухфазный характер действия гистамина на проницаемость монослоя эндотелиальных клеток линии EA.hy926 для белковых молекул <i>in vitro</i> -----	91
Мальцева О.Н., Назаров П.Г., Тянянский Д.А., Денисенко А.Д.	
The biphasic nature of the histamine action on the permeability of EA.hy926 endothelial cell monolayer for protein molecules <i>in vitro</i>	
Maltseva O.N., Nazarov P.G., Tanyansky D.A., Denisenko A.D.	
Применение рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ (Интерфераль) и γ -D-глутамил-L-триптофана (Бестим) для консервативного лечения хронического полипозного риносинусита -----	97
Безрукова Е.В., Конусова В.Г., Воробейчиков Е.В., Симбирцев А.С.	
Applying of recombinant interferon $\alpha 2b$ (Interferal), and γ -D-glutamyl-L-tryptophan in treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps	
Bezrukova E.V., Konusova V.G., Vorobeychikov E.V., Simbirtsev A.S.	
Иммуноориентированная терапия в комплексном лечении острого панкреатита -----	103
Абдурахманов М.М., Ураков Ш.Т., Сафаров С.С., Кулдашев Г.Н.	
The use of immunocorrectors in complex therapy of acute pancreatitis	
Abdurakhmanov M.M., Urakov Sh.T., Safarov S.S., Kuldashhev G.N.	
ЮБИЛЕЙ • JUBILEE	
Академик Корнева Елена Андреевна (к 90-летию со дня рождения) -----	108
Academician Helen Korneva (to the 90 th anniversary of her birth)	
Александр Анатольевич Смородинцев (к 90-летию со дня рождения) -----	109
Smorodintsev Aleksander Anatolievich (to the 90 th anniversary of his birth)	
НЕКРОЛОГ • OBITUARY	
Памяти Глеба Борисовича Федосеева (04.09.1930–11.05.2019) -----	110
In memory of Gleb Borisovich Fedoseev (4.09.1930–11.05.2019)	
Памяти Сергея Александровича Кетлинского (21.07.1940–12.06.2019)-----	111
In memory of Sergei Aleksandrovich Ketlinsky (21.07.1940–12.06.2019)	
Памяти Николая Сергеевича Сапронова (11.09.1937–30.06.2019) -----	112
In memory of Nikolai Sergeevich Sapronov (11.09.1937–30.06.2019)	
СОБЫТИЯ ГОДА • EVENTS OF THE YEAR	
Нобелевская премия по физиологии или медицине 2019 г. -----	113
2019 Nobel Prize in physiology or medicine	

ЗАО «БиоХимМак». Набор для количественного определения антител к NR2 субъединице NMDA рецептора глутамата в сыворотке крови человека методом ИФА ----- 3-я стр. обложки
CJSC "BioChemMack". ELISA kit for the quantitative determination of antibodies to the NR2 subunit of the NMDA glutamate receptor in human serum

УКАЗАТЕЛИ • INDICES

Систематизированный порядковый указатель статей, опубликованных в журнале «Цитокины и воспаление» в 2019 г. ----- 116
Articles published in «Cytokines and Inflammation» in 2019

Алфавитный именной указатель ----- 117
Authors' index

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS ----- 118

Редакционная коллегия:

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

П.Г. Назаров (Санкт-Петербург)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

С.А. Кетлинский (Санкт-Петербург)
В.А. Козлов (Новосибирск)

Е.В. Галкина (Норфолк, США)
И.И. Долгушин (Челябинск)
Ф.И. Ершов (Москва)
Н.М. Калинина (Санкт-Петербург)
А.В. Караулов (Москва)
Е.А. Корнева (Санкт-Петербург)
Е.Л. Насонов (Москва)
Р.В. Петров (Москва)
А.В. Полевщиков (Санкт-Петербург)

А.Н. Полторак (Петрозаводск; Бостон, США)
Н.С. Сапронов (Санкт-Петербург)
С.В. Сенников (Новосибирск)
А.С. Симбирцев (Санкт-Петербург)
И.С. Фрейдлин (Санкт-Петербург)
Р.М. Хаитов (Москва)
В.А. Черешнев (Екатеринбург)
В.С. Ширинский (Новосибирск)
В.И. Шишкин (Санкт-Петербург)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Н.М. Бережная (Киев, Украина), Л.Н. Бубнова (С.-Петербург), Т.П. Ветлугина (Томск), И.А. Горланов (С.-Петербург), А.М. Ищенко (С.-Петербург), В.К. Козлов (С.-Петербург), В.И. Коненков (Новосибирск), В.И. Мазуров (С.-Петербург), Е.В. Маркелова (Владивосток), С.В. Машко (Москва), Н.В. Медуницын (Москва), С.А. Недоспасов (Москва), В.Г. Нестеренко (Москва), И.В. Нестерова (Москва), Б.В. Пинегин (Москва), М.П. Потапнев (Минск, Беларусь), В.И. Пуринь (С.-Петербург), Т.Н. Саватеева (С.-Петербург), В.И. Селедцов (Новосибирск), Р.И. Сепиашвили (Москва), Н.Б. Серебряная (С.-Петербург), Т.П. Сесь (С.-Петербург), Л.П. Сизякина (Ростов-на-Дону), Ю.Г. Суховой (Тюмень), А.А. Тотолян (С.-Петербург), В.Х. Хавинсон (С.-Петербург), Е.Р. Черных (Новосибирск).

Зав. редакцией

О.Я. Михайлова

Перевод

О.В. Трусова

Оформление, компьютерная верстка

И.А. Варанкина

Обложка

М.С. Назарова

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

Издание Российского цитокинового общества и Северо-Западного отделения РАМН. Журнал зарегистрирован в Министерстве Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций. ПИ № 77–11439 от 21 декабря 2001 г. Рассылка целевая.

Журнал «Цитокины и воспаление» включен в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (по состоянию на 26.07.2017) (<http://vak.ed.gov.ru/>). Журнал включен в российский научный индекс цитирования на платформе Web of Science (RSCI on Web of Science) (http://wokinfo.com/products_tools/multidisciplinary/rsci/).

Журнал включен в Реферативный журнал и Базы данных ВИНТИ. Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной справочной системе по периодическим и продолжающимся изданиям «Ulrich's Periodicals Directory».

Подписка осуществляется:

– через Агентство «Роспечать» в отделениях связи, полугодовой индекс — 81 395.

Адрес редакции: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, тел. +7 (921) 909–55–49, тел./факс: +7 (812) 645–32–91.

E-mail: cytokines_inflammation@yahoo.com, cytokines@yandex.ru, peter_nazarov@mail.ru

Подписано в печать 05.08.2020. Бумага Lumisilk, chlorine free, StoraEnso, Oulu. Формат бумаги 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Отпечатано в типографии «L-PRINT». Тираж установочный.

Printed in Russia.

Цитокины в патогенезе шизофрении

Т.П. Ветлугина, О.А. Лобачева

ФГБУН «Научно-исследовательский институт психического здоровья»
«Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук», г. Томск

Обзор посвящен анализу исследований в области изучения цитокинов при шизофрении. Накопленные к настоящему времени данные убедительно доказывают важную роль нарушений нейроиммунного взаимодействия в патогенезе шизофрении. Нейроиммунная дисрегуляция может быть обусловлена как патологией отдельных структур мозга и ослаблением регулирующего влияния ЦНС на систему иммунитета, так и нарушением иммунокомпетентными клетками продукции цитокинов, участвующих в межклеточном взаимодействии и в передаче сигнала между нервной и иммунной системами. В последние годы в литературе активно обсуждается роль воспаления и медиаторов воспаления в патогенезе эндогенных психозов. Проведен поиск литературы в информационных системах PubMed, eLIBRARY.ru; проанализированы более 150 статей за последние 10 лет, 44 из них включены в обзор. Результаты: в подавляющем большинстве исследований приведены данные в пользу доказательства гипотезы воспаления в патофизиологии шизофрении. Анализ литературы показывает неоднозначность накопленных данных по проблеме иммунопатологии и воспаления при шизофрении, которые требуют продолжения исследований по поиску ключевого звена патогенеза: изучения уровней периферических цитокинов у пациентов с разными формами заболевания; параллельных исследований полиморфизмов генов цитокинов и циркулирующих уровней регулируемых ими белков; исследования факторов иммунитета/воспаления и нейротрансмиттерных систем; выявления иммуногенетических маркеров воспаления, ассоциированных с фенотипической изменчивостью шизофрении. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 5–9.)

Ключевые слова: шизофрения, система иммунитета, воспаление, цитокины.

Шизофрения — наиболее тяжелое психическое заболевание с хроническим течением, высоким процентом инвалидизации, возникновение и клиническое течение которого определяются совокупным взаимодействием генетических факторов и факторов внешней среды. Несмотря на большой объем фактического материала, свидетельствующего о вовлеченности в патологический процесс нейроэндокринных, нейрохимических, иммунологических механизмов, фундаментальные нейробиологические процессы, лежащие в основе патогенеза шизофрении, особенности ее течения остаются до сих пор до конца не расшиф-

рованными. В последние годы в литературе активно обсуждается роль воспаления в патогенезе эндогенных психозов.

Цель исследования — анализ основных результатов научных публикаций, посвященных исследованиям медиаторов воспаления цитокинам при шизофрении.

Материалы и методы

Проведен поиск литературы в информационных системах PubMed, eLIBRARY.ru по следующим ключевым словам: шизофрения — иммунитет; шизофрения — воспаление; шизофрения — цитокины и полиморфизмы генов цитокинов.

Ветлугина Тамара Парфеновна, e-mail: vetlug@mail.tomsknet.ru

Проанализированы более 150 статей, в основном, за последние 10 лет (а также более ранние значимые работы), 44 из них включены в обзор.

Результаты и обсуждение

Многолетними исследованиями убедительно показано, что иммунная система вовлечена в патогенез шизофрении, и изменения параметров иммунитета у больных в зависимости от клинических особенностей патологического процесса (форма, темп прогрессивности, стадия и длительность заболевания, влияние фармакологических препаратов) отражают модуляцию механизмов психонейроиммунного взаимодействия при шизофрении [4, 15, 19, 35, 36]. При иммунопатологических состояниях нарушения нейроиммунного взаимодействия могут быть обусловлены как патологией отдельных структур мозга и ослаблением регулирующего влияния ЦНС на систему иммунитета, так и дисфункцией иммуокомпетентных клеток и нарушением продукции ими продукции цитокинов, обладающих возможностью проникновения в мозг через барьерные зоны [9, 10]. Функции цитокинов, продуцируемых клетками белково-пептидных факторов, характеризующихся широким спектром биологических эффектов и осуществляющих регуляцию межклеточных и межсистемных взаимодействий, широко освещены в литературе [7, 12].

При шизофрении установлено нарушение секреции ряда цитокинов, причем многие авторы отмечают гиперсекрецию цитокинов, которые играют ключевую роль в активации Т-хелперов 2-го типа (Th2), что приводит к усилению механизмов переключения адаптивного иммунного ответа с клеточного на гуморальный [1, 11, 31, 38]. На основе большого объема клинических и экспериментальных данных была предложена цитокиновая гипотеза шизофрении, согласно которой различные неблагоприятные факторы (материнская инфекция, акушерские осложнения, неонатальная гипоксия) активируют иммунные клетки и аномальные уровни экспрессии цитокинов [20, 43]. Периферические цитокины могут проникать в незрелую ткань головного мозга через развивающийся гематоэнцефалический барьер; связываясь с рецепторами на нейронах и глиальных клетках, нарушать структурное и фенотипическое развитие мозга, нормальную внутриклеточную сигнализацию. Неконтролируемая активность провоспалительных цитокинов и микроглии приводит к нарушению функции мозга, что, впоследствии, на фоне генетической предрасположенности обуславливает риск развития шизофрении. Эта гипотеза поддерживается накоплением данных активно продолжающихся исследований.

Asevedo E. и др. при обследовании 29 больных шизофренией установили более высокую концентрацию в плазме крови IL-2 по сравнению с контролем (26 здоровых людей) и отрицательную его корреляцию с негативной симптоматикой по шкале PANSS, что, по мнению авторов, свидетельствует о вовлечении данного цитокина в механизмы, связанные с когнитивными нарушениями и негативной симптоматикой при шизофрении [14]. Изучая уровни сывороточных цитокинов (IL-2, IL-10, IL-4, IL-6, IFN γ , TNF α и IL-17) у пациентов с первым эпизодом шизофрении до терапии, авторы выявили более высокие уровни IL-6, IL-10 и TNF α по сравнению со здоровыми людьми и снижение этих цитокинов в процессе 10 недель лечения рисперидоном [39]. Исследование цитокинов в сыворотке крови 180 нелеченых больных шизофренией с первым эпизодом обнаружало повышение в сыворотке крови IL-1Ra, IL-10 и IL-15 и снижение IL-1Ra и IL-10 у пациентов после лечения, причем уровень IL-10 достоверно коррелировал с улучшениями негативных, общих и общего балла симптомов шкалы PANSS [18]. Ribeiro-Santos A. и др. в обзоре «Evidence for an immune role on cognition in schizophrenia: a systematic review» анализируют 75 работ по ключевым словам «Cognition; immunology; inflammation; schizophrenia» и приводят убедительные данные о роли иммунных нарушений, активации микроглии, моноаминергического дисбаланса в механизмах, лежащих в основе патогенеза шизофрении [40]. Показано, что исследование уровней цитокинов, в частности TNF α , INF γ , IL-2 и IL-6, может быть перспективным для разработки новых подходов к лечению больных шизофренией [22].

В литературе активно обсуждается роль воспаления в патогенезе эндогенных психозов [3, 8, 29, 37]. Это направление поддерживается установленными фактами аномальной продукции про/противовоспалительных цитокинов иммуокомпетентными клетками больных шизофренией. При сравнительном изучении сывороточных цитокинов у больных шизофренией (91 человек) и здоровых лиц (50 человек) у пациентов установлено увеличение уровней TNF α , IL-1 β и IL-6, уменьшение уровней IFN γ и снижение активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы; авторы приходят к выводу, что воспаление в результате нарушения регуляции цитокинов и антиоксидантных систем может иметь решающую роль в этиологии шизофрении [13]. При изучении корреляции между плазменным уровнем С3, провоспалительными цитокинами, связанными с Th17 (IL-17, IL-23 и TGF β 1) и агрессивным поведением у 40 больных шизофренией установлена положительная связь повышенного уровня провоспалительных цитокинов и общим баллом шкалы агрессии (MOAS) и шкалы PANSS, в то время как уровни С3 были отрицательно связаны

с общим баллом PANSS; авторы полагают, что повышение уровня Th17-связанных провоспалительных цитокинов и снижение уровня С3 могут быть потенциальными биомаркерами шизофрении и агрессивного поведения [30].

Нейротоксическое действие провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-1 β , IL-8) показано в исследованиях корковых и региональных объемов мозга в фиксированных посмертных образцах мозга больных шизофренией; получены результаты о прямой зависимости уменьшения коркового объема серого вещества с высоким уровнем экспрессии мРНК IL-6, IL-1 β [44]. Анализ литературы показывает, что хронически активированные макрофаги (и их аналоги в мозге — клетки микроглии), продуцирующие цитокины и другие медиаторы воспаления, оказывают негативное влияние на мозг и способны усилить генетические и экологические неблагоприятные факторы и ускорить развитие симптомов шизофрении. Некоторые исследователи в риске возникновения шизофрении и других расстройств нейроразвития рассматривают ключевую роль цитокинов, генерированных в ответ на материнскую инфекцию. Инфекционные, вирусные заболевания матери, осложнения во время беременности и родов могут привести к дефекту отдельных типов нервных клеток и снижению их резистентности. Подобные повреждения находятся в «дремлющем» состоянии до зрелости мозга и обуславливают вероятность психозов в последующие 2–3 десятилетия, поскольку такой мозг становится наиболее уязвимым к действию различных эндогенных и экзогенных факторов. Факторы окружающей среды, взаимодействуя с генетической уязвимостью, увеличивают риск развития заболевания [16]. При этом провоспалительные цитокины рассматриваются в качестве потенциальных медиаторов разрушающего воздействия инфекции на мозг плода в пренатальный период, что впоследствии может быть связано с повышенным риском уязвимости к шизофрении [26, 41].

Дополнительную поддержку гипотеза воспаления при шизофрении получила на основании данных о позитивном эффекте включения в комплекс лечения в качестве вспомогательной терапии противовоспалительных препаратов и интерферонов [20, 27, 42]. Гипотеза воспаления при шизофрении, в механизмах которой ключевая роль отводится цитокинам, продолжает активно разрабатываться [21, 33].

Известно, что функционирование цитокиновой сети в норме и при патологии регулируется экспрессией генов цитокинов и их полиморфных вариантов, возникающих в результате мутаций под влиянием различных факторов внутренней и внешней среды. Полиморфные варианты ассоциируются с нарушением продукции самих цитокинов, что может оказывать существенное влия-

ние на развитие и особенности течения патологических процессов [2].

Исследования полиморфизмов генов цитокинов *IL1B*, антагониста рецептора интерлейкина *IL1RN*, фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (*IDO*) у больных шизофренией, проведенные Голимбет В.Е. и др., выполнены на большом объеме клинического материала (более 700 пациентов с параноидной шизофренией с приступообразным и прогрессивным типами течения) [5, 6]. Установлена ассоциация между полиморфизмом VNTR гена *IL1RN* и выраженностью негативных симптомов у мужчин; выявлена комбинация: аллель С (Т-511С), аллель Т (С3954Т) в гене *IL1*, аллель V1 (VNTR) и аллель С (rs9657182) в гене *IDO*, которая значительно чаще встречалась в группе больных шизофренией по сравнению с контрольной группой; авторы также указывают на необходимость дальнейших исследований в этом направлении.

Изучена ассоциация 27 функциональных полиморфизмов интерлейкинов и растворимых рецепторов генов *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL6*, *IL6R*, *IL10*, *IL10RA* и *TGF β 1* с шизофренией (621 больной шизофренией и 531 здоровый) в польской популяции [24]. Наблюдалась ассоциация rs4848306 в гене *IL1B*, rs4251961 гена *IL1RN*, rs2228145 и rs4537545 гена *IL6R* с шизофренией; полиморфный вариант rs6676671 в гене *IL10* был связан с ранним возрастом начала заболевания; также с шизофренией были связаны гаплотипы, состоящие из rs4537545 и rs2228145 в гене *IL6R*. При дальнейших исследованиях в этом направлении авторы приходят к заключению, что полиморфные варианты генов *IL1* (rs1143627, rs16944, rs1143623, rs4848306 в гене *IL1B* и rs4251961, rs419598, rs315952, rs9005 в гене *IL1RN*) участвуют в патогенезе шизофрении, однако полученные неоднозначные результаты указывают на необходимость дальнейших параллельных исследований полиморфизмов генов цитокинов и циркулирующих уровней регулируемых ими белков [23].

Широкомасштабные исследования одиночных нуклеотидных полиморфизмов и уровня экспрессии сывороточных белков больных шизофренией установили ассоциацию между полиморфизмами и белками, в основном, участвующими в иммунных/воспалительных реакциях, включая фактор VII [rs555212], альфа-1-антитрипсин [rs11846959], индуцированный интерфероном гамма протеин 10 [rs4256246], растворимый рецептор интерлейкина 6 [rs7553796; rs1800795], трансформирующий фактор роста β (TGFB1 rs1800470); показано, что на экспрессию белков влияют полиморфизмы в соответствующем гене, это влияние варьирует в зависимости от диагноза, и определенные SNP могут быть маркерами риска шизофрении [17, 32]. Авторы полагают, что сочетание генетической информации пациента с биомаркерами периферической крови открывает новый подход к иссле-

дованию механизмов заболевания при шизофрении и других психических расстройствах.

Таким образом, функциональные полиморфизмы генов цитокинов приводят к дисбалансу про/противовоспалительного спектра цитокинов, являющихся важным компонентом коммуникационных путей между иммунной системой и мозгом, и влияющих на дофаминергическую, ГАМКергическую, глутаматергическую нейротрансмиссию — ключевой механизм патогенеза шизофрении [20, 25]. Исследования экспрессии генов цитокинов и их полиморфизмов могут помочь в понимании фенотипической изменчивости шизофрении и терапевтического ответа на антипсихотические препараты.

Анализ литературы показывает неоднозначность, а иногда и противоречивость большого объема накопленных данных по проблеме иммунопатологии и воспаления при шизофрении. Коола М.М. дает критическую оценку результатов исследования по данной проблеме. По мнению автора, несмотря на то, что существует совокупность доказательств в пользу гипотезы воспали-

ния в патофизиологии шизофрении, она до настоящего времени убедительно не доказана, что обусловлено различными причинами (выборкой пациентов, клиническим течением заболевания, влиянием терапии и условиями госпитализации, другими сопутствующими факторами) [28]. На подобные причины неоднозначности результатов по исследованию цитокинов при шизофрении указывают и другие авторы [34]. Тем не менее, Miller B.J. и др. отмечают значительный прогресс в исследованиях механизмов, лежащих в основе шизофрении, необходимость их продолжения и намечают будущие направления [33]. По мнению авторов, достижения в области иммунологии и генетики, имеющиеся на сегодняшний день, предоставляют беспрецедентную возможность дальнейшего накопления комплекса данных для описания потенциального при шизофрении иммунофенотипа, что приведет к более глубокому пониманию этиологии и патогенеза шизофрении, к новым возможностям диагностики и терапии с целью снижения риска заболевания и улучшения качества жизни пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андросова Л.В., Каледа В.Г., Бархатова А.Н. Уровень продукции ИЛ-1β мононуклеарными клетками крови у больных юношеского возраста с первым приступом эндогенного психоза в процессе терапии в зависимости от особенностей клинических расстройств и длительности инициального периода // Мед. иммунол. 2007. Т. 9. № 2–3. С. 190–191.
2. Андросова Л.В., Каледа В.Г., Бархатова А.Н. [Level of IL-1β production by mononuclear cells of blood in adolescents with first episode of endogenous psychosis in process of therapy respective from features of clinical disorders and length of initial period] // Med. Immunol. 2007. Vol. 9. № 2–3. P. 190–191. Russian.
3. Бодиевская Г.М., Титова Ж.В. Роль полиморфизма и экспрессии отдельных генов цитокинов в формировании патологии (обзор) // Успехи современного естествознания. 2015. № 1–4. С. 616–620; URL: <https://natural-sciences.ru/ru/article/view?id=34866>.
4. Bodienkova G.M., Titova Zh.V. [Polymorphism and gene expression cytokines in the formation of pathology (review)] // Uspekhi Sovremennogo Estestvoznaniia. 2015. № 1–4. P. 616–620; URL: <https://natural-sciences.ru/ru/article/view?id=34866>. Russian.
5. Бутото Б.Г., Мазо Г.Э., Дубинина Е.Е., Никифорова Ю.С. Роль иммунного воспаления в механизмах формирования депрессии при шизофрении // Психическое здоровье. 2016. Т. 14. № 10. С. 36–49.
6. Butoma B.G., Mazo G.E., Dubinina E.E., Nikiforova Yu.S. [Role of immune inflammation in mechanisms of formation of depression in schizophrenia] // Psikhicheskoe Zdorov'e. 2016. Vol. 14. № 10. P. 36–49. Russian.
7. Ветлугина Т.П. Психонейроиммунотерапия при шизофрении. Возможности прогноза течения и терапии шизофрении на основе иммунологических подходов // В кн.: Биологические маркеры шизофрении: поиск и клиническое применение / Под. ред. Н.А. Бохана, С.А. Ивановой. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2017. С. 23–33.
8. Vetlugina T.P. [Psychoneuroimmunomodulation in schizophrenia. Possibilities of prediction of course and therapy of schizophrenia based on immunological approaches] // In: Biologicheskie Markery Shizofrenii: Poisk i Klinicheskoe Primenenie / Eds. N.A. Bokhan, S.A. Ivanova. Novosibirsk: Izdatel'stvo SO RAN, 2017. P. 23–33. Russian.
9. Голимбет В.Е., Коровайцева Г.И., Габеева М.В., Великая Н.В., Снегирева А.А., Каспаров С.В., Колесина Н.Ю., Ганишева Т.К., Савельева Т.М. Изучение генов интерлейкина-1β и индоламин-2,3-диоксигеназы у больных шизофренией // Ж. неврол. психиатр. им. С.С. Корсакова. 2014. Т. 114. № 5–1. С. 46–49.
10. Golimbet V.E., Korovaitseva G.I., Gabaeva M.V., Velikaya N.V., Snegireva A.A., Kasparov S.V., Kolesina N.Yu., Ganisheva T.K., Savel'eva T.M. [A study of IL-1β and IDO gene polymorphisms in patients with schizophrenia] // Zh. Nevrol. Psikiatr. im. S.S. Korsakova. 2014. Vol. 114. № 5–1. P. 46–49. Russian.
11. Голимбет В.Е., Коровайцева Г.И., Лежейко Т.В., Абрамова Л.И., Каледа В.Г., Колесина Н.Ю., Каспаров С.В., Савельева Т.М. Полиморфизмы генов интерлейкина-1 (IL-1β) и антагониста рецептора интерлейкина (IL-1RN) при шизофрении // Ж. неврол. психиатр. им. С.С. Корсакова. 2012. Т. 112. № 12. С. 63–68.
12. Golimbet V.E., Korovaitseva G.I., Lezheiko T.V., Abramova L.I., Kaleda V.G., Kolesina N.Yu., Kasparov S.V., Savel'eva T.M. [The association study of interleukin-1β and interleukin-1 receptor antagonist and clinical symptoms of schizophrenia] // Zh. Nevrol. Psikiatr. im. S.S. Korsakova. 2012. Vol. 112. № 12. P. 63–68. Russian.
13. Каштальян О.А., Ушакова Л.Ю. Цитокины как универсальная система регуляции // Медицинские новости. 2017. № 9. С. 3–7.
14. Kashat'yan O.A., Ushakova L.Yu. [Cytokines as universal regulation system] // Meditsinskie Novosti. 2017. № 9. P. 3–7. Russian.
15. Ключник Т.П., Зозуля С.А., Сиряченко Т.М., Каледа В.Г., Дупин А.М., Омелченко М.А. Новые воспалительные маркеры депрессивных расстройств // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2013. № 1 (76). С. 35–38.
16. Klyushnik T.P., Zozulya S.A., Siryachenko T.M., Kaleda V.G., Dupin A.M., Omelchenko M.A. [New inflammatory markers of depressive disorders] // Sibirskii Vestnik Psikiatrii i Narkologii. 2013. № 1 (76). P. 35–38. Russian.
17. Корнева Е.А., Перекрест С.В. Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии // Мед. акад. ж. 2013. Т. 13. № 3. С. 7–17.
18. Korneva E.A., Perekrst S.V. [Interaction of nervous and immune systems in health and disease] // Med. Akad. Zh. 2013. Vol. 13. № 3. P. 7–17. Russian.
19. Крыжановский Г.Н., Магаева С.В. Патофизиология нейроиммунных взаимодействий // Патогенез. 2010. Т. 8. № 1. С. 4–9.
20. Kryzhanovskiy G.N., Magaeva S.V. [Pathophysiology of neuroimmune interactions] // Patogenez. 2010. Vol. 8. № 1. P. 4–9. Russian.
21. Лобачева О.А., Найденова Н.Н., Ветлугина Т.П. Цитокины при шизофрении // Патогенез. 2006. Т. 4. № 1. С. 59–60.
22. Lobacheva O.A., Naydenova N.N., Vetlugina T.P. [Cytokines in schizophrenia] // Patogenez. 2006. Vol. 4. № 1. P. 59–60. Russian.
23. Симбирцев А.С., Громова А.Ю. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления // Цитокины и воспаление. 2005. Т. 4. № 1. С. 3–10.
24. Simbirtsev A.S., Gromova A.Yu. [Functional gene polymorphisms of the molecules regulating inflammation] // Cytokines and Inflammation (St. Petersburg). 2005. Vol. 4. № 1. P. 3–10. Russian.
25. Al-Asmari A.K., Khan M.W. Inflammation and schizophrenia: alterations in cytokine levels and perturbation in antioxidative defense systems // Hum. Exp. Toxicol. 2014. Vol. 33. № 2. P. 115–222.
26. Asevedo E., Rizzo L.B., Gadelha A., Mansur R.B., Ota V.K., Berberian A.A., Scarpato B.S., Teixeira A.L., Bressan R.A., Brietzke E. Peripheral interleukin-2 level is associated with negative symptoms and cognitive performance in schizophrenia // Physiol. Behav. 2014. Vol. 129. P. 194–198. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.02.032.

15. Avgustin B., Wraber B., Tavcar R. Increased Th1 and Th2 immune reactivity with relative Th2 dominance in patients with acute exacerbation of schizophrenia // *Croat. Med. J.* 2005. Vol. 46. № 2. P. 268–274.
16. Baron M., Gruen R. Risk factors in schizophrenia. Season of birth and family history // *Br. J. Psychiatry.* 1988. Vol. 152. P. 460–465.
17. Chan M.K., Cooper J.D., Heilmann-Heimbach S., Frank J., Witt S.H., Nöthen M.M., Steiner J., Rietschel M., Bahn S. Associations between SNPs and immune-related circulating proteins in schizophrenia // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. № 1. P. 12586. doi: 10.1038/s41598-017-12986-0.
18. De Witte L., Tomasik J., Schwarz E., Guest P.C., Rahmoune H., Kahn R.S., Bahn S. Cytokine alterations in first-episode schizophrenia patients before and after antipsychotic treatment // *Schizophr. Res.* 2014. Vol. 154. № 1–3. P. 23–29.
19. Fernandez-Egea E., Vértés P.E., Flint S.M., Turner L., Mustafa S., Hatton A., Smith K.G., Lyons P.A., Bullmore E.T. Peripheral immune cell populations associated with cognitive deficits and negative symptoms of treatment-resistant schizophrenia // *PLoS One.* 2016. Vol. 11. № 5. P. e0155631.
20. Girgis R.R., Kumar S.S., Brown A.S. The cytokine model of schizophrenia: emerging therapeutic strategies // *Biol. Psychiatry.* 2014. Vol. 75. № 4. P. 292–299.
21. Hong H., Kim B.S., Im H.I. Pathophysiological role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases and psychiatric disorders // *Int. Neurol.* 2016. Vol. 20. Suppl. 1. P. S2–S7.
22. Hung Y.P., Wang C.S., Yen C.N., Chang H.C., Chen P.S., Lee I.H., Chen K.C., Yang Y.K., Lu R.B., Wang T.Y. Role of cytokine changes in clozapine-induced fever: A cohort prospective study // *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2017. Vol. 71. № 6. P. 395–402.
23. Kapelski P., Skibinska M., Maciukiewicz M., Pawlak J., Dmitrak-Weglarz M., Szczepankiewicz A., Zaremba D., Twarowska-Hauser J. An association between functional polymorphisms of the interleukin 1 gene complex and schizophrenia using transmission disequilibrium test // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 2016. Vol. 64. Suppl. 1. P. 161–168.
24. Kapelski P., Skibinska M., Maciukiewicz M., Wilkosc M., Frydecka D., Groszewska A., Narozna B., Dmitrak-Weglarz M., Czerski P., Pawlak J., Rajewska-Rager A., Leszczynska-Rodziewicz A., Slopian A., Zaremba D., Twarowska-Hauser J. Association study of functional polymorphisms in interleukins and interleukin receptors genes: IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IL6R, IL10, IL10RA and TGFBI in schizophrenia in Polish population // *Schizophr. Res.* 2015. Vol. 169. № 1–3. P. 1–9.
25. Khandaker G.M., Dantzer R. Is there a role for immune-to-brain communication in schizophrenia? // *Psychopharmacology (Berl.)*. 2016. Vol. 233. № 9. P. 1559–1573.
26. Khandaker G.M., Zimbron J., Lewis G., Jones P.B. Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies // *Psychol. Med.* 2013. Vol. 43. № 2. P. 239–257.
27. Kim Y.K., Na K.S. Neuroprotection in schizophrenia and its therapeutic implications // *Psychiatry Investig.* 2017. Vol. 14. № 4. P. 383–391.
28. Koola M.M. Cytokines in schizophrenia: Hope or hype? // *Indian J. Psychol. Med.* 2016. Vol. 38. № 2. P. 97–100.
29. Leonard B.E., Schwarz M., Myint A.M. The metabolic syndrome in schizophrenia: is inflammation a contributing cause? // *J. Psychopharmacol.* 2012. Vol. 26. Suppl. 5. P. 33–41.
30. Li H., Zhang Q., Li N., Wang F., Xiang H., Zhang Z., Su Y., Huang Y., Zhang S., Zhao G., Zhou R., Mao L., Lin Z., Cai W., Fang Y., Xie B., Zhao M., Hong W. Plasma levels of Th17-related cytokines and complement C3 correlated with aggressive behavior in patients with schizophrenia // *Psychiatry Res.* 2016. Vol. 246. P. 700–706. doi: 10.1016/j.psychres.2016.10.061.
31. Liu L., Jia F., Yuan G., Chen Z., Yao J., Li H., Fang C. Tyrosine hydroxylase, interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are overexpressed in peripheral blood mononuclear cells from schizophrenia patients as determined by semi-quantitative analysis // *Psychiatry Res.* 2010. Vol. 176. № 1. P. 1–7.
32. Mak M., Misiak B., Frydecka D., Pelka-Wysiecka J., Kucharska-Mazur J., Samochowiec A., Biełkowski P., Pawlak-Adamska E., Karabon L., Szmida E., Skiba P., Kotowicz K., Piotrowski P., Beszlej J.A., Samochowiec J. Polymorphisms in immune-inflammatory response genes and the risk of deficit schizophrenia // *Schizophr. Res.* 2018. Vol. 193. P. 359–363.
33. Miller B.J., Goldsmith D.R. Towards an immunophenotype of schizophrenia: progress, potential mechanisms, and future directions // *Neuropsychopharmacology.* 2017. Vol. 42. № 1. P. 299–317.
34. Misiak B., Stańczykiewicz B., Kotowicz K., Rybakowski J.K., Samochowiec J., Frydecka D. Cytokines and C-reactive protein alterations with respect to cognitive impairment in schizophrenia and bipolar disorder: A systematic review // *Schizophr. Res.* 2018. Vol. 192. P. 16–29.
35. Müller N. Immunology of schizophrenia // *Neuroimmunomodulation.* 2014. Vol. 21. № 2–3. P. 109–116. doi: 10.1159/000356538. Epub 2014 Feb 14.
36. Müller N., Riedel M., Gruber R., Ackenheil M., Schwarz M.J. The immune system and schizophrenia. An integrative view // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000. Vol. 917. P. 456–467.
37. Müller N., Weidinger E., Leitner B., Schwarz M.J. The role of inflammation in schizophrenia // *Front. Neurosci.* 2015. Vol. 21. № 9. P. 372.
38. Na K.S., Kim Y.K. Monocytic, Th1 and Th2 cytokine alterations in the pathophysiology of schizophrenia // *Neuropsychobiology.* 2007. Vol. 56. № 2–3. P. 55–63.
39. Noto C., Ota V.K., Gouvea E.S., Rizzo L.B., Spindola L.M., Honda P.H., Cordeiro Q., Belangero S.I., Bressan R.A., Gadelha A., Maes M., Brietzke E. Effects of risperidone on cytokine profile in drug-naïve first-episode psychosis // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014. Vol. 18. № 4. pii: pyu042.
40. Ribeiro-Santos A., Lucio Teixeira A., Salgado J.V. Evidence for an immune role on cognition in schizophrenia: a systematic review // *Curr. Neuropharmacol.* 2014. Vol. 12. № 3. P. 273–280.
41. Urakubo A., Jarskog L.F., Lieberman J.A., Gilmore J.H. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain // *Schizophr. Res.* 2001. Vol. 47. № 1. P. 27–36.
42. Vetlugina T.P., Lobacheva O.A., Sergeeva S.A., Nikitina V.B., Nevidimova T.I., Semke A.V. Adjunctive use of interferon γ inducer for treatment of patients with schizophrenia // *Acta Neuropsychiatr.* 2016. Vol. 28. № 3. P. 149–156.
43. Watanabe Y., Someya T., Nawa H. Cytokine hypothesis of schizophrenia pathogenesis: evidence from human studies and animal models // *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2010. Vol. 64. № 3. P. 217–230.
44. Zhang Y., Catts V.S., Sheedy D., McCrossin T., Kril J.J., Shannon Weickert C. Cortical grey matter volume reduction in people with schizophrenia is associated with neuro-inflammation // *Transl. Psychiatry.* 2016. Vol. 6. № 12. P. e982.

Cytokines in pathogenesis of schizophrenia

T.P. Vetlugina, O.A. Lobacheva

Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk

This review is devoted to analysis of studies in the field of cytokines investigation in schizophrenia. Registered currently data convincingly prove an essential role of disturbances of neuroimmune interaction in the pathogenesis of schizophrenia. Neuroimmune dysregulation can be caused both by pathology of some brain structures and weakening of regulatory influence of CNS on the immunity system and impairment of cytokine production by immunocompetent cells. In the last years, the role of inflammation and transmitters of inflammation — cytokines — in the pathogenesis of endogenous psychoses is actively discussed in the literature. Objective of the study: to analyze the main results of scientific publications devoted to investigations of inflammation transmitters — cytokines in schizophrenia. Literature was searched in data systems PubMed.com, eLIBRARY.ru; more than 150 papers for last 10 years were analyzed, 44 of them were included in the review. Most studies support the hypothesis of inflammation in schizophrenia pathophysiology. Conclusion: Analysis of literature showed ambiguity of registered data on the problem of immunopathology and inflammation in schizophrenia requiring continuation of investigations on search for the key link of the pathogenesis: study of peripheral cytokines level in patients with different forms of the disease; parallel investigations of gene polymorphisms of cytokines and circulating levels of proteins regulated by them; investigations of factors of the immunity/inflammation and neurotransmitter systems; detection of immunogenetic markers of inflammation associated with phenotypic variability of schizophrenia. (Cytokines and Inflammation. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 5–9.)

Key words: schizophrenia, immunity system, inflammation, cytokines.

Роль воспаления в патогенезе угревой болезни

О.М. Демина¹, К.Г. Гуревич^{2,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России;

³ГБУ «НИИ Организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента здравоохранения города Москвы», Москва

Угревая болезнь (УБ, акне) является распространенным, часто встречающимся заболеванием, поражающим до 80 % подростков и молодых взрослых. Нередко УБ сохраняется на протяжении всей жизни, вызывая психологический дискомфорт и социальную дезадаптацию. И это более значимо в случае формирования обезображивающих внешность рубцов, а также различных эстетических дефектов. Традиционно существовало мнение о том, что воспаление играет роль лишь на поздних стадиях УБ. Однако в последнее время эта гипотеза пристально обсуждается, т. к. показано, что воспалительная реакция при УБ является первичной, являясь субклиническим базисом комедоногенеза. Полученные в настоящее время данные о развитии воспалительной реакции при УБ убедительно подтверждают ее наличие как при ранних, так и поздних стадиях дерматоза. Новые данные свидетельствуют, что УБ является первичным воспалительным заболеванием с клиническими, гистологическими и иммунологическими признаками воспаления на всех стадиях акне, и для повышения эффективности терапии важно применение терапевтических средств с противовоспалительным эффектом, преимущественно в комбинации с другими противогревыми препаратами. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 10–15.)

Ключевые слова: угревая болезнь, акне, воспаление, интерлейкины, факторы роста.

Угревая болезнь (УБ, акне) является распространенным, часто встречающимся заболеванием, поражающим до 80 % подростков и молодых взрослых. Нередко УБ сохраняется на протяжении всей жизни, вызывая психологический дискомфорт и социальную дезадаптацию. И это более значимо в случае формирования обезображивающих внешность рубцов, а также различных эстетических дефектов. Общеизвестны 4 основных звена патогенеза акне, однако традиционные представления о роли *Propionibacterium acnes* как бактериального агента в настоящее время претерпели существенные изменения. Эти мик-

роорганизмы относятся к комменсалам кожи и присутствуют на коже как у здоровых людей, так и больных УБ. Недавние исследования патогенеза УБ показали, что *P. acnes* колонизирует выводные протоки сально-волосяных фолликулов (СВФ), инициирует врожденный иммунитет, приводя к прогрессированию невоспалительных высыпаний (комедонов) в воспалительные — папулы, пустулы и узлы. Традиционно существовало мнение о том, что воспаление играет роль лишь на поздних стадиях УБ. Однако в последнее время эта гипотеза пристально обсуждается, т. к. показано, что воспалительная реакция при УБ является первичной, являясь субклиническим базисом комедоногенеза [12].

Демина Ольга Михайловна, e-mail: demina.om@mail.ru

Значение развития ранних воспалительных реакций в патогенезе акне:

1. Повышенная экспрессия и биоактивность провоспалительных медиаторов:

1.1. Избыток медиаторов воспаления в непораженной коже и при ранних стадиях акне: Е-селектин, молекула адгезии сосудов-1 (VCAM-1), интерлейкин 1 (IL-1), интегрин.

1.2. Биоактивность интерлейкина 1 α (IL-1 α) в открытых комедонах.

1.3. Повышенная иммунореактивность дефензина-2.

1.4. Повышение числа CD3⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов и макрофагов в непораженной коже.

2. Пептидазы.

2.1. Экспрессия провоспалительных пептидаз себоцитами и кератиноцитами.

2.2. Ингибирование активности пептидаз с формированием противовоспалительного статуса.

3. Нейропептидазы: повышенная экспрессия в непораженной коже кортико-рилизинг гормона, субстанции Р, рецептора меланокортина-1.

4. Toll-like рецепторы.

4.1. *P. acnes* активируют воспалительный цитокиновый ответ, присутствуя в СВФ, могут иметь значение в формировании комедонов.

4.2. Активация эндогенных лигандов.

5. Изменения в биосинтезе липидов.

5.1. Ассоциация синтеза липидов себоцитами и воспаления.

5.2. Peroкислированные липиды активируют воспалительный ответ.

6. Терапевтические аспекты.

6.1. Ретиноиды эффективны при невоспалительных высыпаниях: снижают экспрессию toll-like рецепторов 2 и IL-10.

Ряд сравнительных исследований по анализу клинических симптомов акне и эффективности лекарственных препаратов с прямым и опосредованным противовоспалительным эффектами, подтверждают возникновение воспалительной реакции на ранних стадиях развития дерматоза. Так, дапсон является противовоспалительным агентом, который ингибирует секрецию IL-8 *in vitro*, предотвращает перекисное окисление липидов и миграцию нейтрофилов. Клинически показано, что применение дапсона вызывало регресс как комедонов, так и воспалительных элементов акне [22, 39, 40].

Известно, что топические ретиноиды, такие как адапален, обладают противовоспалительными свойствами и эффективны при ранних стадиях УБ. Механизм противовоспалительного действия адапалена обусловлен редукцией экспрессии toll-like рецепторов 2 (TLR2) и IL-10 как в области клинических проявлений акне, так и в непораженной коже. Результаты двух плацебо-контролируемых рандомизированных исследований 12-не-

дельного применения 0,1% лосьона «адапален» показали достоверное снижение комедональных и воспалительных элементов. Известно, что комбинированная терапия дапсоном или адапаленом в сочетании с антибактериальными топическими средствами (антибиотиками, бензоилом пероксидом) более клинически значимо приводит к редукции комедонов, в сравнении с монотерапией адапаленом [13, 40, 41].

По данным гистоморфологического исследования ранних элементов УБ (от 6 до 72 часов) было показано формирование лимфоидного периваскулярного инфильтрата, тогда как инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами выявлена на более поздних стадиях, что приводило к растяжению СВФ и образованию пустул. В последующем это растяжение, сопровождающееся спонгиозом, вызывало разрыв СВФ с образованием конглобатных абсцедирующих участков. Полученные данные свидетельствуют о раннем возникновении воспалительного процесса в микрокомедонах, даже до начала гиперпролиферации кератиноцитов инфундибулума СВФ. Эти исследования установили, что у больных УБ в непораженной коже выявлена инфильтрация CD3⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитами перифолликулярно и в папиллярной дерме, а также увеличение числа макрофагов, аналогично тому, что обнаруживается в папулах [3, 4, 51, 54].

Значение *P. acnes* как этиологического фактора в развитии воспалительных форм УБ было признано более полувека назад. По данным гистоморфологического исследования, *P. acnes* достоверно идентифицированы в очагах воспалительных акне у 68% лиц с длительностью высыпаний один день и у 79% — три дня [8, 26].

По данным клинических исследований, выявлена колонизация кожи *P. acnes* у больных со средней и тяжелой степенью тяжести УБ, а прием тетрациклина и миноциклина подавляет размножение микроорганизмов и снижает их численность до 50%. Это подтверждает, что *P. acnes* является триггером воспалительной реакции при акне, которая, в свою очередь, поддерживает пролиферацию *P. acnes* [6, 36].

Показано, что *P. acnes* инициирует врожденный иммунитет посредством активации TLR2 как при ранних микрокомедональных акне, так и при поздних воспалительных формах. В результате активация TLR2 вызывает экспрессию генов иммунного ответа, в том числе кодирующих различные цитокины и хемокины, стимулирующие миграцию иммунных клеток [9, 15, 16, 20, 24].

Имеются данные, что *P. acnes* также активируют TLR2 моноцитов, что приводит к секреции цитокинов (IL-8 и IL-12) и антимикробных пептидов (β -дефензина-2). IL-12 является основным провоспалительным цитокином, который проду-

цируется моноцитами в ответ на колонизацию грамположительными микроорганизмами. Данные об активации β -дефензина-2 человека были подтверждены в культуре клеток — эпидермальных кератиноцитов [4, 29, 35].

Семейство β -дефензинов (дефензин-1, -2 и -3) синтезируется в коже в ответ на бактериальную инфекцию и обладает широким спектром функций, включая модификацию клеточной миграции и созревание, индукцию цитокинов и хемоаттракцию иммунокомпетентных клеток [1, 47].

Анализ экспрессии гена β -дефензинов-2 показал ее увеличение в 33 раза при клинически диагностированных воспалительных акне в сравнении с уровнем экспрессии этого гена в непораженной коже и у лиц без акне [14, 25, 46].

Имеются сведения о том, что жирные кислоты кожного сала могут играть роль эндогенных регуляторов сигнальных путей TLR и активировать эффекты *P. acnes*, опосредованные TLR, однако является ли эффект этих регуляторов про- или противовоспалительным пока остается неизвестным [47].

Результаты исследований биоптатов кожи пациентов с акне показали возможность альтернативного варианта взаимосвязи *P. acnes* и высвобождения медиаторов воспаления. Известно, что *P. acnes* выделяют различные бактериальные протеазы, которые посредством стимуляции протеаза-активируемого рецептора-2 (protease-activated receptor-2, PAR-2) на кератиноцитах могут усиливать транскрипцию провоспалительных цитокинов: IL-1 α , IL-8, TNF α , ряда матричных металлопротеиназ и антимикробного пептида LL37. Поэтому при УБ в дополнение к активации воспалительной реакции через TLR происходит ее развитие посредством стимуляции PAR-2 [25].

Однако при множественных папулезных и пустулезных высыпаниях как с узловато-кистозными элементами, так и без них обнаружена низкая плотность *P. acnes* в сравнении с больными акне без воспалительных элементов [8, 32].

Получены данные о том, что значительная часть комедонов являются стерильными, а микроорганизмы колонизируют СВФ, начиная с воспалительных высыпаний. В целом, эти результаты подтверждают предположение о том, что воспалительный процесс развивается посредством иммунохимических реакций, независимых от наличия *P. acnes* [34].

Имеются доказательства роли сальных желез в развитии воспаления при акне. Показано, что IL-1, основной цитокин, регулирующий воспалительные и иммунные реакции, играет роль в развитии воспаления при УБ. Предполагается, что в сальной железе происходит секреция IL-1 α и IL-1 β , инициированная активностью транскрипционно активных мРНК цитокинов IL-1 α и IL-1 β .

Кроме того, нормальные кератиноциты человека *in vitro* секретируют IL-1 α в определенной конституционально постоянной концентрации, что подтверждает наличие непрерывной низкоуровневой экспрессии этого цитокина. Также установлено значительное увеличение экспрессии и секреции IL-1 на ранних стадиях УБ. Так, IL-1 α был идентифицирован у 78% пациентов в невоспалительных открытых комедонах, а у 58% этот цитокин был выше 100 мкг/мл — уровень, превышающий известный порог для запуска видимого провоспалительного ответа [9, 17, 37, 52].

Показано, что при исследованиях *in vitro* IL-1 α в культуре клеток вызывал ремоделирование СВФ и комедоногенез, тогда как добавление TNF α и EGF приводило к дезорганизации кератиноцитов в инфундибулуме и разрыву СВФ подобно наблюдаемому при тяжелых формах УБ. При гистоморфологическом анализе была выявлена избыточная экспрессия IL-8 фолликулярно и перифолликулярно в очагах поражения акне. При этом IL-8 имеет решающее значение в миграции нейтрофилов в зону воспаления СВФ, которые выделяют лизосомальные ферменты, приводя к повреждению фолликулярного эпителия и дальнейшему воспалению. Полученные результаты показали существенное повышение экспрессии мРНК TNF α , IL-8, IL-10 в зонах высыпаний УБ [19].

Показана экспрессия мРНК β -дефензинов в сальных железах здоровой кожи, что может указывать на протективную роль дефензинов от инвазии микроорганизмами. Выявлено более значимое повышение β -дефензина-1 в комедонах в сравнении с пустулами. При этом, учитывая, что провоспалительные цитокины являются регуляторами β -дефензинов, то избыточная экспрессия β -дефензина-1 может быть вторичной в ответ на развитие перифолликулярной инфильтративной реакции [28, 30, 56].

Сообщается о провоспалительном эффекте свободных жирных кислот, секретируемых сальной железой, опосредованном за счет выраженной экспрессии IL-1. С другой стороны, некоторые липиды, такие как олеиновая и пальмитиновая кислоты, обладают антибактериальным действием, механизм которого остается неизвестным. Имеется предположение о наличии индуцируемого липидами микробицидного пути, опосредованного липид-активированными TLR в сальных железах [23, 27, 45, 53].

Кроме того, в процессе появления высыпаний акне образуются различные модификации липидов, включая накопление перекисей, которые могут вызывать воспалительные явления в комедонах. Установлено, что перекиси липидов стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов и активируют рецепторы, активируемые про-

лифератором пероксисом (peroxisome proliferator activated receptors (PPAR)), которые регулируют метаболизм липидов и развитие воспаления. В частности, продукты перекисного окисления сквалена являются комедогенными и обладают провоспалительной активностью за счет стимуляции пролиферации кератиноцитов, активности липооксигеназы, индукции экспрессии PPAR и секреции провоспалительных цитокинов. Эти данные подтверждают роль изменений качественного состава себума в инициировании воспаления на ранних стадиях УБ [7, 48, 49].

Пептидазы, такие как дипептидилпептидаза IV (dipeptidyl peptidase IV, DP-IV) и аминопептидаза (amino-peptidase N (APN)), экспрессируются в организме человека, регулируют ряд биологических процессов, включая рост, дифференцировку, межклеточные взаимодействия и трансформацию клеток, в частности, Т-лимфоцитов [5, 43].

Оба этих фермента экспрессируются на нормальных кератиноцитах человека и активируются при гиперпролиферативных дерматозах. Показано, что эти пептидазы также экспрессируются на себоцитах человека, и на начальных стадиях УБ их фармакологическое ингибирование приводит к супрессии дифференцировки и секреции цитокинов в себоцитах и кератиноцитах. Кроме того, происходит подавление продукции IL-3 Т-лимфоцитами, которые активируются *P. acnes*, и увеличение экспрессии иммуносупрессивного фактора TNF α . Эти данные свидетельствуют о том, что DP-IV и APN участвуют в функционировании сальных желез и играют роль провоспалительных факторов в патогенезе ранних стадий УБ [5, 42, 44].

В ряде исследований при ранних стадиях УБ было показано повышение нейрпептидаз, таких как кортикотропин-рилизинг фактор и рецептор

меланокортина-1, обладающих провоспалительной активностью. Кроме того, в зоне СВФ отмечалось избыточное количество субстанции Р — потенциального фактора нейрогенного воспаления при стресс-индуцированной УБ [10, 11, 18, 21, 38, 55].

Таким образом, полученные в настоящее время данные о развитии воспалительной реакции при угревой болезни убедительно подтверждают ее наличие как при ранних, так и поздних стадиях дерматоза. Новые данные свидетельствуют, что угревая болезнь является первичным воспалительным заболеванием с клиническими, гистологическими и иммунологическими признаками воспаления на всех стадиях акне. В связи с этим мнение о невоспалительном характере комедогенной формы акне претерпевает изменение с учетом начала развития воспаления на ранних стадиях заболевания, что подтверждается наличием гиперсекреции провоспалительных цитокинов, пептидаз и нейрпептидаз, активации липидов сальных желез, TLR и PPAR.

При этом иммунохимические пути инициации и распространения воспаления при угревой болезни являются сложными и в настоящее время до конца не изученными. Изучение роли *P. acnes* как обязательного этиологического воспалительного агента акне также свидетельствует о его обязательном присутствии, т. к. воспалительный ответ возникает и без этих микроорганизмов. Приведенные результаты исследований свидетельствуют о том, что угревая болезнь является хроническим воспалительным заболеванием, и для повышения эффективности терапии важно применение терапевтических средств с противовоспалительным эффектом, преимущественно в комбинации с другими противоугревыми препаратами [2, 7, 31, 50].

ЛИТЕРАТУРА

1. Agier J., Brzezińska-Błaszczak E. Cathelicidins and defensins regulate mast cell antimicrobial activity // *Postepy Hig. Med. Dosw.* (Online). 2016. Vol. 16. № 70 (0). P. 618–636.
2. Al-Hammadi A., Al-Ismaily A., Al-Ali S., Ramadurai R., Jain R., McKinley-Grant L., Mughal T.I. Topical, biological and clinical challenges in the management of patients with acne vulgaris // *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 2016. Vol. 16. № 2. P. e152–160.
3. Antiga E., Verdelli A., Bonciani D., Bonciolini V., Caproni M., Fabbri P. Acne: a new model of immune-mediated chronic inflammatory skin disease // *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 2015. Vol. 150. № 2. P. 247–254.
4. Beylot C., Auffret N., Poli F., Claudel J.P., Leccia M.T., Del Giudice P., Dreno B. Propionibacterium acnes: an update on its role in the pathogenesis of acne // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2014. Vol. 28. № 3. P. 271–278.
5. Biton A., Ansoorge S., Bank U., Täger M., Reinhold D., Brocke S. Divergent actions by inhibitors of DP IV and APN family enzymes on CD4+ Teff cell motility and functions // *Immunobiology.* 2011. Vol. 216. № 12. P. 1295–1301.
6. Bojar R.A., Holland K.T. Acne and Propionibacterium acnes // *Clin. Dermatol.* 2004. Vol. 22. № 5. P. 375–379.
7. Capitano B., Lora V., Ludovici M., Sinagra J.L., Ottaviani M., Mastrofrancesco A., Ardigo M., Camera E. Modulation of sebum oxidation and interleukin-1 α levels associates with clinical improvement of mild comedonal acne // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2014. Vol. 28. № 12. P. 1792–1797.
8. Dessinioti C., Katsambas A.D. The role of Propionibacterium acnes in acne pathogenesis: facts and controversies // *Clin. Dermatol.* 2010. Vol. 28. № 1. P. 2–7.
9. Dréno B. What is new in the pathophysiology of acne, an overview // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2017. Vol. 31. Suppl. 5. P. 8–12.
10. Ganceviciene R., Bohm M., Fimmel S., Zouboulis C.C. The role of neuropeptides in the multifactorial pathogenesis of acne vulgaris // *Dermatoendocrinol.* 2009. Vol. 1. № 3. P. 170–176.
11. Ganceviciene R., Graziene V., Böhm M., Zouboulis C.C. Increased in situ expression of melanocortin-1 receptor in sebaceous glands of lesional skin of patients with acne vulgaris // *Exp. Dermatol.* 2007. Vol. 16. № 7. P. 547–552.
12. Gollnick H., Cunliffe W., Berson D., Dreno B., Finlay A., Leyden J.J., Shalita A.R., Thiboutot D.; Global Alliance to Improve Outcomes in Acne. Management of acne: a report from a Global Alliance to Improve Outcomes in Acne. Global Alliance to Improve Outcomes in Acne // *J. Am. Acad. Dermatol.* 2003. Vol. 49. № 1. P. 1–37.
13. Gonzalez P., Vila R., Cirigliano M. The tolerability profile of clindamycin 1%/benzoyl peroxide 5% gel vs. adapalene 0.1%/benzoyl peroxide 2.5% gel for facial acne: results of a randomized, single-blind, split-face study // *J. Cosmet. Dermatol.* 2012. Vol. 11. № 4. P. 251–260.
14. Harvey A., Huynh T.T. Inflammation and acne: putting the pieces together // *J. Drugs. Dermatol.* 2014. Vol. 13. № 4. P. 459–463.

15. Huang Y.C., Yang C.H., Li T.T., Zouboulis C.C., Hsu H.C. Cell-free extracts of Propionibacterium acnes stimulate cytokine production through activation of p38 MAPK and Toll-like receptor in SZ95 sebocytes // *Life Sci.* 2015. Vol. 15. № 139. P. 123–131.
16. Jasson F., Nagy I., Knol A.C., Zuliani T., Khammari A., Dréno B. Different strains of Propionibacterium acnes modulate differently the cutaneous innate immunity // *Exp. Dermatol.* 2013. Vol. 22. № 9. P. 587–592.
17. Jeremy A.H., Holland D.B., Roberts S.G., Thomson K.F., Cunliffe W.J. Inflammatory events are involved in acne lesion initiation // *J. Invest. Dermatol.* 2003. Vol. 121. № 1. P. 20–27.
18. Jović A., Marinović B., Kostović K., Čeović R., Basta-Juzbašić A., Bukvić Mokoš Z. The impact of psychological stress on acne // *Acta Dermatovenerol. Croat.* 2017. Vol. 25. № 2. P. 1133–1141.
19. Kang S., Cho S., Chung J.H., Hammerberg C., Fisher G.J., Voorhees J.J. Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in inflammatory acne lesions in vivo // *Am. J. Pathol.* 2005. Vol. 166. № 6. P. 1691–1699.
20. Kim J., Ochoa M.T., Krutzik S.R., Takeuchi O., Uematsu S., Legaspi A.J., Brightbill H.D., Holland D., Cunliffe W.J., Akira S., Sieling P.A., Godowski P.J., Modlin R.L. Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses // *J. Immunol.* 2002. Vol. 169. № 3. P. 1535–1541.
21. Kim K., Ha I., Kim E., Kim K. A comparative study of biological and metabolic biomarkers between healthy individuals and patients with acne vulgaris: A cross-sectional study protocol // *Medicine (Baltimore)*. 2017. Vol. 96. № 45. P. e8554.
22. Kircik L.H. Harnessing the anti-inflammatory effects of topical dapson for management of acne // *J. Drugs Dermatol.* 2010. Vol. 9. № 6. P. 667–671.
23. Lee S.E., Kim J.M., Jeong M.K., Zouboulis C.C., Lee S.H. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is expressed in human sebaceous glands and regulates glucocorticoid-induced lipid synthesis and toll-like receptor 2 expression in SZ95 sebocytes // *Br. J. Dermatol.* 2013. Vol. 168. № 1. P. 47–55.
24. Lee S.E., Kim J.M., Jeong S.K., Choi E.H., Zouboulis C.C., Lee S.H. Expression of Protease-Activated Receptor-2 in SZ95 Sebocytes and its Role in Sebaceous Lipogenesis, Inflammation, and Innate Immunity // *J. Invest. Dermatol.* 2015. Vol. 135. № 9. P. 2219–2227.
25. Lee S.E., Kim J.M., Jeong S.K., Jeon J.E., Yoon H.J., Jeong M.K., Lee S.H. Protease-activated receptor-2 mediates the expression of inflammatory cytokines, antimicrobial peptides, and matrix metalloproteinases in keratinocytes in response to Propionibacterium acnes // *Arch. Dermatol. Res.* 2010. Vol. 302. № 10. P. 745–756.
26. Leeming J.P., Holland K.T., Cunliffe W.J. The microbial colonization of inflamed acne vulgaris lesions // *Br. J. Dermatol.* 1988. Vol. 118. № 2. P. 203–208.
27. Lovászi M., Matti M., Eyerich K., Gácsi A., Csányi E., Kovács D., Rühl R., Szegedi A., Kemény L., Stähle M., Zouboulis C.C., Eyerich S., Töröcsik D. Sebum lipids influence macrophage polarization and activation // *Br. J. Dermatol.* 2017. Vol. 177. № 6. P. 1671–1682.
28. Melnik B.C. Is sebocyte-derived leptin the missing link between hyperseborrhea, ductal hypoxia, inflammation and comedogenesis in acne vulgaris? // *Exp. Dermatol.* 2016. Vol. 25. № 3. P. 181–182.
29. Nagy I., Pivarcsi A., Koreck A., Széll M., Urbán E., Kemény L. Distinct strains of Propionibacterium acnes induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors // *J. Invest. Dermatol.* 2005. Vol. 124. № 5. P. 931–938.
30. Nakatsuji T., Kao M.C., Zhang L., Zouboulis C.C., Gallo R.L., Huang C.M. Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating beta-defensin-2 expression // *J. Invest. Dermatol.* 2010. Vol. 130. № 4. P. 985–994.
31. Nguyen C.T., Sah S.K., Zouboulis C.C., Kim T.Y. Inhibitory effects of superoxide dismutase 3 on Propionibacterium acnes-induced skin inflammation // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8. № 1. P. 4024.
32. Omer H., McDowell A., Alexeyev O.A. Understanding the role of Propionibacterium acnes in acne vulgaris: The critical importance of skin sampling methodologies // *Clin. Dermatol.* 2017. Vol. 35. № 2. P. 118–129.
33. Saint-Jean M., Khammari A., Jasson F., Nguyen J.M., Dréno B. Different cutaneous innate immunity profiles in acne patients with and without atrophic scars // *Eur. J. Dermatol.* 2016. Vol. 26. № 1. P. 68–74.
34. Shaheen B., Gonzalez M. A microbial aetiology of acne: what is the evidence? // *Br. J. Dermatol.* 2011. Vol. 165. № 3. P. 474–485.
35. Simonart T. Immunotherapy for acne vulgaris: current status and future directions // *Am. J. Clin. Dermatol.* 2013. Vol. 14. № 6. P. 429–435.
36. Song M., Seo S.H., Ko H.C., Oh C.K., Kwon K.S., Chang C.L., Kim M.B. Antibiotic susceptibility of Propionibacterium acnes isolated from acne vulgaris in Korea // *J. Dermatol.* 2011. Vol. 38. № 7. P. 667–673.
37. Stein Gold L.F. What's new in acne and inflammation? // *J. Drugs Dermatol.* 2013. Vol. 12. № 6. P. s67–69.
38. Szöllösi A.G., Oláh A., Bíró T., Tóth B.I. Recent advances in the endocrinology of the sebaceous gland // *Dermatoendocrinol.* 2018. Vol. 9. № 1. P. e1361576.
39. Tan J. Dapsone 5% gel: a new option in topical therapy for acne // *Skin Therapy Lett.* 2012. Vol. 17. № 8. P. 1–3.
40. Tangheiti E., Dhawan S., Green L., Ling M., Downie J., Germain M.A., Kasteler J.S., Kircik L., Oefelein M.G., Draeos Z. Clinical evidence for the role of a topical anti-inflammatory agent in comedonal acne: findings from a randomized study of dapson gel 0.5% in combination with tazarotene cream 0.1% in patients with acne vulgaris // *J. Drugs Dermatol.* 2011. Vol. 10. № 7. P. 783–792.
41. Tangheiti E., Abramovits W., Solomon B., Loven K., Shalita A. Tazarotene versus tazarotene plus clindamycin/benzoyl peroxide in the treatment of acne vulgaris: a multicenter, double-blind, randomized parallel-group trial // *J. Drugs Dermatol.* 2006. Vol. 5. № 3. P. 256–261.
42. Thielitz A., Ansorge S., Bank U., Tager M., Wrenger S., Gollnick H., Reinhold D. The ectopeptidases dipeptidyl peptidase IV (DP IV) and aminopeptidase N (APN) and their related enzymes as possible targets in the treatment of skin diseases // *Front. Biosci.* 2008. Vol. 13. P. 2364–2375.
43. Thielitz A., Reinhold D., Vetter R., Bank U., Helmuth M., Hartig R., Wrenger S., Wiswedel L., Lendecke U., Kähne T., Neubert K., Faust J., Zouboulis C.C., Ansorge S., Gollnick H. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV and aminopeptidase N target major pathogenetic steps in acne initiation // *J. Invest. Dermatol.* 2007. Vol. 127. P. 1042–1051.
44. Tochio T., Tanaka H., Nakata S., Ikeno H. Accumulation of lipid peroxide in the content of comedones may be involved in the progression of comedogenesis and inflammatory changes in comedones // *J. Cosmet. Dermatol.* 2009. Vol. 8. № 2. P. 152–158.
45. Töröcsik D., Kovács D., Camera E., Lovászi M., Cseri K., Nagy G.G., Molinaro R., Rühl R., Tax G., Szabó K., Picardo M., Kemény L., Zouboulis C.C., Remenyik É. Leptin promotes a proinflammatory lipid profile and induces inflammatory pathways in human SZ95 sebocytes // *Br. J. Dermatol.* 2014. Vol. 171. № 6. P. 1326–1335.
46. Trivedi N.R., Gilliland K.L., Zhao W., Liu W., Thiboutot D.M. Gene array expression profiling in acne lesions reveals marked upregulation of genes involved in inflammation and matrix remodeling // *J. Invest. Dermatol.* 2006. Vol. 126. P. 1071–1079.
47. Wiesner J., Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system // *Virulence.* 2010. Vol. 1. № 5. P. 440–464.
48. Youn S.H., Choi C.W., Choi J.W., Kim B.R., Byun S.Y., Youn S.W. Novel facial cosmetic area '0 zone' shows unique characteristics in sebum excretion and acne lesion distribution // *Skin Res. Technol.* 2014. Vol. 20. № 2. P. 164–169.
49. Zhou B.R., Zhang J.A., Zhang Q., Permatasari F., Xu Y., Wu D., Yin Z.Q., Luo D. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokines interleukin-6, interleukin-1β, and tumor necrosis factor-α via a NF-κB-dependent mechanism in HaCaT keratinocytes // *Mediators Inflamm.* 2013. Vol. 2013. P. 530429.
50. Zhu T., Wu W., Yang S., Li D., Sun D., He L. Polyphyllin I Inhibits Propionibacterium acnes-Induced Inflammation In Vitro // *Inflammation.* 2019. Vol. 42. № 1. P. 35–44.
51. Zouboulis C.C. [Pathophysiology of acne. What is confirmed?] // *Hautarzt.* 2013. Vol. 64. № 4. P. 235–240. German.
52. Zouboulis C.C. The sebaceous gland // *Hautarzt.* 2010. Vol. 61. № 6. P. 467–468.
53. Zouboulis C.C., Jourdan E., Picardo M. Acne is an inflammatory disease and alterations of sebum composition initiate acne lesions // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2014. Vol. 28. № 5. P. 527–532.
54. Zouboulis C.C., Bornstein S.R. [Skin and hormones: news from dermatology] // *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2013. Vol. 138. № 31–32. P. 1561–1563. German.
55. Zouboulis C.C., Picardo M., Ju Q., Kurokawa I., Töröcsik D., Bíró T., Schneider M.R. Beyond acne: Current aspects of sebaceous gland biology and function // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2016. Vol. 17. № 3. P. 319–334.
56. Zouboulis C.C., Schagen S., Alestas T. The sebocyte culture: a model to study the pathophysiology of the sebaceous gland in seborrhea, seborrhea and acne // *Arch. Dermatol. Res.* 2008. Vol. 300. № 8. P. 397–413.

The role of inflammation in the pathogenesis of acne

O.M. Demina¹, K.G. Gurevich^{2,3}

¹Federal State Budgetary Institution "Dmitry Rogachev National Medical Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology", Ministry of Health;

²FSBEI HE "A.I. Evdokimov Moscow State Medical and Dental University" Ministry of Health;

³State Budgetary Institution "Research Institute of the Organization of Health and Medical Management of the Department of Health of Moscow", Moscow

Acne is a common, frequent disease that affects up to 80 % of adolescents and young adults. Often acne persists throughout life, causing psychological discomfort and social maladjustment. And it is more significant in the case of disfiguring appearance of scars formation, as well as various aesthetic defects. Traditionally, it was believed that inflammation plays a role only in the later stages of acne. Recently, however, this hypothesis has been closely discussed, since it is shown that the inflammatory reaction in acne is primary, being a subclinical basis of comedogenogenesis. Currently obtained data on the development of the inflammatory reaction in acne convincingly confirm its presence in both the early and late stages of the dermatosis. New data suggest that acne is a primary inflammatory disease with clinical, histological and immunological signs of inflammation in all stages of acne, and to increase the effectiveness of therapy it is important to use therapeutic agents with anti-inflammatory effect, mainly in combination with other anti-acne drugs. (Cytokines and Inflammation. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 10–15.)

Key words: acne, inflammation, interleukins, growth factors.

Роль цитокинов в патогенезе атопического дерматита

*О.О. Побежимова, А.В. Жестков, О.С. Козлова,
А.В. Лямин, А.Д. Протасов, В.В. Кулагина*

Самарский государственный медицинский университет, г. Самара

Атопический дерматит (АД) — одно из самых распространенных заболеваний аллергического характера, проявляющееся в тяжелой форме, поражая кожу. Заболевание обусловлено генетически и является хроническим. Это одно из наиболее распространенных заболеваний (от 20 до 40 % в структуре кожных заболеваний), встречающееся во всех странах у лиц обоих полов. Последние годы наблюдается рост АД во всем мире. Заболевание чаще встречается в высокоразвитых странах, в городах (реже в сельской местности) и при более высоком социально-экономическом статусе, что предполагает недостаточную экспозицию к инфекционным агентам. Такой высокий уровень заболеваемости, дебют в раннем детском возрасте, зачастую непрерывно рецидивирующее течение патологического процесса, тенденция к увеличению устойчивых к традиционной терапии форм заболевания придают вопросам детализации патогенеза АД особую актуальность. Одна из главных ролей в патогенезе АД принадлежит цитокинам. В данной статье представлена и систематизирована основная имеющаяся на сегодняшний день информация об участии цитокинов в патогенезе АД. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 16–21.)

Ключевые слова: атопический дерматит, иммунопатогенез, цитокины.

Кожные болезни чрезвычайно многообразны по клиническим проявлениям. За последние десятилетия резко возросла заболеваемость ими среди детского населения [1, 2]. Атопический дерматит (АД) наблюдается у 15–20 % всех детей в возрасте от 6 до 10 лет. Слабо выраженные признаки заболевания могут наблюдаться в течение первых нескольких месяцев жизни, и почти у 60 % пациентов заболевание проявляется к первому году жизни. Остальная треть детей заболевает в возрасте от года до 5 лет [17]. С кожными заболеваниями приходится сталкиваться врачам всех клинических специальностей. Необходимо учитывать, что кожные проявления нередко служат отражением изменений важнейших органов и систем, патологии внутренних органов, централь-

ной нервной, эндокринной, иммунной систем, нарушений адаптационных механизмов организма [4]. АД — мультифакториальное воспалительное заболевание кожи, характеризующееся зудом, хроническим рецидивирующим течением и возрастными особенностями локализации и морфологии очагов поражения [6].

В семьях, имеющих аллергический ринит или астму в анамнезе, почти у трети детей можно ожидать развития кожных очагов АД. И, наоборот, у трети пациентов с АД отмечается аллергический ринит или астма в личном анамнезе, а у двух третей — семейный анамнез этих заболеваний. У половины детей с проявлениями дерматологического заболевания в младенческом и детском возрасте впоследствии развиваются аллергические респираторные симптомы [23]. Сильный зуд приводит к глубоким экскориациям на коже, которые кровоточат, мокнут и поражаются вто-

Побежимова Ольга Олеговна, e-mail: fashionprinces@mail.ru

ричной инфекцией. После заживления таких глубоких эксориаций остается очаг рубцовой ткани. Хотя эмоциональный стресс не вызывает АД, он часто ухудшает течение заболевания [11]. Пациенты с АД нередко реагируют на фрустрацию, беспокойство или другие стрессовые события усилением зуда и расчесов. В некоторых случаях расчесы становятся привычным явлением. Также следует учитывать и роль психосоматических расстройств, обусловленных врожденными и приобретенными нарушениями нервной системы. Неврологические нарушения выявляются у 55–70 % детей, страдающих АД [9]. Пациентам, испытывающим влияние эмоциональных провоцирующих факторов и психологических проблем, осложняющих течение их заболевания, рекомендуется консультация психолога. АД отрицательно влияет на жизнь в семье и значительно снижает уровень качества этой жизни [3]. У взрослого пациента существуют ограничения в выборе профессии, трудности в психосоциальной адаптации, занятиях спортом, хобби, дружеских отношениях, выборе половых партнеров. Даже для очень маленьких детей жизненный опыт сводится к постоянному зуду, стрессам и нарушениям сна. Дети подросткового возраста нередко плохо учатся из-за постоянного недосыпания, их социальная дезадаптация обусловлена низкой самооценкой и отсутствием уверенности в себе [2]. Для семьи больной ребенок — это дополнительные расходы на лечение, ограничения в возможности устройства ребенка в детский сад, трудности в организации питания, семейного отдыха, устройства на работу матери, бытовые сложности, психологическое напряжение в семье. Релаксация, изменение привычного поведения и методы, основанные на биологической обратной связи, могут помочь пациентам с привычным зудом [22].

В патогенезе АД важную роль играет наследственная детерминированность, приводящая к нарушению состояния кожного барьера, дефектам иммунной системы, гиперчувствительности к аллергенам и неспецифическим раздражителям, колонизации патогенными микроорганизмами, а также дисбалансу вегетативной нервной системы с повышением продукции медиаторов воспаления [13].

АД — одно из наиболее распространенных заболеваний (от 20 до 40 % в структуре кожных заболеваний), встречающееся во всех странах у лиц обоих полов. Заболеваемость АД за последние 16 лет возросла в 2,1 раза [16]. Распространение АД среди детского населения составляет до 20 %, среди взрослого населения — 1–3 %. Согласно данным Федерального статистического наблюдения, в 2014 г. в Российской Федерации заболеваемость АД составила 230,2 случая на 100 000 населения, а распространенность — 443,3 случая

на 100 000 всего населения [21]. Среди детей в возрасте от 0 до 14 лет заболеваемость АД составила 983,5 случая на 100 000 соответствующего населения, а распространенность — 1 709,7 случая на 100 000 всего населения. Заболеваемость АД среди детей в возрасте от 15 до 17 лет Российской Федерации составила 466,6 случая на 100 000 соответствующего населения, распространенность — 1 148,3 случая на 100 000 соответствующего населения [9].

АД развивается у 80 % детей, оба родителя которых страдают этим заболеванием, и более чем у 50 % детей — когда болен только один родитель, при этом риск развития заболевания увеличивается в 1,5 раза, если больна мать. У 20–43 % детей с АД в последующем развивается бронхиальная астма и вдвое чаще — аллергический ринит [15].

Такой высокий уровень заболеваемости, дебют в раннем детском возрасте, зачастую непрерывно рецидивирующее течение патологического процесса, тенденция к увеличению устойчивых к традиционной терапии форм заболевания придают вопросам детализации патогенеза АД особую актуальность [5].

Патогенез АД не выяснен до конца, предположительно, инициатором воспалительного каскада являются несколько факторов. Однако имеющиеся данные указывают на то, что одна из главных ролей в патогенезе АД принадлежит цитокинам [10].

Цитокины представляют собой эволюционно древнюю систему полипептидных молекул, регулирующих многие жизненно важные физиологические процессы в организме, защитные реакции против патогенов и восстановление гомеостаза, нарушенного любыми причинами, включая биологические, химические и физические факторы [14].

Смысл существования данной системы — организация взаимодействия между клетками различного происхождения и с разными функциональными свойствами на местном и системном уровне. Например, в случае ответа на патогены это необходимо для формирования и оптимизации единой защитной реакции, где участвуют многие клетки, ткани и органы, не относящиеся только к иммунной системе [7].

Многочисленные исследования последних лет убедительно продемонстрировали роль цитокинов в индивидуальном развитии, выполнении многих физиологических функций, участии в формировании и регуляции защитных реакций против патогенов и восстановлении после травм [20]. В то же время выяснилось, что цитокины, будучи главными медиаторами иммунной системы, участвуют в патогенезе всех без исключения аутоиммунных, аутовоспалительных, аллергических заболеваний, объединенных понятием иммуновоспалительные заболевания. Таким обра-

зом, цитокины предстали медиаторами большинства социально значимых заболеваний человека [24].

Характер действия провоспалительных цитокинов в организме зависит от их концентрации. Если уровни цитокинов превышают физиологические концентрации, они становятся уже не медиаторами защиты, а медиаторами развития патологии при иммуновоспалительных процессах, а при сепсисе — иногда даже медиаторами смерти [27]. Эндогенные цитокины могут вызывать симптомы патологических изменений и оказывать повреждающее действие на ткани и органы, как это происходит при сепсисе, а также при аутоиммунном и аллергическом воспалении [18]. В связи с этим сформировалось целое направление терапии, названное антицитокиновой терапией, для блокирования биологической активности цитокинов. В отдельных случаях это дает очень хороший терапевтический эффект, например, при ревматоидном артрите, псориазе и ряде других иммуновоспалительных заболеваний [30].

По-видимому, цитокиновая теория развития патологии при болезнях человека несколько смещает акценты в правильном понимании истинной роли цитокинов как незаменимых регуляторов основных физиологических процессов в организме. В последние годы это подтверждено при изучении последствий генетических дефектов в системе цитокинов у человека [26]. Большинство наследственных дефектов генов цитокинов и их рецепторов приводит к нарушениям ответа на те или иные инфекции. В то же время описаны генетические нарушения, связанные с повышенной продукцией отдельных цитокинов, приводящие к гиперактивации иммунной системы и к развитию стерильного воспаления, лихорадки. Последнее указывает на абсолютную зависимость эффектов цитокинов от их концентраций в циркуляции и тканях. Исходя из этого, следует рассматривать роль цитокинов при каждом конкретном иммунопатологическом процессе и на этом основывать индивидуальные подходы к назначению цитокиновой либо антицитокиновой терапии [25].

В ряде случаев при недостаточной выработке эндогенных цитокинов их генноинженерные препараты могут быть использованы для заместительной терапии, однако в случае гиперпродукции цитокинов следует блокировать их избыточный синтез [36]. В связи с этим существует два принципиальных варианта применения цитокинов в клинической практике:

- 1) цитокиновая терапия, направленная на замещение недостатка эндогенных цитокинов либо на усиление их биологического действия;
- 2) антицитокиновая терапия для блокирования биологической активности эндогенных цитокинов, синтезируемых в избытке при острых и хро-

нических воспалительных процессах, в том числе при раке, аутоиммунных и аллергических заболеваниях.

Оба направления активно развиваются, и есть прекрасные примеры высокой эффективности лечебного применения эритропоэтина, интерферонов и других цитокинов для лечения различных заболеваний, а, с другой стороны, успешности антицитокиновой терапии для лечения аутоиммунных, аутовоспалительных и аллергических состояний [31].

Цель статьи — представить и систематизировать информацию об участии цитокинов в патогенезе АД.

По мнению Скрипкина Ю.К., АД сопровождается снижением экспрессии DR-антигенов на моноцитах при одновременном повышении количества Т-лимфоцитов, несущих на поверхности мембран эти же антигены [25]. При этом степень экспрессии DR-антигенов зависит от тяжести клинических проявлений [40]. Одновременно больным АД свойственно изменение иммунитета, проявляющееся дисфункцией факторов гуморального и клеточного иммунитета и сопровождающееся уменьшением числа циркулирующих Т-лимфоцитов, увеличением числа эозинофилов, лейкоцитов, снижением уровней IgM и IgA при резком увеличении IgG и IgE в крови. Это приводит к развитию кожных инфекций [17].

Углубленными исследованиями Тороповой Н.П. и Синявской О.А. убедительно продемонстрирована у детей роль врожденной, генетически опосредованной ферментопатии желудочно-кишечной системы, создающей состояние выраженной эндогенной интоксикации [37]. На этом фоне возникают нейроэндокринные расстройства, патологическое состояние калликреин-кининовой системы, изменение синтеза защитных антител. Особенно изменяется функция Т-супрессоров. Эти клетки, регулируя функцию В-лимфоцитов, ингибируют гиперпродукцию IgE. Реагинам (IgE антителам) отводится ведущая роль в развитии аллергического АД. Одновременное изменение активности Т- и В-лимфоцитов у больных АД трактуется как изменение гомеостатического контроля на нескольких уровнях саморегуляции — молекулярном, клеточном, центральном [19].

В соответствии с гипотезой Д. Сцентивани, объяснявшей атопию как болезнь, связанную с нарушением процессов управления функциями метаболизма в клетках, или как болезнь нарушенной фармакологической реактивности, полагают, что именно генетически обусловленная ферментопатия желудочно-кишечного тракта неотвратимо изменяет сложную патологическую реактивность всех жизнеобеспечивающих систем [9].

Согласно Федеральным клиническим рекомендациям по дерматовенерологии от 2015 г., в пато-

генезе АД важную роль играет наследственная детерминированность, приводящая к нарушению состояния кожного барьера, дефектам иммунной системы (стимуляция Th2-клеток с последующей гиперпродукцией IgE), гиперчувствительности к аллергенам и неспецифическим раздражителям, колонизации патогенными микроорганизмами, а также дисбалансу вегетативной нервной системы с повышением продукции медиаторов воспаления [21].

По мнению Хаитова Р.М., патогенез АД многокомпонентный, хотя главную роль в развитии заболевания играют иммунные нарушения. В основе лежит хроническое аллергическое воспаление кожи [23]. Пусковой механизм иммунного ответа при АД — взаимодействие аллергенов с IgE-антителами на поверхности тучных клеток и базофилов. Помимо пищевых и аэроаллергенов, среди которых наибольшее значение имеют клещи домашней пыли, IgE-ответ могут инициировать суперантигены *Staphylococcus aureus*, а также грибы *Malassezia* и *Candida spp.* и аутоантигены [29]. Ведущий иммунопатологический механизм развития АД состоит в двухфазном изменении соотношения лимфоцитов Th1/Th2. В острую фазу происходит активация Th2-клеток, приводящая к образованию большого количества IgE-антител. Хроническая фаза заболевания характеризуется преобладанием Th1-ответа. Важную роль в развитии АД отводят дефекту врожденного иммунного ответа, в частности нарушению функции эпидермального барьера, синтеза противомикробных пептидов, а также миграции нейтрофилов. В развитии хронического воспаления принимает участие IgE-аутореактивность, т. е. IgE-ответ против белков собственных тканей [12].

Согласно исследованию сотрудников Сибирского государственного медицинского университета Загрешенко Д.С., Климова В.В., Денисова А.А., Саликова Т.И., Фирсова Е.К. выяснилось, что разнонаправленный характер колебаний исследуемых цитокинов в бесклеточной фракции эксудатов «кожного окна» при АД отражает вовлечение разных иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов в патологический процесс. В целом поляризация Т-хелперов в сторону повышения функциональной активности Th2 в остром периоде и некоторое снижение активности Th2 в периоде ремиссии соответствует классическим представлениям об иммунопатогенезе atopического воспаления [10]. При этом функционирование субпопуляции Т-регуляторных клеток (Tr1) синергично Th2-клеткам, а активность субпопуляции Th1 — Th17-клеткам.

В соответствии с мнением Donald Y. и др. (2012), воспаление atopической кожи сопровождается локальной экспрессией провоспалительных цитокинов и хемокинов. Цитокины — такие как фак-

тор некроза опухоли альфа (TNF α) и интерлейкин 1 (IL-1) из резидентных клеток (кератиноцитов, тучных клеток, дендритных клеток) — связываются с рецепторами на сосудистом эндотелии и активируют клеточные сигнальные пути, что приводит к индукции молекул адгезии на клетках сосудистого эндотелия. За этим следует экстравазация воспалительных клеток в кожу. После инфильтрации воспалительных клеток в кожу они реагируют на хемотактические сигналы, которые поступают из участков травмы или инфекции [8].

При остром АД наблюдается выработка цитокинов Т-хелперами типа 2 (Th2), а именно IL-4 и IL-13, которые опосредуют переключение изотипа иммуноглобулина на синтез IgE и стимулируют экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках. В отличие от этого, IL-5 участвует в развитии и выживании эозинофилов и преобладает при хроническом АД [33]. Важная роль, которую цитокины Th2 играют в воспалительном ответе кожи, подтверждается тем фактом, что у трансгенных мышей с врожденной избыточной экспрессией IL-4 развиваются воспалительные зудящие кожные очаги, напоминающие АД, что подтверждает критическую роль при этом заболевании локальной экспрессии в коже цитокинов Th2. В сенсibilизированной к аллергену коже мышей с дефицитом IL-5 эозинофилы не определяются, а ее толщина уменьшена. В то же время кожа мышей с дефицитом IL-4 имеет нормальную толщину кожных слоев, но количество эозинофилов в ней снижено [28]. Сообщается, что повышенное производство при АД колониестимулирующего фактора гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF) тормозит апоптоз моноцитов, способствуя, таким образом, персистенции АД. Поддержанию хронического АД способствует также выработка Th1-подобных цитокинов IL-12 и IL-18 и еще нескольких цитокинов, связанных с ремоделированием, в том числе IL-11 и трансформирующего фактора роста TGF β 1 [34].

Продуцируемый кератиноцитами специфический кожный СС-хемокин CCL27 привлекает в кожу CLA⁺ Т-клетки памяти (Т-клетки, имеющие cutaneous lymphocyte associated antigen, т. е. «антиген, ассоциированный с лимфоцитами, тропными к коже»), воздействуя на рецептор CCR10 Т-клеток. И хемокин CCL27, и рецептор CCR10 индуцируются цитокинами IL-1 и TNF α и максимально активны при АД [30]. CLA-позитивные Th2, осуществляющие хоуминг в кожу, несут также рецептор CCR4, который обеспечивает их избирательное привлечение в кожу, связывается с хемокином CCL17. CCL17 (он же TARC — thymus and activation regulated chemokine — хемокин, регулируемый тимусом и активацией) продуцируется кожными дендритными клетками,

В-лимфоцитами и другими клетками, он экспрессируется на сосудистом эндотелии кожных венул за счет трансэндотелиального транспорта, что обеспечивает роллинг, экставазацию и поступление в зону кожного воспаления CCR4⁺ Th2-лимфоцитов. Тяжесть заболевания АД коррелирует с уровнем цитокина CCL17/TARC у больных [35]. При хроническом АД, кроме того, такие индуцируемые интерфероном гамма цитокины, как фракталкин, белок-10 и монокин, интенсивно стимулируются в кератиноцитах, что приводит к миграции клеток Th1 в эпидермис [32, 33].

Усиленная экспрессия хемокинов CC, белка-4 — хемотаксанта макрофагов и RANTES — способствует инфильтрации макрофагов, эозинофилов и Т-клеток как в острые, так и в хронические кожные очаги АД [39].

Выводы

1) Атопический дерматит — аллергическое заболевание кожи, возникающее, как правило, в раннем детском возрасте у лиц с наследственной предрасположенностью к атопическим заболеваниям, имеющее хроническое рецидивирующее течение, возрастные особенности локализации и морфологии очагов воспаления, характеризующееся кожным зудом и обусловленное гиперчувствительностью как к аллергенам, так и к неспецифическим раздражителям.

2) Высокий уровень заболеваемости, дебют в раннем детском возрасте, зачастую непрерывно рецидивирующее течение патологического процесса, тенденция к увеличению устойчивых к традиционной терапии форм заболевания прида-

ют вопросам детализации патогенеза атопического дерматита особую актуальность.

3) Многочисленные исследования последних лет убедительно продемонстрировали роль цитокинов в иммунопатогенезе атопического дерматита.

4) Согласно этим взглядам, эндогенные цитокины могут вызывать симптомы патологических изменений и оказывать повреждающее действие на ткани и органы.

5) У 75 % больных атопическим дерматитом детей состояние улучшается к 10–14 годам, у остальных оно может перейти в хроническое заболевание взрослого возраста. И чтобы была возможность остановить процесс развития тяжелого кожного заболевания в раннем детском младенческом возрасте, необходимо уделить пристальное внимание изучению детализации иммунопатогенеза атопического дерматита.

Все авторы принимали участие в разработке концепции, дизайне исследования и написании рукописи.

Все авторы одобрили окончательный вариант рукописи.

Побежимова О.О. — сбор информации по теме «Цитокины в патогенезе атопического дерматита» в многочисленных российских и международных научных источниках.

Жестков А.В. — проверка собранной информации на предмет актуальности и научной новизны.

Лямин А.В. — редактирование стиля изложения информации в тексте статьи.

Протасов А.Д. — перевод текста с русского на английский язык, редактирование статьи.

Козлова О.С. — подготовка и анализ источников литературы по иммунным нарушениям при атопическом дерматите.

Кулагина О.В. — участие в разработке концепции, дизайне обзора и написании рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

- Адо А.Д. Общая аллергология. М.: Медицина, 1978. 464 с.
Ado A.D. [General Allergology]. Moscow: Meditsina, 1978. 464 p. Russian.
- Аллергические заболевания у детей: клиника, диагностика, терапия // Новосибир. гос. мед. ун-т. Новосибирск. 2012. С.43 с.
[Allergic diseases in children: clinic, diagnosis, therapy] // Novosibirsk State Medical University. Novosibirsk, 2012. 43 p. Russian.
- Булина О.В., Горланов И.А., Калинина Н.М. Параметры цитокинового звена иммунитета у детей старшего возраста при атопическом дерматите // Аллергология. 2004. № 1. С. 27–30.
Bulina O.V., Gorlanov I.A., Kalinina N.M. [Parameters of cytokine immunity in older children with atopic dermatitis] // Allergologia. 2004. № 1. P. 27–30. Russian.
- Бурместер Р., Пецутто А. Наглядная иммунология. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 320 с.
Burmester R., Pezutto A. [Visual Immunology]. Moscow: BINOM. Laboratory of knowledge. 2009. 320 p. Transl. into Russian.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
Glantz S. [Biomedical Statistics]. Moscow: Praktika, 1999. 459 p. Russian.
- Гомберг М.А., Соловьев А.М., Аковбян В.А. Атопический дерматит // Российский медицинский журнал. 1998. Т. 6. № 20. С. 63–66.
Gomberg M.A., Soloviev A.M., Akovbyan V.A. [Atopic dermatitis] // Rossiiskii Meditsinskii Zhurnal. 1998. Vol. 6. № 20. P. 63–66. Russian.
- Градинаров А.М., Топорищев Ю.А., Беглянина О.А. Цитокины и реакины в сыворотке крови у детей с атопическим дерматитом в раннем возрасте // Аллергология и иммунология. 2007. Т. 8. № 1. С. 68–72.
Gradinarov A.M., Toporishchev Yu.A., Beglyanina O.A. [Cytokines and reagins in the blood serum of children with atopic dermatitis at an early age] // Allergologia i Immunologia. 2007. Vol. 8. № 1. P. 68–72. Russian.
- Дерматология Фицпатрика в клинической практике. В 3 т. / Клаус Вольф, Лоуэлл А. Голдсмит, Стивен И. Кац и др.; пер. с англ.; общ. ред. акад. А.А. Кубановой. М.: Издательство Панфилова; Лаборатория знаний, 2012. Т. 1. 868 с.
[Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine]: 2 vol. set. 8th Edition. Eds.: A. Goldsmith, S.I. Katz, B.A. Gilchrest, A.S. Paller, D.J. Leffell, K. Wolff. New York: McGraw-Hill Education/Medical. English. Transl. into Russian.
- Детская дерматовенерология: учеб. для студ. учреждений высш. мед. проф. образования // Под ред. И.А. Горланова. М.: Издательский центр «Академия». 2012. 352 с.
[Pediatric Dermatovenereology: A textbook for students of institutions of higher medical professional education] // Ed. I.A. Gorlanov. Moscow: Publishing Center "Akademia", 2012. 352 p. Russian.
- Загрешенко Д.С., Климов В.В., Денисов А.А., Саликова Т.И., Фирсова Е.К. Цитокины «кожного окна» при атопическом дерматите // Бюллетень сибирской медицины. 2009. № 3. Р. 32–36.
Zagreshenko D.S., Klimov V.V., Denisov A.A., Salikova T.I., Firsova E.K. [Skin window cytokines in atopic dermatitis] // Bulletin of Siberian Medicine. 2009. № 3. P. 32–36. Russian.
- Земсков А.М., Земсков В.М., Караулов А.В. Клиническая иммунология: учебник для вузов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 432 с.
Zemskov A.M., Zemskov V.M., Karaulov A.V. [Clinical Immunology: a textbook for universities]. Moscow: GEOTAR-Media, 2008. 432 p. Russian.

12. *Иммунологические методы*. Под ред. Г. Фримеля. М.: Медицина, 1987. 472 с. [Immunological Methods]. Ed. G. Frimel. M.: Meditsina, 1987. 472 p. German. Transl. into Russian.
13. Караулов А.В., Быков С.А., Быков А.С. Иммунология, микробиология, иммунопатология кожи. М.: БИНОМ, 2012. 328 с. Karaulov A.V., Bykov S.A., Bykov A.S. [Immunology, Microbiology and Immunopathology of the Skin]. Moscow: BINOM, 2012. 328 p. Russian.
14. Козн Б.А. Педиатрическая дерматология. Пер. с англ.; под ред. Н.М. Шаровой. М.: МЕДпресс-информ, 2015. 424 с. Cohen B.A. Pediatric Dermatology. 4th Edition. Elsevier Inc., 2013. 290 p. Engl. Transl. into Russian.
15. Магарадзе Д.Ш. Атопический дерматит: новые цели терапии // Вопросы современной терапии. 2014. Т. 13. № 4. С. 70–73. Magaradze D.Sh. [Atopic dermatitis: new goals of therapy] // Voprosy Sovremennoi Terapii. 2014. Vol. 13. № 4. P. 70–73. Russian.
16. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник // Под ред. В.В. Зверева, А.С. Быкова. М.: Медицинское информационное агентство, 2016. 816 с. [Medical Microbiology, Virology and Immunology: A Textbook] // Eds. V.V. Zverev, A.S. Bykov. Moscow: Meditsinskoe Informatsionnoe Agentstvo, 2016. 816 p. Russian.
17. Музачева Н.Б. Атопический дерматит // Аспирантский вестник Поволжья. Медицина. 2014. № 1–2. С. 118–122. Migacheva N.B. [Atopic dermatitis] // Aspirantskii Vestnik Povolzh'ia. Meditsina. 2014. № 1–2. P. 118–122. Russian.
18. Сергеев Ю.А. Атопический дерматит. Современные подходы к диагностике, терапии и профилактике // Медицина для всех. 2001. № 2. С. 2–8. Sergeev Yu.A. [Atopic dermatitis. Modern approaches to diagnosis, therapy and prevention] // Meditsina dlia Vsekh. 2001. № 2. P. 2–8. Russian.
19. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с. Simbirtsev A.S. [Cytokines in the Pathogenesis and Treatment of Human Diseases]. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p. Russian.
20. Система цитокинов: теоретические и клинические аспекты // Под ред. В.А. Козлова, С.В. Сенникова. Новосибирск: Наука, 2004. 324 с. [The System of Cytokines: Theoretical and Clinical Aspects] // Ed. V.A. Kozlov, S.V. Sennikov. Novosibirsk: Nauka, 2004. 324 p. Russian.
21. Скрипкин Ю.К. Кожные и венерические болезни. Учебник для врачей и студентов медицинских ВУЗов. М.: Триада-фарм, 2005. 688 с. Skripkin Yu.K. [Skin and Venereal Diseases. A Textbook for Doctors and Students of Medical Universities]. Moscow: Triada-farm, 2005. 688 p. Russian.
22. Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. 5-е изд. М.: Деловой экспресс, 2016. 768 с. [Federal Clinical Guidelines. Dermatovenereology 2015: Diseases of the Skin. Sexually Transmitted Infections]. 5th Ed. Moscow: Delovoi Ekspress, 2016. 768 p. Russian.
23. Хаитов Р.М. Иммунология: учебник. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2016. 496 с. Khaitov R.M. [Immunology: a Textbook]. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 496 p. Russian.
24. Шамов Б.А. Атопический дерматит: клинические проявления и лечение // Дневник казанской медицинской школы. 2014. Т. 1. № 4. С. 63–65. Shamov B.A. [Atopic dermatitis: clinical manifestations and treatment] // Dnevnik Kazanskoi Meditsinskoi Shkoly. 2014. Vol. 1. № 4. P. 63–65. Russian.
25. Basketter D.A., Bremner J.N., Buckley P., Kammüller M.E., Kawabata T., Kimber I., Loveless E., Magda S., Stringer D.A., Vohr H.-W. Pathology considerations for and subsequent risk assessment of chemicals identified as immunosuppressive in routine toxicology // Food Chem. Toxicol. 1995. Vol. 33. № 3. P. 239–243.
26. Beckmann M.P., Cosman D., Fanslow W., Maliszewski C.R., Lyman S.D. The interleukin-4 receptor: structure, function and signal transduction // Chem. Immunol. 1992. Vol. 51. P. 107–134.
27. Block M., Maurer M., Goergen K., Kalli K.R., Erskine C.L., Bechrens M.D., Oberg A.L., Knutson K.L. Plasma immune analytes in patients with epithelial ovarian cancer // Cytokine. 2015. Vol. 73. № 1. P. 108–113.
28. He X., Smirnova I., Poltorak A., Liu MY., Van Huffel C., Du X., Birdvell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene // Science. 1998. Vol. 282. № 5396. P. 2085–2088.
29. Homey B., Steinhoff M., Ruzicka T., Leung D.Y. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation // J. Allergy Clin. Immunol. 2006. Vol. 118. № 1. P. 178–189.
30. Kalavala M., Dohil M.A. Calcineurin inhibitors in pediatric atopic Dermatitis: a review of current evidence // Am. J. Clin. Dermatol. 2011. Vol. 12. № 1. P. 15–24.
31. Klunker S., Trautmann A., Akdis M., Verhagen J., Schmid-Grendelmeier P., Blaser K., Akdis C.A. A second step of chemotaxis after transendothelial migration: keratinocytes undergoing apoptosis release IFN-gamma-inducible protein 10, monokine induced by IFN-gamma, and IFN-gamma-inducible alpha-chemoattractant for T cell chemotaxis toward epidermis in atopic dermatitis // J. Immunol. 2003. Vol. 171. № 2. P. 1078–1084.
32. Mantovani A., Bussolino F., Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bed side // Immunol. Today. 1997. Vol. 18. № 5. P. 231–239.
33. Munn L. Cancer and inflammation // Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. 2017. Vol. 9. № 2. P. 1370. doi: 10.1002/wsbm.1370.
34. Novak N., Simon D. Atopic dermatitis – from new pathophysiologic insights to individualized therapy // Allergy. 2011. Vol. 66. № 7. P. 830–839. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02571.x.
35. Oppenheim J., Feldman M. (Eds) Cytokine Reference. London: Academic Press, 2000. 2015 p.
36. Pulendran B., Cumar P., Cutler C., Christopher W., Mohamadadzad M., van Dyke T., Banchereau J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo // J. Immunol. 2001. Vol. 167. № 9. P. 5067–5076.
37. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm // Immunol. Today. 1997. Vol. 18. № 6. P. 263–266.
38. Smart J.M., Kemp A.S. Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease // J. Clin. Exp. Allergy. 2002. Vol. 32. № 5. P. 796–802.
39. Toda M., Leung D.Y., Molet S., Boguniewicz M., Taha R., Christodoulopoulos P., Fukuda T., Elias J.A., Hamid Q.A. Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions // J. Allergy Clin. Immunol. 2003. Vol. 111. № 4. P. 875–881.
40. van Beelen A.J., Teunissen M.B., Kapsenberg M.L., de Jong E.C. IL-17 and immune pathology in the skin // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2007. Vol. 7. № 5. P. 374–381.

Role of cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis

O.O. Pobezhimova, A.V. Zhestkov, O.S. Kozlova,
A.V. Lyamin, A.D. Protasov, V.V. Kulagina
Samara State Medical University, Samara

Atopic dermatitis (AD) is one of the most common allergic diseases with severe course which affects the skin. This disease is genetically determined and has a chronic course. AD is also one of the commonest diseases (between 20 and 40 % of all skin disorders) and affects patients of both sexes across the globe. Such high rate of morbidity, onset in early childhood, often continuous relapsing course and a trend toward gradual increase of tolerance to traditional therapies make the issue of detalization of AD pathogenesis of particular importance. Cytokines play one of the major roles in the pathogenesis of AD. This article provides a systematic overview of the main information currently available on participation of cytokines in the pathogenesis of AD. (Cytokines and Inflammation. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 16–21.)

Key words: atopic dermatitis, immunopathogenesis, cytokines.

Нарушения иммунного гомеостаза в возрастном аспекте

Е.В. Голубкина, М.Н. Тризно

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Астрахань

Наряду с репаративными процессами в тканях, регуляция клеточного старения занимает одно из центральных мест среди гомеостатических реакций организма. Зачастую старение сопровождается накоплением так называемых сенесцентных клеток (СК), «замороженных» в фазе G₀/G₁ клеточного цикла. Старение клеток иммунной системы имеет особое значение. Иммунные СК в некоторой степени используют специфический секреторный фенотип (senescence associated secretory phenotype (SASP)) для контроля развития и заживления тканей на протяжении онтогенеза. Но, преодолев физиологический порог, SASP оказывает плейотропное действие на активность иммунных клеток, их фенотип, активацию и дифференциацию. Иммунные клетки врожденного и адаптивного иммунитета участвуют в устранении СК. Вероятно, в большей степени за специфическую элиминацию ответственны NK-клетки, хотя их активность может модулироваться другими клетками, такими, как макрофаги, CD8⁺ Т-лимфоциты. Результат работы этих клеток может быть противонаправлен относительно друг друга. В целом, имеет значение тот факт, что накопление СК провоцирует возрастзависимую патологию. Цель данной работы — представить современный широкий взгляд на клеточное старение, особенности, происходящие на этом фоне в иммунной системе, и их гомеостатическую роль на протяжении всей жизни. Данный обзор посвящен механизмам взаимодействия не только между сенесцентными и иммунными клетками, но и между разными типами иммунных клеток. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 22–27.)

Ключевые слова: сенесцентные клетки, SASP, макрофаги, лимфоциты, старение, иммунная регуляция, возрастзависимая патология.

Клеточное старение — это биологический процесс с положительным или негативным воздействием в зависимости от условий. Эти эффекты обусловлены не только прямым взаимодействием между стареющими клетками и их микроокружением, но также зависят от специфического секреторного фенотипа (senescence associated secretory phenotype (SASP)), вырабатываемого так называемыми сенесцентными клетками (СК) [36, 38]. К факторам SASP относят интерлейкины (IL) (IL-6, -8, -2, -1β, -10), фактор некроза опухоли α (TNFα), интерферон γ (IFNγ), тканевой активатор плазминогена, ингибитор активации плазминогена

1-го типа, простагландин E2 и другие элементы. Компоненты данного секреторного фенотипа вызывают все больший интерес научного сообщества в связи с их множественными эффектами, часто противоположного характера [5, 22]. Учитывая значительное влияние накапливающихся СК в организме не только с возрастом при старении, но и при формировании раковых опухолей, важно сосредоточиться на процессе ликвидации первоисточника [5, 8, 10]. Понимание механизма идентификации компонентов SASP поможет не только раскрыть, каким образом СК специфически распознаются иммунными клетками, но также, с какими клеточными регуляторами они взаимодействуют [39, 43]. Таким образом, станет возмож-

Голубкина Екатерина Валерьевна, e-mail: neiron-2010@mail.ru

ным понимание, какой механизм позволяет СК избегать элиминации, осуществляемой макрофагами (Мф), с тем, чтобы в будущем иметь возможность регулировать его для задержки осложнений или восстановления функций органов у пожилых людей или у пациентов с хроническими иммунодегенеративными нарушениями.

Сенесценция

Свое название СК получили от латинского «senescere», что означает «стареть». Довольно длительное время весьма популярна была теория Л. Хейфлика о существовании лимита деления у здоровых фибробластов человека, которую он выдвинул на основании исследований *in vitro* [17]. Менее десяти лет назад научное сообщество на почве экспериментальной демистификации феномена старения получило интересные данные о СК, которые зачастую формируются с возрастом [32, 35]. Кроме непосредственного участия в процессах старения, данные клетки играют значительную роль в канцерогенезе и развитии возрастзависимых заболеваний, таких как остеоартроз, цирроз печени и атеросклероз. Остановленные в процессе клеточного цикла, они не подвергаются апоптозу и сохраняют обменные процессы с микросредой [8, 18, 37]. Для СК характерны морфологические изменения. Так, в зависимости от триггера сенесценции (H-RASV12-, стресс-индуцированный, или вызванный повреждением ДНК), клетки могут становиться большими, плоскими или многоядерными, с обширной вакуолизацией [12].

Известно, что генный локус CDKN2A, кодирующий два неродственных протеина p16^{Ink4a} и p14/p19^{ARF} участвует в остановке клеточного цикла на стадии G₀/G₁, вызванной клеточным старением [16]. Важную роль СК в процессе старения показали Baker D.J. и др. на мышцах линии BubR1H/H; INK-ATTA. Они показали, что устранение p16^{Ink4a}-позитивных клеток у этих мышей задерживает появление фенотипов, связанных с такими патологиями, как катаракта, потеря жировой ткани и саркопения или замедляет их прогрессирование у мышей, уже страдающих от этих заболеваний [3].

Недавно были описаны новые функции СК. Во-первых, это участие в формировании конечностей у зародыша [7, 33]. В случае транзитного присутствия СК в организме кур, мышей и людей в определенный период эмбрионального развития говорят о защитном механизме у разных видов [33]. В этом контексте SASP играет значительную роль в ремоделировании тканей во время эмбрионального развития и, возможно, необходим для осуществления обменных процессов

между матерью и эмбрионом через гематоплацентарный барьер [40].

Во-вторых, секреторный фенотип участвует в восстановлении тканей организма [20]. Репаративным процессам, главным образом, способствует тромбоцитарный фактор роста AA (PDGF α), присутствующий в SASP. Именно по этой причине удаление СК у мышей путем лечения ганцикловиром замедляет репаративные процессы [39]. Эта связь между старением и восстановлением тканей также иллюстрируется накоплением сенесцентных гепатоцитов в печени мышей после воздействия на них четыреххлористым углеродом (CCl₄) при фиброзе. Печеночные СК в состоянии стимулировать разрешение фиброзного процесса, предотвращая накопление фиброзной ткани путем прекращения роста гепатоцитов, ответственных за внеклеточную матричную (матриксную) продукцию и привлечение иммунных клеток. Принцип иммунного надзора охватывает не только контроль за патогенными агентами, но также и за предраковыми клетками [22].

Врожденный иммунитет — это первая линия защиты организма. Он объединяет различных участников, способных осуществлять фагоцитоз, прямую элиминацию или презентацию антигена: Мф, натуральные киллеры (NK), дендритные клетки, моноциты, тучные клетки и гранулоциты (базофилы, нейтрофилы и эозинофилы) [31].

С годами СК накапливаются и способствуют развитию болезней, связанных со старением. Само собой разумеется, что этот дисбаланс между их появлением и устранением иммунными клетками достаточно хрупкий. Таким образом, чрезвычайно значимо определение причины этого дисбаланса.

Иммуносенесценция

Нарушение функций иммунной системы, связанное с процессом старения, называется иммуносенесценцией. Это может быть одной из причин накопления СК. Действительно, старение иммунной системы приводит к потере функции как адаптивного, так и врожденного иммунитета, хотя последний, по-видимому, меньше влияет на возрастные процессы [24]. Известно, что в процессе старения не только клетки, такие как субпопуляции лимфоцитов, имеют тенденцию меняться, но и органы, например, вилочковая железа. Этот первичный лимфоидный орган, позволяющий созреть наивным Т-клеткам, с возрастом уменьшается в размерах. Таким образом, данные изменения влияют на качество иммунного ответа [34].

Кроме изменения качественного соотношения, иммунные клетки могут подвергаться репликативной сенесценции в результате укорочения их

теломер по мере роста числа делений. Последний факт виден, например, в случае пролиферации CD8⁺ Т-клеток, вызванной презентацией антигенов. Эти иммунные СК будут экспрессировать типичные маркеры, такие как p16^{Ink4a}, которые заметно преобладают в Т-лимфоцитах периферической крови [1, 6].

НК, отвечающие за удаление стареющих клеток, по-видимому, также подвержены репликативному старению [29]. Существуют данные, что НК теряли свои цитотоксические способности с течением времени через снижение адгезии перфоринов на поверхности клеток-мишеней [41]. Потеря цитотоксичности сопутствует множеству заболеваний, связанных с SASP, таких как рак, остеоартрит, атеросклероз и сердечно-сосудистые заболевания [8, 18, 37]. Однако число циркулирующих НК выше у пожилых людей по сравнению с молодыми, что предполагает компенсаторный механизм организма на этом уровне. Похоже, что Мф тоже подвергаются негативным последствиям, порожденным СК, выраженным в заметном снижении их антибактериальных и антигенпрезентативных способностей [34].

Факторы SASP могут представлять собой терапевтическую альтернативу при хронических дегенеративных заболеваниях. Например, у пациентов с ревматоидным артритом была использована анти-TNF-терапия для восстановления экспрессии теломеразы в Т-лимфоцитах, что задерживало индуцированное артритом преждевременное старение этих клеток [28].

Иммунное игнорирование

Второе объяснение накопления СК с годами — это наличие СК, имеющих особые характеристики. Одним из примеров дисфункций в иммунной системе является нарушение процессов представления антигенов, таких, например, как антигены лейкоцитов человека (HLA) на мембране клеток [41]. Это нарушение может иметь различные механизмы, оказывающие влияние на презентацию антигенов в целом. Например, путем уменьшения эффективности тапазинов — носителей, связанных с антигенным представлением, и латентных мембранных белков — протеасом (LMP-2, LMP-7) [21, 38]. Это позволяет им не выявляться цитотоксическими Т-лимфоцитами. Секретция некоторых факторов также позволяет клеткам не быть замеченными иммунной системой. Таким образом, они могут способствовать ответу регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) за счет воспалительной реакции, включающей эффекторные Т-лимфоциты (Teff). Через секретцию хемокина CCL22 (C-C motif chemokine ligand 22) Treg привлекаются в опухолевое микроокружение, что подавляет иммунный ответ [15]. Секретция IL-10, трансформирующего

ростового фактора β и фактора роста эндотелия сосудов стимулирует реакции типа Th2 [13]. Кроме секреции противовоспалительных белков, накапливающиеся СК могут экспрессировать ингибирующие молекулы, действующие на мембраны иммунных клеток [15]. Так, особый интерес в последнее время был обращен к лигандам программированной смерти 1 (PDL-1), присутствующим на опухолевых клетках и взаимодействующим со своим рецептором PD-1 на Т-лимфоцитах [26].

Наконец, было показано, что некоторые опухолевые клетки могут реконструировать стромальное микроокружение, чтобы придать ему структуру, подобную структуре лимфоидной ткани. Этот механизм позволяет опухолевым клеткам быть защищенными ввиду того, что структура имеет значение для привлечения и поддержания активности Treg [42].

Удаление сенесцентных клеток

Преимущества, связанные с удалением СК, были выдвинуты лабораторией доктора Jan M. van Deursen на основании опытов с трансгенными мышами, имеющими ген INK-АТТАС. На этой модели СК, экспрессирующие p16^{Ink4a}, устранялись путем индукции апоптоза через введение лиганда AP20187. У таких мышей гораздо позднее развивались болезни, связанные со старением, такие как саркопения, катаракта, потеря жировой ткани. Кроме того, у них дольше сохранялся мышечный тонус. Доктором Baker D.J. было показано, что удаление СК у пожилых мышей замедляет дисфункцию органов, связанную со старением [3, 5].

Для того, чтобы изучить влияние СК в реальном контексте старения, а не на ускоренной модели, эта же группа ученых провела исследование на естественно стареющих мышцах, еще раз показав, что накопление СК связано с потерей жировой ткани, гломерулосклерозом, заболеваниями, связанными со снижением эффективности почки. Удаление p16^{Ink4a}-положительных СК, независимо от наличия опухолей, также способствовало увеличению продолжительности жизни мышей. Увеличенное количество кардиомиоцитов в желудочках показывало, что накопление СК связано со старением сердца. Этот факт приводил к поддержанию сердечной стрессоустойчивости путем сохранения уровня сердечных Sur2a, рецепторных субъединиц-регуляторов аденозинтрифосфат-зависимого калийного канала (K_{ATP}). В целом, эти животные имели более здоровый вид [3].

Учитывая негативные последствия, связанные с накоплением СК, особенно важно понимать, почему и как они накапливаются в тканях. Примечательно, что если удаление СК происходит слишком рано, организм не может использовать положительный эффект. Например, отмечается задерж-

ка репарации ткани, так как у нее нет времени на корректное участие в процессе посредством секреции тромбоцитарного фактора роста тромбоцитов α (platelet derived growth factor subunit A (PDGF-A) [43]. Понимание хронологии событий даст возможность удаления СК в нужное время.

Процессы, способствующие удалению сенесцентных клеток

Поверхностные лиганды

Ионизирующее излучение — стимул, способный вызывать появление СК, порождает избыточную экспрессию лигандов, которые могут быть распознаны иммунными клетками и удалены. Это, например, молекула ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), которая более сильно экспрессируется СК, чем пролиферирующими клетками. Этот поверхностный лиганд может быть распознан антигеном LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1), находящимся на поверхности НК [23].

Имеющимся у СК поверхностным рецепторам NKG2D соответствуют лиганды МНС I класса, такие как белки MICA и ULBP2. Данные молекулы распознаются НК, цитотоксическими CD8⁺ Т-клетками, гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клетками, подгруппой CD4⁺ Т-клеток, а также Мф [9].

Лишь недавно была продемонстрирована существующая связь между удалением СК и экспрессией NKG2D на НК и цитотоксических клетках [14, 27]. Было показано, что наличие на поверхности клеток-мишеней молекул MICA и ULBP2, являющихся лигандами NKG2D, способствует активации иммунных клеток, обладающих соответствующими рецепторами, но, как оказалось, ситуация не так проста. В действительности, лиганды NKG2D подвержены многочисленным транскрипционным, посттранскрипционным и посттрансляционным изменениям, которые могут модулировать их экспрессию. Например, они могут быть расщеплены матриксными металлопротеиназами, такими как ADAM10 или MMP-9, что снижает положительную роль этих лигандов [14, 25].

Как упоминалось ранее, SASP содержит матриксные металлопротеиназы, поэтому было бы интересно знать, оказывают ли они негативное влияние на экспрессию лигандов NKG2D, представленных на СК.

Обмен белками

Кроме специфического фенотипа и поверхностных лигандов СК используют межклеточный перенос белков (intercellular transfer of proteins (IPT)) для связи с иммунными клетками. Он действительно позволяет передавать сигналы соседним или отдаленным клеткам через мембранные протрузии, так называемые цитоплазматические

мости. Недостаточные по размеру для клеточных органелл, мосты обеспечивают межклеточный прямой обмен белками. Данные структуры отличаются достаточным разнообразием по форме и размеру [35]. Прямые взаимодействия с соседними клетками играют важную роль во влиянии, которое СК могут оказывать на свое микроокружение. В эпителиальные и раковые клетки действительно происходит перенос белков СК, что объясняет влияние СК на пролиферацию эпителиальных клеток и прогрессию опухоли. Как видим, этот тип межклеточных сообщений также может использоваться для связи с иммунными клетками, такими как НК [2].

Таким образом, могут использоваться различные механизмы для взаимосвязи СК с иммунными клетками и, следовательно, для устранения СК: поверхностные лиганды, секреция провоспалительных факторов и белковый обмен. Однако конкретные факторы, ответственные за удаление СК, по-прежнему недостаточно изучены. Есть данные, указывающие на роль отдельных типов иммунных клеток.

Макрофаги

Несомненно, Мф играют значительную роль в удалении СК. Активированные Мф традиционно подразделяют на провоспалительные M1, индуцированные интерфероном γ , лигандами Toll-подобного рецептора, и альтернативно активированные противовоспалительные Мф M2, индуцированные IL-4 и IL-13.

Снижение количества Мф влияет на качество иммунного надзора, так как эти клетки способны инфильтрировать стареющие ткани и накапливаться вблизи СК, экспрессируя p53, p21 и ген Hmga1 [38]. Причем роль новообразованных Мф более значима, нежели резидентных [30].

Секреция SASP способствует формированию M1 фенотипа. Причем в окружении клеток, не способных экспрессировать p53, снижается тенденция к образованию СК, а Мф дифференцируются преимущественно в M2 тип [36].

Интересно, что экспрессия Мф таких маркеров старения, как p16^{Ink4a} и p14/p19^{ARF}, взаимосвязана с направлением их поляризации в сторону M1 или M2 фенотипа. По последним данным, p16^{Ink4a}-индуцированный механизм клеточного старения имеет автономное значение для определения направления клеточной поляризации в ответ на воспалительный стимул [11].

Указанный механизм описан только для Мф, но заманчиво предположить, что и в других миелоидных клетках, например, дендритных, высокая экспрессия данных маркеров также может влиять на их воспалительный ответ в соответствующих условиях микроокружения.

Натуральные киллеры

Непосредственно в элиминации СК весомая роль отводится NK. Сначала было показано, что эти клетки инфильтрируют ткани, содержащие СК, и, подобно Мф, накапливаются в них [40]. НК для выполнения цитотоксической функции, направленной против СК, используют экзоцитоз [19, 37]. Задержка удаления опухолей у мышей с дефицитом лигандов NKG2D или лечение антителами к этим лигандам отлично демонстрирует значимость НК в этом процессе [36].

Интерфероны типа 1, вырабатываемые СК, также важны для их элиминации, поскольку они способствуют экспрессии лигандов NKG2D — MICA и ULBP2. Блокирование этих интерферонов снижает эффективность НК при удалении СК. Стоит отметить, что *in vitro* НК способны целенаправленно ориентироваться на СК, однако, в реакциях *in vivo* их поведение не всегда однозначно. В одних случаях истощение НК блокирующими антителами препятствует корректному удалению СК, в других же, кажется, не имеют никакого влияния на иммунный мониторинг [4].

Другие участники

Наряду с Мф и НК, другие типы иммунных клеток также участвуют в элиминации СК. Например, нейтрофилы, моноциты и дендритные клетки. Потеря функции нейтрофилов значительно задерживает регрессию опухоли после активации p53 [10].

По мере роста числа сенесцентных гепатоцитов наблюдается увеличение притока CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Похоже, что у мышей с истощенным CD4⁺ Т-клеточным пулом отсутствует иммунный надзор за СК. Эти CD4⁺ Т-лимфоциты имеют провоспалительную Th1 поляризацию, поскольку ни IL-4, ни IL-17 не обнаруживаются в спленocyтах этих мышей. Истощение CD4⁺ Т-клеток антите-

лами вызывает также развитие опухоли печени у мышей. Инъекция CD4⁺ Т-клеток животным с истощенным пулом CD4⁺ Т-клеток, Мф и НК недостаточна для 100%-го контроля за СК. Это показывает, что CD4⁺ Т-клетки, вероятно, являются вспомогательными, и для эффективного удаления СК необходим врожденный иммунитет [29].

Таким образом, накопление сенесцентных клеток в организме провоцирует хроническое воспаление и участвует в развитии заболеваний, связанных со старением, при этом иммунная система подвергается реорганизации. Наблюдается снижение функциональных возможностей лимфоидных клеток. Внутренние факторы, вызывающие старение, могут быть частью программы терминальной дифференцировки нескольких типов иммунных клеток, таких как мегакариоциты, Т-клетки и макрофаги. Несмотря на то, что известен способ распространения факторов SASP, секретируемых СК (с помощью ауто- и паракринной регуляции), механизм, лежащий в основе подавляющего эффекта старения Т-клеток остается неизвестным.

Элиминация сенесцентных клеток — сложный биологический процесс, включающий множество компонентов иммунной системы. Понятно, что за специфическое устранение сенесцентных клеток отвечают натуральные киллеры и CD8⁺ Т-лимфоциты. Известно также, что макрофаги играют некоторую роль в прямом уничтожении сенесцентных клеток. Тем не менее, сенесцентные клетки управляют функцией других клеток и способны регулировать собственную элиминацию, например, зависимость от натуральных киллеров.

Лучшее понимание механизмов элиминации сенесцентных клеток сможет помочь в разработке методов лечения, направленных на управление реакцией макрофагов в окружении SASP. Это будет способствовать упорядоченному разрешению повреждения тканей в контексте заболеваний, связанных со старением и приводящих к воспалению.

ЛИТЕРАТУРА

- Antonangeli F., Zingoni A., Soriani A., Santoni A. Senescent cells: Living or dying is a matter of NK cells // J. Leukoc. Biol. 2019. Vol. 105. № 6. P. 1275–1283.
- Ariazi J., Benowitz A., De Biasi V., Den Boer M.L., Cherqui S., Cui H., Douillet N., Eugenini E.A., Favre D., Goodman S., Gousset K., Hanein D., Israel D.I., Kimura S., Kirkpatrick R.B., Kuhn N., Jeong C., Lou E., Maillard R., Maio S., Okafo G., Oswald M., Pasquier J., Polak R., Pradel G., Rooij de B., Schaeffer P., Skeberdis V.A., Smith I.F., Tanveer A., Volkman N., Wu Z., Zurzolo C. Tunneling nanotubes and gap junctions—their role in long-range intercellular communication during development, health, and disease conditions // Front. Mol. Neurosci. 2017. Vol. 10. № 333. doi: 10.3389/fnmol.2017.00333.3.
- Baker D.J., Wijshake T., Tchikova T., LeBrasseur N.K., Childs B.G., B. Van de Sluis, Kirkland J.L., Van Deursen J.M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders // Nature. 2011. Vol. 479. № 7372. P. 232–236.
- Bassani B., Baci D., Gallazzi M., Poggi A., Bruno A., Mortara L. Natural killer cells as key players of tumor progression and angiogenesis: old and novel tools to divert their pro-tumor activities into potent anti-tumor effects // Cancers (Basel). 2019. Vol. 11. № 4. doi: 10.3390/cancers11040461.
- Bennett G.C., Hu Li, Van Deursen J.M. Senescent cells: a therapeutic target for cardiovascular disease // J. Clin. Invest. 2018. Vol. 128. № 4. P. 1217–1228.
- Cao Dinh H., Bautmans I., Beyer I., Onyema O.O., Liberman K., De Dobbeleer L., Renmans W., Vander Meeren S., Jochmans K., Delaere A., Knoop V., Njemini R. Six weeks of strength endurance training decreases circulating senescence-prone T-lymphocytes in cytomegalovirus seropositive but not seronegative older women // Immun. Ageing. 2019. Vol. 16. № 17. doi: 10.1186/s12979-019-0157-8.
- Castro M.E., Gujjarro del Valle M., Moneo V., Carnero A.J. Cellular senescence induced by p53-ras cooperation is independent of p21waf1 in murine embryo fibroblasts // Cell Biochem. 2004. Vol. 92. № 3. P. 514–524.
- Childs B.G., Baker D.J., Wijshake T., Conover C.A., Campisi J., Van Deursen J.M. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis // Science. 2016. Vol. 354. № 6311. P. 472–477.
- Chitadze G., Bhat J., Lettau M., Janssen O., Kabelitz D. Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications // Scand. J. Immunol. 2013. Vol. 78. № 2. P. 120–129.
- Cote C.K., Van Rooijen N., Welkos S.L. The role of macrophages and neutrophils // Infect. Immun. 2006. Vol. 74. № 1. P. 469–480.

11. Cudejko C., Wouters K., Fuentes L., Hannou S.A., Paquet C., Bantubungji K., Bouchaert E., Vanhoutte J., Fleury S., Remy P., Tailleux A., Chinetti-Gbaguidi G., Dombrowicz D., Staels B., Paumelle R. p16INK4a deficiency promotes IL-4-induced polarization and inhibits proinflammatory signaling in macrophages // *Blood*. 2011. Vol. 118. № 9. P. 2556–2566.
12. Dhomen N., Reis-Filho J.S., Da Rocha Dias S., Hayward R., Savage K., Delmas V., Larue L., Pritchard C., Marais R. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice // *Cancer Cell*. 2009. Vol. 15. № 4. P. 294–303.
13. Fessler J., Raicht A., Husic R., Ficjan A., Schwarz C., Duftner C., Schwinger W., Graninger W.B., Stradner M.H., Dejaco C. Novel senescent regulatory T-cell subset with impaired suppressive function in rheumatoid arthritis // *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8. № 300. doi: 10.3389/fimmu.2017.00300.
14. Giuliani E., Vassena L., Cerboni C., Doria M. Release of Soluble Ligands for the Activating NKG2D Receptor: One More Immune Evasion Strategy Evolved by HIV-1? // *Curr. Drug Targets*. 2016. Vol. 17. № 1. P. 54–64.
15. Gurram R.K., Kujur W., Maurya S.K., Agrewala J.N. Caerulomycin A enhances transforming growth factor- β (TGF- β)-Smad3 protein signaling by suppressing interferon- γ (IFN- γ)-signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) protein signaling to expand regulatory T cells (Tregs) // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289. № 25. P. 17515–17528.
16. Hashimoto-Hachiya A., Tsuji G., Furue M.J. Antioxidants cinnamaldehyde and Galactomyces fermentation filtrate downregulate senescence marker CDKN2A/p16INK4A via NRF2 activation in keratinocytes // *Dermatol. Sci.* 2019. Vol. 96. № 1. P. 53–56.
17. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains // *Exp. Cell. Res.* 1965. Vol. 37. P. 614–636.
18. He X.Y., Xiang C., Zhang C.X., Xie Y.Y., Chen L., Zhang G.X., Lu Y., Liu G. p53 in the myeloid lineage modulates an inflammatory microenvironment limiting initiation and invasion of intestinal tumors // *Cell Rep.* 2015. Vol. 13. № 5. P. 888–897.
19. Hohmann M.S., Habel D.M., Coelho A.L., Verri W.A. Jr., Hogaboam C.M. Quercetin enhances ligand-induced apoptosis in senescent idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts and reduces lung fibrosis in vivo // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2019. Vol. 60. № 1. P. 28–40.
20. Hou J., Kim S. Possible role of ginsenoside Rb1 in skin wound healing via regulating senescent skin dermal fibroblast // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. Vol. 499. № 2. P. 381–388.
21. Hoves S., Aigner M., Pfeiffer C., Laumer M., Obermann E.C., Mackensen A. In situ analysis of the antigen-processing machinery in acute myeloid leukaemic blasts by tissue microarray // *Leukemia*. 2009. Vol. 23. № 5. P. 877–885.
22. Huda N., Liu G., Hong H., Yan S., Khambu B., Yin X.M. Hepatic senescence, the good and the bad // *World J. Gastroenterol.* 2019. Vol. 25. № 34. P. 5069–5081.
23. Li S., Nishikawa T., Kaneda Y. Inactivated Sendai virus particle upregulates cancer cell expression of intercellular adhesion molecule-1 and enhances natural killer cell sensitivity on cancer cells // *Cancer Sci.* 2017. Vol. 108. № 12. P. 2333–2341.
24. Marcus A., Gowen B.G., Thompson T.W., Iannello A., Ardolino M., Deng W., Wang L., Shifrin N., Raulet D.H. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells // *Adv. Immunol.* 2014. Vol. 122. P. 91–128.
25. Matusali G., Tchidjou H.K., Pontrelli G., Bernardi S., D'Ettore G., Vullo V., Buonomini A.R., Andreoni M., Santoni A., Cerboni C., Doria M. Soluble ligands for the NKG2D receptor are released during HIV-1 infection and impair NKG2D expression and cytotoxicity of NK cells // *FASEB J.* 2013. Vol. 27. № 6. P. 2440–2450.
26. McDermott D.F., Atkins M.B. PD-1 as a potential target in cancer therapy // *Cancer Med.* 2013. Vol. 2. № 5. P. 662–673.
27. Mincheva-Nilsson L., Baranov V. Cancer exosomes and NKG2D receptor-ligand interactions: impairing NKG2D-mediated cytotoxicity and anti-tumour immune surveillance // *Semin. Cancer Biol.* 2014. Vol. 28. P. 24–30.
28. Monaco C., Nanchahal J., Taylor P., Feldmann M. Anti-TNF therapy: past, present and future // *Int. Immunol.* 2015. Vol. 27. № 1. P. 55–62.
29. Mossanen J.C., Kohlhepp M., Wehr A., Krenkel O., Liepelt A., Roeth A.A., Möckel D., Heymann F., Lammers T., Gassler N., Hermann J., Jankowski J., Neumann U.P., Luedde T., Trautwein C., Tacke F. CXCR6 inhibits hepatocarcinogenesis by promoting natural killer T and CD4+ T-cell-dependent control of senescence // *Gastroenterology*. 2019. Vol. 156. № 6. P. 1877–1889.
30. Niavarani S.R., Lawson C., Bakos O., Boudaud M., Batenchuk C., Rouleau S., Tai L.H. Lipid accumulation impairs natural killer cell cytotoxicity and tumor control in the postoperative period // *BMC Cancer*. 2019. Vol. 19. № 1. P. 823–831.
31. Nikolich-Zugich J. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system // *Nat. Immunol.* 2018. Vol. 19. № 1. P. 10–19.
32. Palacio L., Goyer M.L., Maggiorani D., Espinosa A., Villeneuve N., Bourbonnais S., Moquin-Beaudry G., Le O., Demaria M., Davalos A.R. Restored immune cell functions upon clearance of senescence in the irradiated splenic environment // *Aging Cell*. 2019. Vol. 18. № 4. P. 12971–12989.
33. Porokh V., Vanhara P., Bárta T., Jurečková L., Boháčiková D., Pospíšilová V., Mináriková D., Holubcová Z., Pelková V., Souček K., Hampl A. Soluble Cripto-1 Induces accumulation of supernumerary centrosomes and formation of aberrant mitoses in human embryonic stem cells // *Stem Cells. Dev.* 2018. Vol. 27. № 16. P. 1077–1084.
34. Prata L.G.P.L., Ovsyannikova I.G., Tchkonja T., Kirkland J.L. Senescent cell clearance by the immune system: Emerging therapeutic opportunities // *Semin. Immunol.* 2019. doi: 10.1016/j.smim.2019.04.003.
35. Radman M. Cellular parabiosis and the latency of age-related diseases // *Open Biol.* 2019. Vol. 9. № 3. P. 180250. doi: 10.1098/rsob.180250.
36. Raj N., Attardi L.D. Tumor suppression: p53 alters immune surveillance to restrain liver cancer // *Curr. Biol.* 2013. Vol. 23. № 12. P. 527–530.
37. Rossin A., Miloro G., Hueber A.O. TRAIL and FasL functions in cancer and autoimmune diseases: Towards an increasing complexity // *Cancers (Basel)*. 2019. Vol. 11. № 5. doi: 10.3390/cancers11050639.
38. Sagiv A., Krizhanovsky V. Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program // *Biogerontology*. 2013. Vol. 14. № 6. P. 617–628.
39. Serrano M. Senescence helps regeneration // *Dev. Cell*. 2014. Vol. 31. № 6. P. 671–672.
40. Van Dalen F.J., Van Stevendaal M.H.M.E., Fennemann F.L., Verdoes M., Ilina O. Molecular repolarisation of tumour-associated macrophages // *Molecules*. 2018. Vol. 24. № 1. P. 9–34.
41. Wu S., Chen X., Tang Y., Zhang Y., Li D., Chen J., Wang J., Tang Z., Zang G., Yu Y. Delivery of Tapasin-modified CTL epitope peptide via cytoplasmic transduction peptide induces CTLs by JAK/STAT signaling pathway in vivo // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2018. Vol. 50. № 2. P. 181–190.
42. Zindl C.L., Chaplin D.D. Tumor immune evasion // *Immunology. Science*. 2010. Vol. 328. № 5979. P. 697–698.
43. Zhavoronkov A., Smit-McBride Z., Guinan K.J., Litovchenko M., Moskalev A. Potential therapeutic approaches for modulating expression and accumulation of defective lamin A in laminopathies and age-related diseases // *J. Mol. Med. (Berl)*. 2012. Vol. 90. № 12. P. 1361–1389.

Disorders of immune homeostasis in the age aspect

E.V. Golubkina, M.N. Trizno

Astrachan State Medical University, Astrachan

Along with reparative processes in tissues, the regulation of cellular aging is one of the most important among the homeostatic reactions of the body. Often, aging is followed by the accumulation of senescent cells (SC) "frozen" in the G₀/G₁ phase of the cell cycle. Aging of the immune system cells is of particular importance. To some extent, immune SCs use a specific secretory phenotype (senescence associated secretory phenotype, SASP) to control tissue development and healing during ontogenesis. But, having overcome the physiological threshold, SASP has a pleiotropic effect on the immune cells activity, their phenotype, activation and differentiation. Immune cells of innate and adaptive immunity are involved in eliminating SC. Most likely, NK cells are responsible for a specific elimination, although their activity can be modulated by other cells, such as macrophages, CD8⁺ T-lymphocytes. The result of the actions of these cells can be oppositely directed relative to each other. In general, the fact that the accumulation of SC provokes an age-dependent pathology matters. The purpose of this work is to present a modern wide view on cell aging processes, the features that occur against this background in the immune system and their homeostatic role throughout life. This review is devoted to the mechanisms of interaction not only between senescent and immune cells, but also between different types of immune cells. (Cytokines and Inflammation. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 22–27.)

Key words: senescent cells, SASP, macrophages, lymphocytes, aging, immune regulation, age-dependent pathology.

Перспективная оценка маркеров сосудистой воспалительной реакции и параметров липидного профиля у больных ишемической болезнью сердца при наличии и отсутствии сахарного диабета 2-го типа, перенесших ангиопластику со стентированием коронарных артерий

Т.И. Петелина, Н.А. Мусихина, Л.И. Гапон, Е.А. Горбатенко,
И.В. Еменова, Ю.А. Шароян, Е.В. Зуева

Тюменский кардиологический научный центр, Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

Цель — провести сравнительный анализ маркеров сосудистой воспалительной реакции и параметров липидного спектра у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), стабильной стенокардией, без и в сочетании с сахарным диабетом (СД) 2-го типа в выделенных подгруппах со значимым стенозом коронарных артерий и проследить динамику лабораторных параметров проспективно после ангиопластики со стентированием. **Методы.** Обследованы 97 пациентов (средний возраст — $60,3 \pm 8,1$ года) с ИБС, стабильной стенокардией напряжения. 1-я группа — больные ИБС ($n=64$), 2-я группа — ИБС с СД 2-го типа ($n=33$). Согласно данным проведенной коронарной ангиографии (КАГ), в обеих группах выделены подгруппы пациентов с обструктивным значимым стенозом (ЗКС, степень стеноза $\geq 75\%$ просвета сосуда). Пациентам с ЗКС выполнена коронарная ангиопластика стентами с лекарственным покрытием. Исследование параметров крови проводили исходно до проведения КАГ и в период контрольных точек: через 3, 6, 12 месяцев после ангиопластики. Срок наблюдения пациентов составил $12 \pm 1,2$ года. **Результаты.** В выделенных подгруппах пациентов со ЗКС выявлено превышение референсных значений атерогенных фракций липидов (общего холестерина (ОХС), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), триглицеридов (ТГ)) и достоверное превышение уровней маркеров сосудистого воспаления (вч-СРП, TNF α , гомоцистеин, IL-1 β), более выраженное у пациентов с ИБС и СД 2-го типа. При проспективном наблюдении пациентов зарегистрировано максимальное повышение уровня маркеров воспаления в контрольной точке «3 месяца» и отсутствие достижения к конечной точке наблюдения целевых уровней атерогенных фракций липидов и маркеров воспаления (вч-СРП, MMP-9, эндотелин-1), что может свидетельствовать о наличии системного пролонгированного сосудистого воспалительного ответа в обеих группах пациентов. **Заключение.** Системный характер воспалительного ответа более выражен у пациентов с ИБС и СД 2-го типа. Максимальный уровень активации параметров сосудистого воспаления в точке «3 месяца» после ангиопластики и сохранение системного сосудистого воспалительного ответа до конечной точки наблюдения в обеих подгруппах свидетельствует о наличии равноценного потенциала в развитии как ранних, так и поздних нежелательных коронарных событий. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 28–36.)

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, ишемическая болезнь сердца, значимый коронарный стеноз, липидный профиль, маркеры воспаления.

Распространенность сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), в частности ишемической болезни сердца (ИБС), в популяции напрямую опре-

делена частотой встречаемости основных факторов риска ССЗ. Одним из важнейших факторов риска ИБС является сахарный диабет (СД), распространенность которого неуклонно возрастает. Так, по данным Международной диабетической

Петелина Татьяна Ивановна, e-mail: petelina@cardio.tmn.ru

федерации (IDF), в 2014 году на земном шаре насчитывалось 387 миллионов больных СД [5]. Прогнозируется, что к 2035 году численность больных СД во всем мире возрастет до 592 миллионов. Эпидемический характер роста численности больных СД не мог не привлечь внимание мирового медицинского сообщества и международных организаций. В связи с этим 2015 год ознаменовался обновлением ряда международных алгоритмов диагностики и лечения СД [4, 24]. СД является мощным фактором развития и прогрессирования сердечно-сосудистой патологии. Развитие СД повышает риск сердечно-сосудистой смертности в 2 раза у мужчин и в 4 раза у женщин, что определяет этих пациентов как категорию высокого и очень высокого сердечно-сосудистого риска [9].

Развитие сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) у лиц с инсулинорезистентностью — процесс прогрессирующий, он характеризуется ранней дисфункцией эндотелия и сосудистым воспалением, ведущим к вовлечению в процесс моноцитов с трансформацией их в пенистые клетки и формированию атеросклеротических бляшек, что при наличии системного воспалительного фона выражается в нестабильности и разрыве бляшки с окклюзирующим тромбозом. В соответствии с патоморфологическими и ангиографическими данными, для больных СД характерно более распространенное (многососудистое), диффузное (многоsegmentарное поражение в одной артерии) и дистальное поражение коронарных артерий, кроме того, атеросклероз при СД 2-го типа чаще имеет мультифокальный характер и наряду с коронарными артериями распространяется и на другие артериальные бассейны [4, 14].

Несмотря на интенсивные исследования атеросклероза, ассоциированного с СД, механизмы тесной взаимосвязи между диабетом и ИБС пока полностью не обозначены, вследствие этого интенсивно продолжается поиск причин, ускоряющих и усугубляющих развитие атеросклеротического поражения сосудов и их осложнений при сочетании клинических состояний [4, 22]. Сегодня не вызывает сомнений тот факт, что в патогенезе сосудистых повреждений при атеросклерозе важную роль играют циркулирующие в крови факторы воспаления и прокоагулянты, активно обсуждается роль хронического воспалительного процесса [2, 6, 10, 15, 16, 22].

Основными принципами консервативного ведения пациентов с СД и сердечно-сосудистой патологией является комплексный подход, направленный на коррекцию факторов риска и прогрессирование коронарного атеросклероза: целевой контроль гликемии и артериального давления, обязательная гиполипидемическая терапия в адекватных дозах и антиагреганты. В настоящее время невозможно представить оказание современной

медицинской помощи больным СД и ИБС без интервенционных вмешательств. Четверть всех процедур реваскуляризации миокарда проводится у больных с СД [17]. Выявление особенностей динамики маркеров сосудистого воспаления у больных ИБС с СД после ангиопластики со стентированием определяет новизну представленной нами работы.

Цель — проведение сравнительного анализа маркеров сосудистой воспалительной реакции и параметров липидного спектра у пациентов с ИБС, стабильной стенокардией, без и в сочетании с СД 2-го типа в выделенных подгруппах со значимым стенозом коронарных артерий и изучение динамики лабораторных параметров проспективно после ангиопластики со стентированием.

Материалы и методы

Обследованы 97 пациентов (мужского и женского пола) в возрасте $60,3 \pm 8,1$ года с ИБС, стабильной стенокардией напряжения. Пациенты распределены в 2 группы. 1-я ($n=64$) — без наличия СД 2-го типа, 2-я группа ($n=33$) — пациенты с наличием СД 2-го типа. Согласно данным проведенной селективной коронарной ангиографии, из обеих групп пациентов были выделены подгруппы ($n=32$ и $n=22$ пациента, соответственно), где был выявлен обструктивный значимый стеноз (ЗКС) одной из коронарных артерий (степень стеноза $\geq 75\%$ просвета сосуда). Пациентам с ЗКС в обеих подгруппах проведена коронарная ангиопластика (КАГ). Исследование лабораторных параметров сыворотки крови проводили в группах пациентов исходно при поступлении в стационар до проведения КАГ и в период контрольных точек (3 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев после проведенной ангиопластики со стентированием). Срок наблюдения пациентов после ангиопластики составил $12 \pm 1,2$ года.

Протокол исследования одобрен Этическим комитетом учреждения. Перед включением в исследование у каждого из участников исследования было получено письменное информированное согласие об использовании результатов обследования в научных целях.

Исследование проводили на базе отделения неотложной кардиологии Тюменского кардиологического научного центра, Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск.

Включенные в исследование пациенты 1-й и 2-й групп не имели достоверных различий ($p>0,05$): по возрасту ($60,15 \pm 8,57$ и $60,39 \pm 9,51$ года), гендерному признаку, по длительности ИБС, перенесенному инфаркту миокарда в анамнезе, по наличию и длительности сопутствующей патологии в виде артериальной гипертензии, дислипидемии, факту курения. Основное количество пациентов в обеих группах имели II ФК стенокардии напряжения и I степень ожирения. Группы значимо различались по наличию многососудистых поражений, с достоверным превышением в группе с СД 2-го типа (6,3 и 21,2 %, соответственно, $p=0,029$).

Пациенты обеих групп были сопоставимы по принимаемой лекарственной терапии на амбулаторном этапе: бета-бло-

каторы (63,6 и 86,4%), диуретики (72,7 и 59,1%), статины, представленные в основном аторвастатином и симвастатином (27,3 и 31,8%), дезагреганты (45,5 и 72,7%), ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (ИАПФ) или блокаторы рецепторов ангиотензина II (БРА) (62,45 и 54,5%; 36,4 и 22,7%, соответственно), антагонисты кальция (45,5 и 27,3%; $p < 0,05$), соответственно, в 1-й и 2-й группах. Таблетированные сахароснижающие препараты (97,9%) в группе пациентов с СД 2-го типа в основном были представлены производными сульфанилмочевины II и III поколения и бигуанидами, инсулинотерапию принимали пациенты в 2,1% случаев.

Критериями исключения явились: острый коронарный синдром давностью менее 30 дней, острое нарушения мозгового кровообращения давностью менее 6 месяцев, СД 1-го типа, хроническая сердечная недостаточность (ХСН) функционального класса (ФК) IV (по NYHA), наличие онкологических и психических заболеваний.

Диагностику форм ИБС и подбор терапии в стационаре (липидснижающая и двойная антиагрегационная) проводили в соответствии с действующими рекомендациями РКО, ESC и EASD. Объем диагностических мероприятий включал: клиническое обследование, лабораторные и инструментальные методы оценки состояния коронарного кровообращения (селективную КАГ), эндоваскулярную реваскуляризацию миокарда — транслюминальную баллонную ангиопластику (ТБКА) со стентированием. В обеих подгруппах были имплантированы однотипные стенты с лекарственным покрытием («Taxis», «Promus Element», «Nobori»).

КАГ выполняли из феморального доступа по стандартной методике М. Judkins (1967 г.) с помощью ангиографических комплексов «Diagnost ARC A», «Poly diagnost C», «Integris Allura» (Phillips, Голландия). Оценивали количество пораженных коронарных артерий (КА) и максимальный процент стенозирования.

Натощак производили забор венозной крови в одноразовые пробирки системы «Vacuette» (Япония), кровь центрифугировали 15 мин при 2500 об/мин на центрифуге «Sigma» (Германия). Сыворотку крови пациентов аликвотировали для дальнейшего замораживания (при -70°C).

На биохимическом автоматическом анализаторе «Cobas Integra 400 plus» (Швейцария) исследовали параметры липидного обмена. Определение общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) проводили прямым энзиматическим колориметрическим методом; концентрации аполипопротеинов А-I (Апо А-I), аполипопротеинов В (Апо-В), липопротеинов а (Лп а) проводили методом иммунотурбидиметрии при использовании аналитических наборов и контрольных материалов «Roche Diagnostics GmbH» (Германия).

В качестве биохимических маркеров воспаления определяли: С-реактивный белок (вч-CRP, референсные значения — 0–3,0 мг/л) — иммунотурбидиметрическим методом высокочувствительным аналитическим набором «C-reactive protein hs» («BioSystem», Испания) на полуавтоматическом анализаторе открытого типа «Clima MC-15» (Испания); интерлейкин 1 β (IL-1 β , референсные значения — 0–5,0 пг/мл), интерлейкин 6 (IL-6), интерлейкин 8 (IL-8), фактор некроза опухоли альфа (TNF α , референсные значения 0–8,11 пг/мл) и гомоци-

стеин (НУС, референсные значения — 5,0–15,0 мкмоль/л) — «сэндвич» и конкурентным методами (твердофазного хемилюминисцентного и иммуноферментного анализа) на анализаторе «IMMULITE 1000» («Siemens Diagnostics», США); растворимый CD40-лиганд (sCD40L) — методом «иммуноферментного сэндвича», с использованием наборов «Human sCD40L Elisa» на анализаторе «Bender MedSystems» (Австрия); рецептор CD40 и матриксную металлопротеиназу-9 (MMP-9, референсные значения — 20,3–77,2 нг/мл) — «Bender MedSystems» (Австрия); тканевой ингибитор-1 металлопротеиназ (TIMP-1, референсные значения — 92–116 нг/мл) — «Human TIMP-1 Elisa Kit Invitrogen» (США) на анализаторе «Personal Lab» (Италия).

Углеводный обмен оценивали по содержанию глюкозы, гликированного гемоглобина (HbA $_{1c}$). Концентрацию глюкозы крови определяли гексокиназным методом на биохимическом анализаторе «Cobas Integra 400 plus». Гликированный гемоглобин определяли хроматографическим методом с помощью анализатора «Bio-Rad D10», США.

Показатели функциональной активности эндотелия в сыворотке крови: уровень нитритов (референсное значение — $3,77 \pm 0,87$ нмоль/л) определяли на биохимическом анализаторе «Humalyzer 2000 Human» (Германия, 1995) и эндотелина-1-21 (референсные значения — 0,2–0,7 фмоль/л) — на иммуноферментном полуавтоматическом анализаторе «Dy-natech» (Германия, 1989).

Забор крови осуществляли из периферической вены исходно при поступлении (перед КАГ).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ «Statistica» (SPSS Inc, ver. 11.5). Для проверки гипотезы о нормальности распределения применяли критерий Колмогорова — Смирнова. Между группами использовали t-критерий Стьюдента для обнаружения различий в количественных переменных нормального распределения, непараметрический критерий Манна — Уитни — для сравнения качественных и количественных величин, не являющихся нормальными. Сравнение групп между собой проводили с помощью критерия Вилкоксона для парных измерений. Данные представлены в виде $M \pm SD$ — «среднее значение $\pm$ среднеквадратичное отклонение», $p < 0,05$. Оценку взаимосвязи признаков, подчиняющихся нормальному и ненормальному распределениям, проводили с использованием коэффициентов корреляции Пирсона и Спирмена, соответственно.

Результаты и обсуждение

В работе была поставлена задача сравнить уровни изучаемых биохимических параметров в подгруппах со значимым коронарным стенозом у пациентов с ИБС при наличии и отсутствии СД 2-го типа и проследить динамику биохимических параметров в контрольных точках (через 3, 6, 12 месяцев после ангиопластики).

Пациенты, которым была выполнена ангиопластика со стентированием, составили в группе ИБС без СД 2-го типа 32 человека (50% от общего количества пациентов в группе), в группе пациен-

тов ИБС с СД 2-го типа — 22 пациента (66,7 %, соответственно).

Сравнительная характеристика основных биохимических параметров между подгруппами пациентов с ЗКС у пациентов с ИБС с наличием и отсутствием СД 2-го типа исходно и в динамике через год после ангиопластики представлена в **таблице**.

Сравнительная характеристика биохимических параметров в подгруппах с ЗКС на исходной точке исследования свидетельствует о наличии превышения референсного значения всех атерогенных фракций липидного профиля (ОХС, ЛПНП, ТГ, ЛПОНП, Апо-В) у пациентов в обеих подгруппах как с наличием, так и отсутствием СД 2-го типа. Уровень ЛПВП ($p=0,057$) имеет явную тенденцию к более низкому значению в подгруппе пациентов с СД, а уровень Лп (а) исходно достоверно выше у пациентов без наличия СД.

По мнению Laakso М. и др., снижение ЛПВП имеет важное прогностическое значение в отношении заболеваемости и смертности от ИБС и ее осложнений у пациентов с СД 2-го типа, показатель менее 0,9 ммоль/л сопровождается 4-кратным увеличением риска смерти от сердечной патологии [21].

В настоящее время не вызывает сомнения, что хроническое субклиническое воспаление является частью синдрома инсулиновой резистентности, а цитокины служат предикторами сосудистых осложнений СД 2-го типа [6, 7, 13, 18, 20].

Исходная сравнительная характеристика параметров воспалительной реакции зарегистрировала превышение нормативных значений вч-CRP, TNF α , гомоцистеина, IL-1 β , IL-6 и IL-8 в обеих подгруппах пациентов, со значимо повышенной гиперактивацией маркеров вч-CRP ($p=0,044$) и TNF α ($p=0,048$), IL-1 β ($p=0,044$) в подгруппе с СД.

Существует мнение, что инициация вялотекущего воспаления, связанная с повышением базового уровня вч-CRP, ведет к инсулинорезистентности, а индукторами воспаления являются провоспалительные цитокины, особенно интерлейкины IL-6 и IL-1 β . При этом IL-1 β является главным медиатором, ответственным за развитие местной воспалительной реакции и острофазового ответа на уровне организма [1, 7, 11].

В настоящее время повышение уровня гомоцистеина в плазме крови рассматривается как существенный фактор риска атеросклеротического поражения сосудов. Полагают, что гомоцистеин подвергается аутоокислению с образованием сво-

Таблица

Характеристика биохимических показателей в подгруппах пациентов с ишемической болезнью сердца и значимым стенозом коронарных артерий при отсутствии и наличии сахарного диабета 2-го типа на исходном этапе исследования и через год после ангиопластики (M $\pm$ SD)

Показатели		Пациенты с ИБС с ЗКС (n=32)	Пациенты с ИБС и СД с ЗКС (n=22)	p
Липидный спектр:				
ОХС (ммоль/л)	исходно	5,26 $\pm$ 1,31	5,44 $\pm$ 1,00	0,549
	через год	4,62 $\pm$ 0,99	4,92 $\pm$ 1,07	0,393
	p	0,016	0,014	
ЛПВП (ммоль/л)	исходно	1,09 $\pm$ 0,26	0,97 $\pm$ 0,16	0,057
	через год	1,21 $\pm$ 0,28	1,16 $\pm$ 0,17	0,797
	p	> 0,05	0,001	
ЛПНП (ммоль/л)	исходно	3,09 $\pm$ 1,05	3,18 $\pm$ 0,75	0,526
	через год	2,42 $\pm$ 0,87	2,56 $\pm$ 0,95	0,560
	p	0,001	0,001	
ТГ (ммоль/л)	исходно	2,29 $\pm$ 1,03	2,23 $\pm$ 1,12	0,586
	через год	1,70 $\pm$ 0,36	1,91 $\pm$ 0,64	0,640
	p	0,006	> 0,05	
ЛПОНП (ммоль/л)	исходно	0,87 $\pm$ 0,36	0,84 $\pm$ 0,32	0,819
	через год	0,59 $\pm$ 0,246	0,73 $\pm$ 0,30	0,066
	p	0,001	> 0,05	
Лп-(а) (мг/дл)	исходно	37,38 $\pm$ 34,30	19,86 $\pm$ 22,20	0,027
	через год	27,10 $\pm$ 27,33	24,82 $\pm$ 31,06	0,515
	p	> 0,05	> 0,05	
Апо-В (мг/дл)	исходно	91,88 $\pm$ 21,60	92,25 $\pm$ 2,32	0,853
	через год	90,00 $\pm$ 21,82	109,12 $\pm$ 28,58	0,007
	p	> 0,05	0,014	

Маркеры воспаления:				
вч-CRP (мг/л)	исходно	2,87±1,25	3,58±1,23	0,044
	через год	2,80±0,97	2,86±0,82	0,660
	p	>0,05	0,008	
TNFα (пг/мл)	исходно	9,44±2,50	11,24±4,02	0,048
	через год	5,86±3,18	7,39±2,84	0,042
	p	0,001	0,01	
Гомоцистеин (мкмоль/л)	исходно	11,08±5,42	17,04±7,52	0,09
	через год	9,77±5,88	12,20±4,10	0,016
	p	>0,05	>0,05	
IL-1β (пг/мл)	исходно	4,24±1,06	5,57±2,01	0,044
	через год	4,00±1,30	4,49±1,94	0,459
	p	>0,05	0,002	
ММП-9 (нг/мл)	исходно	86,45±31,01	83,50±26,45	0,860
	через год	87,77±29,86	82,68±33,83	0,622
	p	>0,05	>0,05	
TIMP-1 (нг/мл)	исходно	91,00±17,22	86,38±12,26	0,365
	через год	105,70±29,15	112,65±26,32	0,342
	p	>0,05	0,002	
Маркеры эндотелиальной дисфункции:				
Эндотелин-1 (фмоль/л)	исходно	1,07±0,48	0,96±0,51	0,423
	через год	0,97±0,47	0,93±0,39	0,895
	p	>0,05	>0,05	
Нитриты (нмоль/л)	исходно	3,34±1,23	2,63±1,38	0,050
	через год	3,45±0,97	3,20±0,91	0,132
	p	>0,05	>0,05	

Примечание. ИБС — ишемическая болезнь сердца; ЗКС — обструктивный значимый коронаростеноз; СД — сахарный диабет; ОХС — общий холестерин; ЛПВП — липопротеины высокой плотности; ЛПНП — липопротеины низкой плотности; ТГ — триглицериды; ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности; Лп-(а) — липопротеины а; Апо-В — аполипопротеины В; вч-CRP — высокочувствительный С-реактивный белок; ММП-9 — матриксная металлопротеиназа-9; TIMP-1 — тканевой ингибитор-1 металлопротеиназ; n — количество пациентов, p — значимость различий.

бодных радикалов, повреждающих эндотелий сосудов, с последующим развитием эндотелиальной дисфункции, которая запускает сложный каскад ферментативных реакций, приводящих к индукции синтеза ОХС и окислению ЛПНП, что стимулирует процессы атерогенеза [8, 12]. Проведено свыше 80 клинических и эпидемиологических исследований, которые подтвердили, что гипергомоцистеинемия (ГГЦ) является одним из значимых, самостоятельных факторов риска раннего и быстрого прогрессирования атеросклероза и тромбоза артерий [23].

В 1-й и 2-й подгруппах нами выявлено повышенное, но достоверно не различимое между подгруппами значение показателя локальной воспалительной реакций — ММП-9. Уровень TIMP-1 в обоих случаях был в пределах нормативных значений. Полученные данные совпадают с результатами других экспериментальных и клинических исследований, где при СД 2-го типа отмечается тенденция к нарастанию уровня провоспалитель-

ных цитокинов и протеиназ при снижении активности противовоспалительных медиаторов [19].

Среди сигнальных молекул, участвующих в развитии иммунных реакций и воспаления, важное значение принадлежит системе «рецептор CD40 — лиганд CD40». Было показано, что сигналы, реализуемые через рецептор CD40, вовлечены в развитие атеросклероза и диабетической нефропатии, что позволило рассматривать эту систему как универсальное звено патогенеза, объединяющего воспалительные нарушения, гипергликемию и сосудистые осложнения СД [16].

В нашем исследовании не зарегистрировано достоверных различий в уровнях CD40 и sCD40L, что, возможно, связано с недостаточным количеством пациентов.

Данные литературных источников свидетельствуют о том, что при СД 2-го типа ГГЦ может усугублять эндотелиальную дисфункцию, ускорять развитие атеросклеротических процессов, вызывать оксидативный стресс, снижать тромборези-

стенность, повышать агрегационную способность тромбоцитов и их адгезивные свойства. Гипергликемия активирует в эндотелиальных клетках протеинкиназу C, что может вызывать увеличение выработки сосудосуживающих простагландинов, эндотелина-1 и АПФ, которые оказывают непосредственное или опосредованное повреждающее действие на сосудодвигательную реактивность [8].

В нашей работе на исходной точке обследования зарегистрировано превышение нормативных значений уровня эндотелина-1 в обеих подгруппах, но без достоверной разницы между ними. Уровень нитритов был снижен в обеих подгруппах, при этом более значимо у пациентов с ИБС и СД ($p < 0,05$).

Методом корреляционного анализа в исследуемых подгруппах выявлены прямые связи средней силы ($r = 0,4-0,5$) у пациентов с ИБС и СД 2-го типа: вч-CRP и ОХС ($p = 0,004$), Апо-В ($p = 0,02$); IL-1 β и атерогенных фракций: ОХС ($p = 0,01$), ТГ ($p = 0,04$) и индекса атерогенности ($p = 0,01$); эндотелина-1 с маркерами системного и местного воспаления: эндотелина-1 с вч-CRP ($p = 0,02$), TNF α ($p = 0,01$), MMP-9 ($p = 0,05$); CD40 с ТГ ($p = 0,03$), что согласуется с теорией об атеросклерозе как о процессе, сочетающем воспаление и тромбообразование. Отмечены связи между длительностью СД 2-го типа с индексом массы тела ($p = 0,002$) и уровнем гомоцистеина ($p = 0,02$). В 1-й подгруппе выявлены прямые взаимосвязи средней силы ($r = 0,4$) стажа курения с атерогенными параметрами липидного спектра: ТГ ($p = 0,03$) и ЛПНП ($p = 0,03$); вч-CRP с гомоцистеином ($p = 0,028$), IL-6 ($p = 0,031$).

Согласно данным **таблицы**, сравнительный анализ уровней параметров между 1-й и 2-й подгруппами в конечной точке исследования (через год) показал достоверные различия параметров Апо-В ($p = 0,007$), TNF α ($p = 0,042$), гомоцистеина ($p = 0,016$), с превышением уровня показателей во 2-й подгруппе больных с наличием СД.

Сравнительный анализ уровней параметров между 1-й и 2-й подгруппами в исходной и конечной точках исследования также показал, что среди параметров липидного профиля в обеих подгруппах достоверно снизились уровни ОХС и ЛПНП, в 1-й подгруппе снизились уровни ТГ и ЛПОНП, а во 2-й подгруппе было зарегистрировано повышение уровней ЛПВП и Апо-В. В обеих подгруппах все атерогенные фракции липидов на конечном этапе наблюдения остались на уровне, превышающем целевые уровни показателей.

При оценке маркеров воспаления выявлено, что в обеих подгруппах достоверно снизился уровень TNF α ($p = 0,001$, $p = 0,01$, соответственно). Во 2-й подгруппе значимо снизился уровень вч-CRP и IL-1 β , при повышении уровня TIMP-1. Концентрации маркеров функциональной активности эн-

дотелия и уровень MMP-9 значимо не изменились в обеих подгруппах, оставаясь на уровне, превышающем референсные значения.

В целом, надо отметить, что в обеих подгруппах пациентов до конечной точки наблюдения зарегистрированы уровни маркеров сосудистого воспаления, превышающие нормативные значения (вч-CRP, MMP-9, эндотелин-1), что свидетельствует о наличии пролонгированного воспалительного потенциала для развития поздних атеротромботических осложнений.

Параметры углеводного обмена к конечной точке наблюдения в группе ИБС с СД достоверно не изменились, имея тенденцию к снижению параметров глюкозы крови и гликированного гемоглобина ($p > 0,05$), что требует повышения внимания врачей к оптимизации сахароснижающей терапии и приверженности пациентов к ее применению.

Динамика основных исследуемых параметров исследования представлена на **рисунке (а-з)**.

Согласно представленным данным видно, что максимальное повышение уровня исследуемых параметров, в частности, вч-CRP, TNF α , гомоцистеина, IL-1 β , CD40, MMP-9 было зарегистрировано в точке «3 месяца» после ангиопластики в обеих подгруппах больных с ЗКС. Уровень TIMP-1 повышался в обеих подгруппах и достиг максимально высоких значений на конечной точке, без значимой разницы между группами.

Параллельный однонаправленный рост уровня параметров сосудистой воспалительной реакции к точке «3 месяца» после ангиопластики со стентированием определяет пациентов обеих подгрупп с ЗКС как пациентов, имеющих повышенный риск развития ранних рестенозов и атеротромботических осложнений, обусловленных многофакторным характером повреждения сосудистой стенки, который усугубляет локальный и поддерживает пролонгированный системный процесс сосудистого воспалительного ответа.

Согласно данным литературы, в последние годы, по мере увеличения частоты чрескожных коронарных вмешательств со стентированием, все больше внимания вызывают проблемы, связанные с тромбозом и рестенозом внутри стентов, которые выявляются приблизительно у 10-40% и 0,87-2,2% случаев в течение первого года после постановки стента, соответственно. Основными патогенетическими механизмами развития рестенозов являются эластическое спадание просвета сосуда, пристеночное тромбообразование и гиперплазия неоинтимы, приводящие к патологическому ремоделированию стенки сосудов. В качестве пускового момента рассматривается механическое повреждение интимы и меди артерий, а также гиперчувствительность к материалу стента.

Кроме того, травма сосудистой стенки во время вмешательства приводит к развитию местной вос-

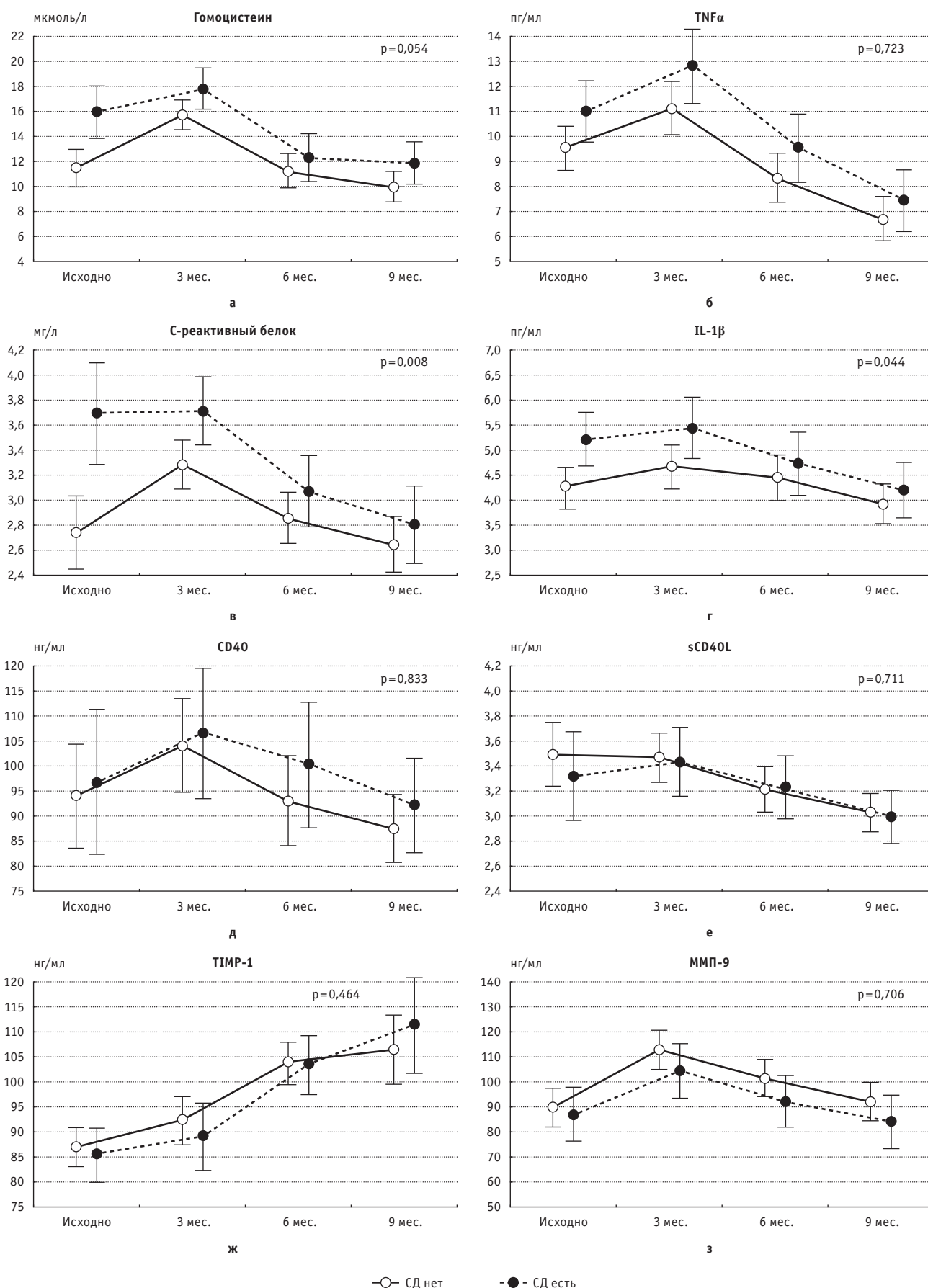


Рисунок. Динамика показателей маркеров воспаления в обследуемых группах больных за период наблюдения
TIMP-1 — тканевой ингибитор-1 металлопротеиназ; MMP-9 — матриксная металлопротеиназа-9; СД — сахарный диабет.

палительной реакции, адгезии, активации и агрегации тромбоцитов с образованием пристеночного тромба, миграции и пролиферации гладкомышечных клеток и реэндотелизации. Все эти процессы, являясь физиологическими и необходимыми для восстановления анатомической и функциональной целостности сосудистой стенки, в ряде случаев приобретают патологический характер и приводят к возникновению гиперплазии неоинтимы и хронической вазоконстрикции. Кроме того, развившийся воспалительный сосудистый ответ может способствовать формированию тромбоза в стенте [3].

В нашем исследовании, в целом, процент пост-реvascularизационных осложнений в обеих подгруппах пациентов к концу исследования составил 5 %.

Таким образом, для больных с ИБС и СД 2-го типа со значимым коронарным стенозом характерно наличие дислипидемии с повышенным уровнем ОХС, атерогенных фракций липидов и сниженным уровнем ЛПВП, а также гиперактивация маркеров сосудистого воспалительного ответа с достоверно более высоким уровнем вч-CRP, TNF α , IL-1 β по сравнению с пациентами ИБС без СД 2-го типа.

Проспективное наблюдение пациентов после ангиопластики выявило максимальный уровень активации параметров сосудистого воспаления в точке «3 месяца», что свидетельствует о наличии риска развития ранних рестенозов, как реакцию на комбинированный характер повреждения сосудистой стенки, в обеих подгруппах. В целом, на фоне положительной динамики исследуемых параметров, в конечной точке наблюдения отмечено отсутствие достижения целевых уровней холестерина, липопротеинов низкой плотности, триглицеридов, аполипопротеинов В и маркеров воспаления (вч-CRP, MMP-9, эндотелин-1), что может свидетельствовать о сохранении повышенного воспалительного потенциала для развития поздних атеротромботических осложнений у пациентов обеих групп.

Финансирование производилось в рамках научно-исследовательской программы Тюменского кардиологического научного центра, Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, Россия.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Бабаева А.Р., Тарасов А.А., Безбородова Т.А., Захарьина О.А. Концепция системного воспаления в патогенезе диабетической ангиопатии // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2010. № 1 (33). С. 3–8.
- Babayeva A.R., Tarasov A.A., Bezborodova T.A., Zakhar'ina O.A. [The concept of systemic inflammation in the pathogenesis of diabetic angiopathy] // Journal of Volgograd State Medical University. 2010. № 1 (33). P. 3–8. Russian.
- Безбородова Т.А., Тарасов А.А., Резникова Е.А., Лекарева И.В., Захарьина О.А., Бабаева А.Р. Диагностическое использование новых патогенетических маркеров поражения сосудистой стенки у больных сахарным диабетом // Цитокины воспал. 2014. Т. 13. № 1. С. 28–33.
- Bezborodova T.A., Tarasov A.A., Reznikova E.A., Lekareva I.V., Zakhar'ina O.A., Babaeva A.R. [Diagnostic use of new pathogenic markers of vascular lesions in diabetic patients] // Cytokines and Inflammation (St. Petersburg). 2014. Vol. 13. № 1. P. 28–33. Russian.
- Березовская Г.А., Ганюков В.И., Карпенко М.А. Рестеноз и тромбоз внутри стента: патогенетические механизмы развития и прогностические маркеры // Российский кардиологический журнал. 2012. Т. 17. № 6. С. 91–95.
- Berezovskaya G.A., Ganyukov V.I., Karpenko M.A. [Restenosis and in-stent thrombosis: pathogenetic mechanisms and prognostic markers] // Russian Journal of Cardiology 2012. Vol. 17. № 6. P. 91–95. Russian.
- Волков В.И., Серик С.А. Сахарный диабет и коронарный атеросклероз // Атеросклероз. 2011. Т. 7. № 2. С. 5–22.
- Volkov V.I., Serik S.A. [Diabetes mellitus and coronary atherosclerosis] // Atherosclerosis. 2011. Vol. 7. № 2. P. 5–22. Russian.
- Голухова Е.З., Кузнецова Е.В. Реваскуляризация миокарда у больных ИБС в сочетании с сахарным диабетом 2-го типа: обзор современных технологий // Сахарный диабет. 2016. Т. 19. № 5. С. 406–413. doi: 10.14341/DM803.
- Golukhova E.Z., Kuznetsova E.V. [Myocardial revascularization in patients with coronary heart disease combined with type 2 diabetes mellitus: a review of modern technologies] // Diabetes mellitus. 2016. Vol. 19. № 5. P. 406–413. doi: 10.14341/DM8031. Russian.
- Груздева О.В., Барбараш О.Л., Акбашева О.Е., Паличева Е.И., Дылева Ю.А., Кашталеп В.В., Учасова Е.Г., Печерина Т.Б., Сионина Е.В., Силонова А.А. Маркеры инсулинорезистентности и воспаления при инфаркте миокарда // Цитокины воспал. 2012. Т. 11. № 2. С. 44–50.
- Gruzdeva O.V., Barbarash O.L., Akbasheva O.E., Palicheva E.I., Dyleva Y.A., Kashatalap V.V., Uchasova E.G., Pecherina T.B., Sionina E.V., Silonova A.A. [Markers of insulin resistance and inflammation in acute myocardial infarction] // Cytokines and Inflammation (St. Petersburg). 2012. Vol. 11. № 2. P. 44–50. Russian.
- Гусев Д.Е., Потиевский Б.Г., Райчевич Н.А., Сыркин А.Л. Маркеры воспаления при различных формах ишемической болезни сердца // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2012. Т. 5. № 4. С. 4–8.
- Gusev D.E., Potievskiy B.G., Raichevich N., Syrkin A.L. [Inflammation markers in various forms of coronary heart disease] // Kardiologiya i Serdechno-Sosudistaya Khirurgiya (Russian Journal of Cardiology and Cardiovascular Surgery). 2012. Vol. 5. № 4. P. 4–8. Russian.
- Давыдчик Э.В., Снежитский В.А., Никонова Л.В. Взаимосвязь гипергомоцистеинемии с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом // Журнал Гродненского Государственного Медицинского Университета. 2015. № 1 (49). С. 9–13.
- Davydchik E.V., Snezhitskiy V.A., Nikonova L.V. [Relationship of hyperhomocysteinemia with coronary heart disease and Diabetes mellitus] // Journal of the Grodno State Medical University. 2015. № 1 (49). P. 9–13. Russian.
- Дедов И.И., Шестакова М.В., Галстян Г.Р., Григорян О.Р., Есаян Р.М., Калашников В.Ю., Кураева Т.Л., Липатов Д.В., Майоров А.Ю., Петеркова В.А., Смирнова О.М., Старостина Е.Г., Суркова Е.В., Сухарева О.Ю., Токмакова А.Ю., Шамхалова М.Ш., Ярэк-Мартынова И.Р. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой (7-й выпуск) // Сахарный диабет. 2015. Т. 18. № 15. С. 1–112. doi: 10.14341/DM2015151-112.
- Dedov I.I., Shestakova M.V., Galstyan G.R., Grigoryan O.R., Esayan R.M., Kalashnikov V.Y., Kuraeva T.L., Lipatov D.N., Mayorov A.Y., Peterkova V.A., Smirnova O.M., Starostina E.G., Surkova E.V., Sukhareva O.Y., Tokmakova A.Y., Shamkhalova M.Sh., Jarek-Martynova I.R. [Standards of specialized diabetes care. Eds. I.I. Dedov, M.V. Shestakova et al. (7th edition)] // Diabetes mellitus. 2015. Vol. 18. № 15. P. 1–112. doi: 10.14341/DM2015151-112. Russian.
- Джанашия П.Х., Мирина Е.Ю. Нарушение липидного обмена при сахарном диабете 2 типа и варианты его коррекции // Русский медицинский журнал. 2008. Т. 16. № 11. С. 1561–1566.
- Janashia P.Kh., Mirina E.Yu. [Violation of lipid metabolism in type 2 diabetes and its correction options] // Russian Medical Journal. 2008. Vol. 16. № 11. P. 1561–1566. Russian.
- Климонтков В.В., Тянь Н.В., Фазуллина О.Н., Мякина Н.Е., Лыков А.П., Коненков В.И. Клинические и метаболические факторы ассоциированные с хроническим воспалением низкой интенсивности у больных сахарным диабетом 2 типа // Сахарный диабет. 2016. Т. 19. № 4. С. 295–302. doi: 10.14341/DM7928.
- Klimontov V.V., Tian N.V., Fazullina O.N., Myakina N.E., Lykov A.P., Konenkov V.I. [Clinical and metabolic factors associated with chronic inflammation of

- low intensity in patients with diabetes mellitus type 2] // *Diabetes Mellitus*. 2016. Vol. 19. № 4. P. 295–302. doi: 10.14341/DM7928. Russian.
12. Кравчук Н.А. Гипергомоцистеинемия, сердечно-сосудистые заболевания и сахарный диабет 2 типа // *Здоров'я України*. 2012. № 4. С. 52–56.
Kravchuk N.A. [Hyperhomocysteinemia, cardiovascular diseases and type 2 diabetes] // *Zdorov'ia Ukrainy (Health of Ukraine)*. 2012. № 4. P. 52–56. Russian.
 13. Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Гапон Л.И., Еменева И.В., Горбатенко Е.А. Сравнительная характеристика параметров липидного профиля и маркеров сосудистого воспаления в группах пациентов со стабильной стенокардией при наличии и отсутствии сахарного диабета 2 типа // *Сахарный диабет*. 2017. Т. 20. № 3. С. 194–200. doi:10.14341/7959. Russian.
Petelina T.I., Musikhina N.A., Gapon L.I., Emeneva I.V., Gorbatenko E.A. [Comparative characteristics of lipid profile parameters and markers of vascular inflammation in groups of patients with stable angina in the presence and absence of type 2 diabetes] // *Diabetes mellitus*. 2017. Vol. 20. № 3. P. 194–200. doi:10.14341/7959. Russian.
 14. Сумин А.Н., Безденежных Н.А., Безденежных А.В., Иванов С.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Влияние сахарного диабета второго типа на распространенность мультифокального атеросклероза у пациентов с ишемической болезнью сердца // *Кардиология*. 2012. Т. 52. № 11. С.33–41.
Sumin A.N., Bezdenezhnykh N.A., Bezdenezhnykh A.V., Ivanov S.V., Barbarash O.L., Barbarash L.S. [Effect of type 2 diabetes mellitus on extent of multifocal atherosclerosis in patients with ischemic heart disease] // *Kardiologiya*. 2012. Vol. 52. № 11. P. 33–41. Russian.
 15. Тутов В.Н. Общность атеросклероза и воспаления: специфичность атеросклероза как воспалительного процесса // *Клин. лаб. диагн.* 2000. № 4. С. 3–10.
Titov V.N. [Common features of atherosclerosis and inflammation: specificity of atherosclerosis as an inflammatory process (a hypothesis)] // *Klin. Lab. Diagn.* 2000. № 4. P. 3–10. Russian.
 16. Шевченко О.Т., Природова О.Ф., Шевченко А.О. Клиническое значение растворимого CD40 лиганда у больных ишемической болезнью сердца // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2006. Т. 5. № 7. С. 101–111.
Shevchenko O.T., Prirodova O.F., Shevchenko A.O. [Clinical value of soluble CD40 ligand in coronary heart disease patients] // *Kardiovaskuliarniia Terapiia i Profilaktika (Cardiovascular Therapy and Prevention)*. 2006. Vol. 5. № 7. P. 101–111. Russian.
 17. American Diabetes Association. Position Statement: Management of Dyslipidemia in Adults With Diabetes // *Diabetes Care*. 2003. Vol. 26. Suppl. 1. P. S83–S86.
 18. Dehghan A., Kardys I., de Maat M.P., Uitterlinden A.G., Sijbrands E.J., Bootsma A.H., Stijnen T., Hofman A., Schram M.T., Witteman J.C. Genetic variation, C-reactive protein levels, and incidence of diabetes // *Diabetes*. 2007. Vol. 56. № 3. P. 872–878.
 19. Garvin P., Nilsson L., Carstensen J., Jonasson L., Kristenson M. Circulating matrix metalloproteinase-9 is associated with cardiovascular risk factors in middle-aged normal population // *Oxford J. Med.* 2008. Vol. 101. № 10. P. 785–791.
 20. Hartmann M., von Birgelen C., Mintz G.S., Stoel M.G., Eggebrecht H., Wieneke H., Fahy M., Neumann T., van der Palen J., Louwerenburg H.W., Verhorst P.M., Erbel R. Relation between lipoprotein(a) and fibrinogen and serial intravascular ultrasound plaque progression in left main coronary arteries // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006. Vol. 48. № 3. P. 446–452.
 21. Laakso M., Pyörälä K. Adverse effects of obesity on lipid and lipoprotein levels in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes // *Metabolism*. 1988. Vol. 39. № 2. C. 117–122.
 22. Muir R.L. Peripheral arterial disease: Pathophysiology, risk factors, diagnosis, treatment, and prevention // *J. Vasc. Nurs.* 2009. Vol. 27. № 2. P. 26–30.
 23. Potter K. Homocysteine and cardiovascular disease: should we treat? // *Clin. Biochem. Rev.* 2008. Vol. 29. № 1. P. 27–30.
 24. Shaw J.E., Sicree R.A., Zimmet P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010–2030 // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2010. Vol. 87. № 1. P. 4–14.

Prospective assessment of vascular inflammatory reaction markers and parameters of lipid profile in patients with coronary heart disease in the presence and absence of type 2 diabetes mellitus who underwent angioplasty with coronary arteries stenting

T.I. Petelina, N.A. Musikhina, L.I. Gapon, E.A. Gorbatenko,
I.V. Emeneva, Y.A. Sharoyan, E.V. Zueva

Tyumen Cardiology Research Center, Tomsk National Research Medical Center
of the Russian Academy of Sciences, Tomsk

Aim: To perform comparative analysis of vascular inflammatory reaction markers and lipid profile in patients with coronary atherial disease (CAD) and stable angina in general groups and in subgroups with significant coronary artery stenosis without and with type 2 diabetes mellitus (DM). To estimate biochemical parameters of blood serum prospectively after angioplasty in subgroups of patients with significant coronary artery stenosis. **Materials and methods:** 97 patients (males and females) aged 60.3±8.1 years with CAD and stable effort angina were studied. Patients were divided into two groups: group 1 (n=64) with CAD, group 2 (n=33) CAD patients with type 2 DM. According to selective coronary angiography patients in both groups had significant stenosis of one of the coronary arteries with the degree ≥ 75 % of the vessel lumen. Patients with significant coronary artery stenosis in both subgroups underwent coronary angioplasty with drug coated stents. Study of blood plasma laboratory parameters was conducted in the groups of patients initially before coronary angiography and at the control points — 3, 6 and 12 months after angioplasty and stenting. Follow-up duration was 12±1.2 years after angioplasty. **Results:** In both groups of patients, lipid profile atherogenic parameters (TC, LDL, VLDL, TG) were increased. Significant increase of vascular inflammation markers (hs-CRP, TNFα, homocysteine, IL-1β) was registered along with the excess of MMP-9 and endothelin-1 in the group of patients with CAD with DM that could indicate more pronounced vascular inflammation in this group. Prospective follow-up showed the maximum increased level of inflammatory markers at the control point "3 months" after angioplasty in both subgroups. In general, within the positive dynamics of the studied parameters, no attainments in target lipid levels (TC, HDL, TG) and markers of inflammation (hs-CRP, MMP-9) were found at the endpoint of follow-up "12 months" that could indicate the persistence of a systemic slow vascular inflammatory response. **Conclusions:** Systemic inflammatory response is more pronounced in CAD plus DM patients both in the general group and in a subgroup with significant coronary stenosis. Maximum level of vascular inflammation parameters activation at the point "3 months" after angioplasty and persistence of a systemic slow vascular inflammatory response to the endpoint of follow-up in patients of both subgroups suggest that they have an equivalent potential in the development of both early restenosis and late atherothrombotic complications. (*Cytokines and Inflammation*. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 28–36.)

Key words: diabetes mellitus, coronary disease, significant coronary stenosis, lipids, inflammation.

Морфологические изменения полипозной ткани больных с хроническим полипозным риносинуситом на фоне локального применения интерферона $\alpha 2b$ и сочетания интерферона $\alpha 2b$ с γ -D-глутамил-L-триптофаном

*Е.В. Безрукова¹, Н.М. Хмельницкая¹,
Е.В. Воробейчиков², А.С. Симбирцев³*

¹ФГБОУ ВО «Северо-западный государственный медицинский университет
имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

²ООО «Полифарм», Санкт-Петербург;

³ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург

Исследование проведено для оценки морфологических изменений в полипозной ткани, возникающих после введения в нее интерферона $\alpha 2b$ и сочетания интерферона $\alpha 2b$ с γ -D-глутамил-L-триптофаном. Показано, что после введения интерферона $\alpha 2b$ и сочетания интерферона $\alpha 2b$ с γ -D-глутамил-L-триптофаном происходит уменьшение межтканевого отека и усиление процессов фиброобразования. Введение сочетания интерферона $\alpha 2b$ с γ -D-глутамил-L-триптофаном уменьшает также лимфоидную инфильтрацию собственной пластинки слизистой оболочки полипозной ткани. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 37–42.)

Ключевые слова: хронический полипозный риносинусит, интерферон $\alpha 2b$,
 γ -D-глутамил-L-триптофан.

Хронический полипозный риносинусит (ХПРС) представляет собой хроническое воспалительное заболевание слизистой оболочки носа и околоносовых пазух (ОНП), проявляющееся образованием и рецидивирующим ростом полипов [9, 10]. Однако иммунопатогенез ХПРС полностью не изучен. Предрасположенность к развитию ХПРС связывают с дефектом эпителиального барьера, возникающим вследствие экзогенных (воздействие микробов, вирусов, аллергенов) и эндогенных (функциональных и структурных нарушений эпи-

телиальных белков, недостаточности защитных протеаз, антимикробных белков, нарушения переноса ионов, воды, гормональных изменений) причин. Нарушение эпителиального барьера приводит к увеличению проницаемости и неадекватному иммунному ответу слизистой оболочки верхних дыхательных путей (ВДП) [8]. Неадекватный иммунный ответ формирует локальный и продолжительный воспалительный процесс в слизистой оболочке, способствующий ее патологическому ремоделированию с образованием полипозной ткани [3, 4]. Переход к состоянию ремоделирования характеризуется изменением поверхностного эпи-

Безрукова Евгения Валерьевна, e-mail: ban_@mail.ru

телиа в виде дистрофии, акантоза и метаплазии эпителия, а в собственном слое слизистой оболочки — формированием очагов фиброзной ткани, осаждением внеклеточного матрикса, массивной инфильтрацией клетками гистиоцитарного ряда, выраженным межклеточным отеком и ангиоматозом [10]. Одним из способов снижения выраженности длительного локального воспалительного процесса является применение иммунокорригирующих препаратов. Такие средства вводятся в организм перорально, парентерально, а также непосредственно в пораженную ткань. Вместе с тем, клиническая эффективность применения препаратов этого класса у больных с ХПРС недостаточна изучена.

Целью работы являлась оценка морфологических изменений полипозной ткани после локального введения в нее рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ (Интераль) и γ -D-глутамил-L-триптофана (Бестим).

Применение рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ (Интераль) для терапии ХПРС теоретически логично, т. к. фармакологическая активность этого препарата связана с антипролиферативным и иммуномодулирующим действиями [2, 5]. Использование синтетического дипептида γ -D-глутамил-L-триптофана (Бестим) для терапии ХПРС базируется на его стимулирующей активности по отношению к реакциям клеточного и гуморального иммунитета, процессам регенерации и клеточного метаболизма, нормализации количества Т-хелперов, Т-супрессоров и их соотношений [6].

Материалы и методы

Для изучения изменений, возникающих в полипозной ткани после введения в нее рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ и его сочетания с γ -D-глутамил-L-триптофаном, сформировано три группы больных с ХПРС, имевших показания для оперативного лечения. Больным 1-й группы (24 человека) перед эндоназальной полипотомией в течение пяти дней в полипозную ткань вводили интерферон $\alpha 2b$ в дозе 1 млн. ЕД. Больным 2-й группы (24 человека) перед эндоназальной полипотомией в течение пяти дней в полипозную ткань вводили интерферон $\alpha 2b$ в дозе 1 млн ЕД и γ -D-глутамил-L-триптофаном в дозе 0,1 мг. Больным 3-й (контрольной) группы (15 человек) выполняли эндоназальную полипотомию без введения указанных препаратов.

Удаленную полипозную ткань фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и после проводки заливали в парафин. Полученные парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Качественную и количественную оценку лимфоцитов и плазмочитов выполняли под световым микроскопом при различном увеличении в десяти полях зрения собственного слоя слизистой оболочки полипозной ткани. Для оценки количественных изменений клеточной инфильтрации применяли методы параметрической и непараметрической статистики [1].

Результаты и обсуждение

В 3-й (контрольной) группе больных с ХПРС (рис. 1) полипозная ткань представлена измененным покровным эпителием и соединительнотканым слоем слизистой оболочки. В покровном респираторном эпителии отмечали наличие дистрофических изменений различной степени выраженности в пределах представленных объектов. Начальные дистрофические изменения проявлялись нечеткостью апикальной поверхности эпителиоцитов. В других участках слизистой оболочки наблюдали более глубокие изменения: отрыв апикальной поверхности реснитчатых клеток, их полное отторжение с сохранением только одного ряда базальных клеток с формированием «голых ядер», вплоть до полного отрыва клеток эпителия и оголения базальной мембраны (рис. 1, а). В собственном слое слизистой оболочки выявляли изменения, характерные для длительно текущего воспалительного процесса: выраженную инфильтрацию преимущественно лимфоцитами и плазмочитами, отек межклеточных пространств, ангиоматоз (рис. 1, а, б). Лимфогистиоцитарная инфильтрация собственного слоя слизистой оболочки полипообразных образований имеет очаговый характер, преимущественно в подэпителиальной и периваскулярной областях (см. рис. 1, а).

На рис. 2 представлены результаты морфологического исследования полипозной ткани после введения интерферона $\alpha 2b$ и его сочетания с γ -D-глутамил-L-триптофаном. По сравнению с морфологической картиной полипозной ткани больных контрольной группы отмечается уменьшение межтканевого отека и усиление процессов фиброобразования (формирование диффузного фиброза), что свидетельствует о позитивном влиянии иммунокорригирующих препаратов на течение воспалительного процесса. Однако существенных качественных различий морфологических изменений полипозной ткани между больными 1-й и 2-й групп после введения препаратов не обнаружено.

В табл. 1 представлены средние значения и стандартные отклонения количества клеток инфильтрирующих слизистую оболочку полипозной ткани, а также достоверность их количественных различий между группами больных. При сравнении изменений после введения в полипозную ткань интерферона $\alpha 2b$ пациентам 1-й группы и 3-й (контрольной) группы статистически достоверного уменьшения количества клеток (Lym, Pla), инфильтрирующих собственный слой слизистой оболочки, не обнаружено ($p > 0,05$). Это означает, что 5-дневное введение рекомбинантного интерферона не оказывает влияния на выраженность инфильтрации собственного слоя слизистой оболочки. Вместе с тем, одновременное введение в полипозную ткань рекомбинантного интерфе-

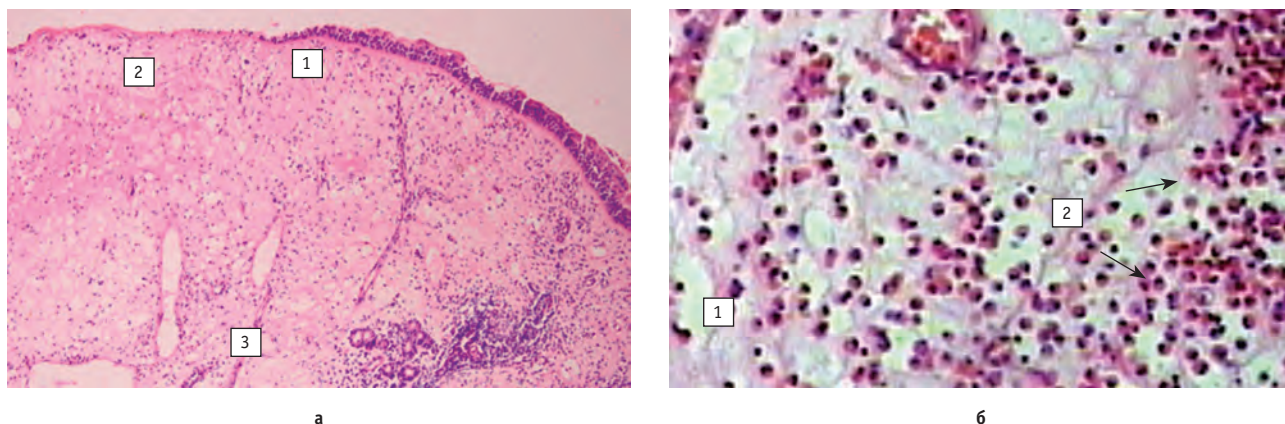


Рис. 1. Полипозная ткань у пациентов с хроническим полипозным риносинуситом без введения иммунокорригирующих препаратов (3-я (контрольная) группа)

а — уплощение (1) и десквамация поверхностного эпителия (2), участки ангиоматоза (3); б — выраженный межклеточный отек (1), интенсивная инфильтрация лимфоцитами (2). Увеличение $\times 100$. Окраска препарата: гематоксилин-эозин.

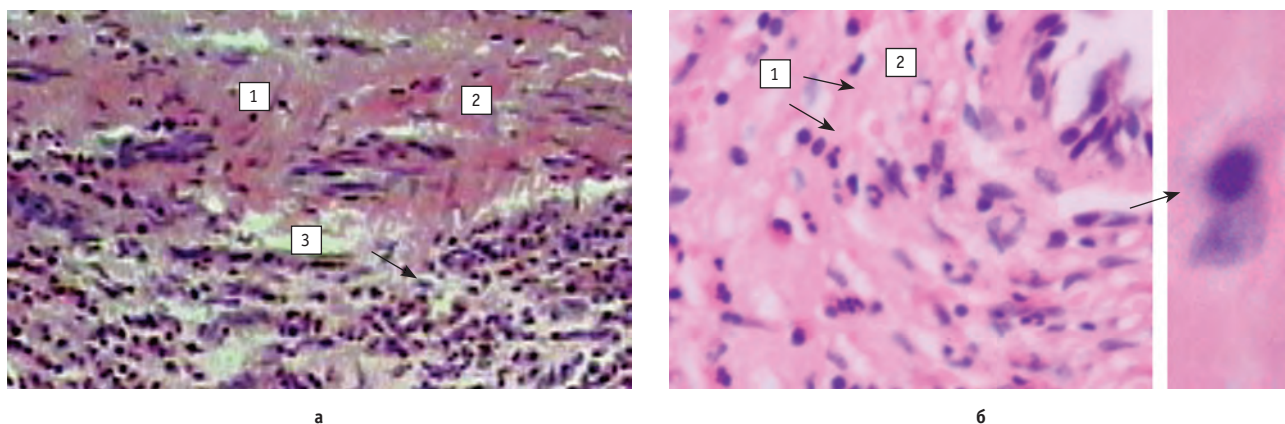


Рис. 2. Полипозная ткань у пациентов после введения: интерферона $\alpha 2b$ (1-я группа) (а); сочетания интерферона $\alpha 2b$ и γ -D-глутамил-L-триптофана (2-я группа) (б)

а — уменьшение межтканевого отека (1), диффузное фибрирование (2), интенсивность лимфоидной инфильтрации сохраняется (3), увеличение $\times 100$; б — уменьшение инфильтрации лимфоцитами и плазматическими клетками (1), усиление фиброза (2), увеличение $\times 200$. Стрелка — уплотнение хроматина в ядре плазматической клетки. Увеличение $\times 400$. Окраска препарата: гематоксилин-эозин.

рона и γ -D-глутамил-L-триптофана способствует снижению количества указанных клеток. Так, различия средних значений числа клеток (Lym, Pla), инфильтрирующих собственный слой слизистой оболочки после введения этих препаратов (2-я группа), и пациентов 3-й (контрольной) группы имеют статистическую достоверность ($p < 0,05$). Это означает, что одновременное введение в полипозную ткань рекомбинантного интерферона и γ -D-глутамил-L-триптофана уменьшает выраженность инфильтрации собственного слоя слизистой оболочки.

В четырехпольной табл. 2 (таблице сопряженности) представлены результаты непараметрической оценки различий между количеством положительных исходов (уменьшение инфильтрации) и отрицательных исходов (инфильтрации без изменений) в полипозной ткани после применения исследуемых препаратов в 1-й и 2-й группах больных с ХПРС, соответственно.

В табл. 3 представлена статистическая достоверность различий положительных и отрицательных исходов морфологических изменений в полипозной ткани больных с ХПРС после применения иммунокорригирующих препаратов.

Результаты исследования, представленные в табл. 2 и 3, показывают, что зависимость положительных исходов морфологических изменений в полипозной ткани больных с ХПРС (уменьшение инфильтрации полипозной ткани) имеет статистическую значимость от $p < 0,001$ до $p < 0,05$ от применения сочетания препаратов рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ и γ -D-глутамил-L-триптофана. Это означает, что введение в полипозную ткань рекомбинантного интерферона в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном способствует снижению выраженности инфильтрации полипозной ткани. Применение только одного рекомбинантного интерферона такого эффекта не дает.

Таблица 1

Средние значения и стандартные отклонения числа клеток в полипозной ткани у пациентов 3-й (контрольной) группы и у больных с хроническим полипозным риносинуситом 1-й и 2-й групп после введения препаратов

Обозначения клеток, группа больных	Среднее значение клеток, М	Стандартное отклонение, SD	Значение t-критерия (Стьюдента)	Критическое значение t-критерия	Уровень значимости, р
Лym, 3-я группа	69,45	12,58	0,58	1,99	0,56
Лym, 1-я группа	66,6	13,4			
Лym, 3-я группа	<u>69,45</u>	12,58	13,82	1,99	<u>0,001</u>
Лym, 2-я группа	<u>25,08</u>	28,6			
Plа, 3-я группа	25,15	12,53	-0,23	1,99	0,8
Plа, 1-я группа	26,75	12,94			
Plа, 3-я группа	<u>25,15</u>	12,53	4,8	1,99	<u>0,001</u>
Plа, 2-я группа	<u>11,0</u>	4,1			

Примечание. Лym — лимфоциты; Plа — плазмоциты; статистически значимые различия средних значений клеток подчеркнуты (p<0,05).

Таблица 2

Результаты положительных и отрицательных морфологических изменений в полипозной ткани больных с хроническим полипозным риносинуситом после применения рекомбинантного интерферона α2b и его сочетания с γ-D-глутамил-L-триптофаном

Группы	Инфильтрация уменьшилась (кол-во человек)	Инфильтрация не изменилась (кол-во человек)	Всего
1-я	5	19	24
2-я	18	6	24
Всего	23	23	48

Примечание. Положительные морфологические изменения — уменьшение инфильтрации полипозной ткани; отрицательные морфологические изменения — инфильтрация полипозной ткани без изменений.

Таблица 3

Критерии значимости различий исходов морфологических изменений в полипозной ткани больных с хроническим полипозным риносинуситом в зависимости от применения рекомбинантного интерферона α2b и его сочетания с γ-D-глутамил-L-триптофаном

Наименование критерия	Значение критерия	Уровень значимости
Критерий χ-квадрат	14,108	p<0,001
Критерий χ-квадрат с поправкой Йейтса	12,021	p<0,001
Критерий χ-квадрат с поправкой на правдоподобие	14,903	p<0,001
Точный критерий Фишера (двусторонний)	0,00022	p<0,05

Морфологическая оценка изменений полипозной ткани при введении в нее рекомбинантного интерферона и его сочетания с γ-D-глутамил-L-триптофаном является информативным подходом, позволяющим, в определенной мере, доказать целесообразность применения иммунокорректирующих препаратов для лечения ХПРС. Качественная визуализация морфологических изменений структуры полипозной ткани демонстрирует уменьшение межтканевого отека и усиление процессов фиброобразования, что, как правило, связывают со снижением активности воспалительного процесса. Однако, качественных различий этих изменений полипозной ткани в группе больных,

которые получали только интерферон, и в группе больных, которым вводили интерферон в сочетании с γ-D-глутамил-L-триптофаном, не наблюдали. Это означает, что для повышения объективности морфологических исследований необходима количественная оценка изменений полипозной ткани, например, оценка числа лимфоцитов, плазмоцитов и т. д., что переводит гистологическую картину изменений полипозной ткани в статистическую область с привлечением параметрических и непараметрических методов анализа. Для параметрической оценки гистологических препаратов полипозной ткани в каждой группе больных с ХПРС было проанализировано более

200 полей зрения. С одной стороны, это позволило установить, что средние значения числа исследованных клеток, а также их мода и медиана, практически совпадают между собой и могут быть представлены законом нормального распределения. С другой стороны, по отношению к контрольной группе больных, на основе t-критерия Стьюдента была показана статистическая достоверность снижения числа лимфоцитов и плазмоцитов собственного слоя слизистой оболочки ($p < 0,05$) в группе больных, которым вводили рекомбинантный интерферон в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном. Это доказывает наличие позитивного противовоспалительного эффекта при введении в полипозную ткань указанных препаратов и подтверждает целесообразность иммунокорригирующей терапии.

Методами непараметрической статистики на основе критерия χ -квадрат доказана зависимость положительных изменений в структуре полипозной ткани (уменьшение клеточной инфильтрации) ($p < 0,001$) в группе больных, которым в полипозную ткань вводили указанные иммунокорригирующие препараты, по сравнению с группой больных, которым вводили только рекомбинантный интерферон. Это также доказывает наличие выраженного противовоспалительного эффекта при комбинированном использовании рекомбинантного интерферона с γ -D-глутамил-L-триптофаном.

Вероятно, сочетание рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ с γ -D-глутамил-L-триптофаном вызывает повышение противовоспалительного эффекта за счет снижения активности провоспа-

лительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12) и увеличения активности противовоспалительного цитокина TGF β , что приводит к уменьшению межклеточного отека и усилению фиброза [7]. Кроме того, γ -D-глутамил-L-триптофан повышает противовоспалительный эффект за счет стимуляции дифференцировки и пролиферации предшественников Т-лимфоцитов, продукции IL-2, IFN γ [6].

Выводы

1. При оценке морфологических изменений полипозной ткани больных с хроническим полипозным риносинуситом на фоне применения иммунокорригирующих средств целесообразно проведение качественного и количественного анализа изображений гистологических препаратов, что повышает информативность исследования.

2. Локальное введение в полипозную ткань сочетания интерферона $\alpha 2b$ с дипептидом γ -D-глутамил-L-триптофаном вызывает выраженное противовоспалительное действие, которое проявляется уменьшением межклеточного отека, усилением процессов фиброобразования и снижением числа лимфоцитов и плазмоцитов, инфильтрирующих собственную пластину слизистой оболочки полипозной ткани.

3. Применение сочетания интерферона $\alpha 2b$ с дипептидом γ -D-глутамил-L-триптофаном является эффективным способом лечения хронического полипозного риносинусита, что позволяет его использовать в качестве консервативной терапии данного заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герасимов А.Н. Медицинская статистика. Москва: МИА, 2007. 480 с. Gerasimov A.N. [Medical Statistics]. Moscow: MIA; 2007. 480 p. Russian.
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Изд-во Фолиант, 2008. 552 с. Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. [Cytokines]. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p. Russian.
3. Козлов В.С., Савлевич Е.Л. Полипозный риносинусит. Современные подходы к изучению патогенеза, диагностике и лечению // Вестник оториноларингологии. 2015. Т. 80. № 4. С. 95–99. Kozlov V.S., Savlevich E.L. [Chronic rhinosinusitis with nasal polyps. The recent trend in the studies of the pathogenesis, diagnosis and treatment of this disease] // Vestnik Otorinolaringologii. 2015. Vol. 80. № 4. P. 95–99. Russian.
4. Павлуш Д.Г., Павлуш Е.Н., Матвеева Н.Ю., Калинин С.Г., Дюйзен И.В. Хронический полипозный риносинусит: этиопатогенетические механизмы его возникновения // Медицина. 2018. Т. 6. № 2 (22). С. 69–78. Pavlush D.G., Pavlush E.N., Matveeva N.Yu., Kalinichenko S.G., Dyuzhen I.V. [Chronic polyposis rhinosinusitis: etiopathogenetic mechanisms of its occurrence] // Meditsina. 2018. Vol. 6. № 2 (22). С. 69–78. Russian.
5. Савлевич Е.Л. Клинико-иммунологическая характеристика применения новых аэрозольных форм рекомбинантных цитокинов для лечения больных с острыми назофарингитами: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. СПб., 2010. 23 с. Savlevich E.L. [Clinical and immunological characteristics of the new aerosol formulations of recombinant cytokines for the treatment of patients with acute nasopharyngitis]: Abstract of Dissertation for the degree of Candidate of Med. Sciences. St. Petersburg, 2010. 23 p. Russian.
6. Шабалдина Е.В. Нарушения системной и локальной иммунной регуляции при гипертрофии миндалин лимфоидного глоточного кольца у детей раннего и дошкольного возраста: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. СПб., 2016. 43 с. Shabal'dina E.V. [Disturbance of systemic and local immune regulation in hypertrophy of tonsils of lymphoid pharyngeal ring in children of early and preschool age]: Abstract of Dissertation for the degree of Doctor of Med. Sciences. St. Petersburg, 2016. 43 p. Russian.
7. Chalise J.P., Narendra S.C., Paudyal B.R., Magnusson M. Interferon alpha inhibits antigen-specific production of proinflammatory cytokines and enhances antigen-specific transforming growth factor beta production in antigen-induced arthritis // Arthritis Res. Ther. 2013. Vol. 15. № 5. R143. doi: 10.1186/ar4326.
8. Bachert C., Pawankar R., Zhang L., Bunnag C., Fokkens W.J., Hamilos D.L., Jirapongsananurak O., Kern R., Meltzer E.O., Mullol J., Naclerio R., Pilan R., Rhee C.S., Suzuki H., Voegels R., Blaiss M. ICON: chronic rhinosinusitis // World Allergy Organ J. 2014. Vol. 7. № 1. P. 25. doi: 10.1186/1939-4551-7-25.
9. Rotter N. Evidence and evidence gaps in therapies of nasal obstruction and rhinosinusitis // GMS Curr. Top. Otorhinolaryngol. Head Neck Surg. 2016. P. 15. Doc06. doi: 10.3205/cto000133.
10. Schleimer R.P. Immunopathogenesis of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis // Annu. Rev. Pathol. 2017. Vol. 12. P. 331–357. doi: 10.1146/annurev-pathol-052016-100401.

Morphologic changes of nasal polyps tissue in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps after local application of recombinant interferon $\alpha 2b$ and γ -D-glutamyl-L-tryptophan

E.V. Bezrukova¹, N.M. Khmel'nitskaya¹, E.V. Vorobeychikov², A.S. Simbirtsev³

¹I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg;

²"Polifarm" Ltd., St. Petersburg;

³State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg

The research is conducted for the purpose of studying the morphological changes in nasal polyps after local application of interferon $\alpha 2b$ and combination of interferon $\alpha 2b$ with γ -D-glutamyl-L-tryptophan. Both interferon $\alpha 2b$ and its combination with γ -D-glutamyl-L-tryptophan caused a reduction in the volume of nasal polyps due to a decrease in intercellular edema and an increase in fibrosis. The use of a combination of these immune preparations led to a decrease in lymphoid infiltration of the lamina propria of the polypous tissue of mucosa. (Cytokines and Inflammation. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 37–42.)

Key words: chronic rhinosinusitis with nasal polyps, interferon $\alpha 2b$, γ -D-glutamyl-L-tryptophan.

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ

**КЛИНИКА
ИММУНОПАТОЛОГИИ**

Отделение аллергологии

**Отделение аутоиммунных
заболеваний**

**Иммунологическое
отделение**

**Отделение гематологии
и трансплантации
костного мозга**

630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14
Телефон: (383) 228-27-41, 236-03-29,
факс: (383) 225-05-22
E-mail: ct_lab@mail.ru

Разработаны новые высокоэффективные клеточные технологии:

- Т-клеточные вакцины в лечении аутоиммунных и аллергических заболеваний.
- Трансплантация клеток костного мозга в лечении цирроза печени, патологии ЦНС, атеросклеротической болезни.
- Вакцины на основе дендритных клеток в лечении онкологических и инфекционно-воспалительных заболеваний.
- ◆ Консультативная помощь врачам.
- ◆ База для обучения специалистов практического здравоохранения.

Индукция синтеза интерлейкинов и активаторов хемотаксиса под действием OmpF порина из *Yersinia pseudotuberculosis* на модели *in vivo*

О.Ю. Портнягина, А.С. Кузьмич, В.А. Хоменко, М.П. Исаева,
Т.Ф. Соловьева, О.Д. Новикова

ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии
им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН, г. Владивосток

Цель: дать характеристику раннего цитокинового ответа после однократной иммунизации мышей рекомбинантным OmpF (rOmpF) порином наружной мембраны псевдотуберкулезного микроба. rOmpF *Y. pseudotuberculosis* был экспрессирован в штамме *E. coli* BL21 (DE3). Белок экстрагировали из телец включения 8 М мочевиной, рефолдинг олигомера порина осуществляли с помощью длительного диализа. Полученный образец белка содержал примесь липополисахарида (ЛПС). Содержание цитокинов в крови мышей, иммунизированных однократно 100 мкг белка, определяли в течение суток (через 2, 4, 6 и 24 ч) с помощью набора ELISArray™ MEM-008A Multi-Analyte Kit (QIAGEN, Нидерланды). Обнаружено, что повышение уровня экспрессии провоспалительных эндогенных медиаторов у мышей, иммунизированных порином *Y. pseudotuberculosis*, обусловлено, в основном, примесью ЛПС. Однако, сравнение активности двух образцов порина: rOmpF, содержащего 0,31 мкг ЛПС на 1 мг белка, и rOmpF/ПМВ, обработанного полимиксином В, позволило выявить действие собственно порина, которое было как стимулирующим (по отношению к IL-6, MIP-1 α , MIP-1 β), так и подавляющим (по отношению к IL-12, IL-1 β и IL-17A). Очевидно, на ранних этапах развития псевдотуберкулезной инфекции OmpF порин и ЛПС действуют на клетки организма-хозяина как единый эндотоксин-белковый комплекс, отдельные компоненты которого могут либо усиливать, либо ингибировать действие друг друга. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 43–49.)

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, рекомбинантный OmpF порин, иммунизация, цитокины, хемокины.

Цитокины являются эндогенными медиаторами воспалительных реакций и иммунного ответа и определяют эффективность работы иммунной системы организма-хозяина при любой инфекции. Патогенные иерсинии обладают набором клеточных факторов, с помощью которых формируются благоприятные условия для внеклеточного размножения бактерий в лимфоидной ткани. Так,

Портнягина Ольга Юрьевна, e-mail: odd64@mail.ru

бактерии некоторых штаммов *Yersinia enterocolitica*, несущие различные плазмиды и имеющие различные наборы белков наружной мембраны (НМ), способны ингибировать синтез NF- κ B в мышинных макрофагах линии J774A, а также подавлять высвобождение TNF α и тем самым повышать чувствительность клеток к апоптозу [11]. Фактор вирулентности LcrV *Y. enterocolitica* индуцирует сигнал, вызывающий секрецию иммуносупрессивного цитокина IL-10 и подавляющий

продукцию TNF α [14]. Убиквитин-подобные цистеиновые протеазы *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* (белки YopJ и YopP) определенным образом изменяют внутриклеточные сигнальные пути, что, в свою очередь, приводит к уменьшению синтеза цитокинов. И, наоборот, иммунизация мышей YopJ-дефицитным штаммом *Y. pseudotuberculosis* приводит к устойчивому синтезу цитокинов [3]. У *Y. pseudotuberculosis* обнаружен также белок YopB, который, помимо наличия мембранодеструктивной активности, препятствует высвобождению TNF α макрофагами [1].

Изучение влияния компонентов НМ бактерий, в том числе бактерий рода *Yersinia*, на иммунный ответ макроорганизма с помощью модели *in vivo* в настоящее время используется достаточно редко. Тем не менее, считают, что экспериментальная инфекция у грызунов (мышей, крыс, кроликов) в общих чертах воспроизводит патогенез иерсиниозов у человека [8]. Определение уровней различных цитокинов в сыворотке крови иммунизированных животных позволяет судить об особенностях развития защитных реакций организма, в отличие от экспериментов *in vitro* с использованием клеточных линий, которые показывают функциональное состояние только соответствующих клеток.

В настоящей работе было исследовано действие одного из иммунодоминантных компонентов НМ псевдотуберкулезного микроба, неспецифического белка OmpF порообразующего типа, на синтез цитокинов и хемокинов у мышей после однократной иммунизации. В качестве антигена был использован рекомбинантный порин НМ *Y. pseudotuberculosis* (rOmpF).

Материалы и методы

Экспрессию rOmpF *Y. pseudotuberculosis*, экстракцию его из телец включения и рефолдинг тримера порина проводили в соответствии с процедурой, описанной в работе [13]. Содержание эндотоксина (липолисахарида (ЛПС)) в образцах rOmpF определяли с помощью набора для количественного определения эндотоксина *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) («Thermo», США) в соответствии с протоколом производителя. Обработку rOmpF полимиксином В (ПМВ) проводили в соответствии со способом, описанным в работе [4]. В результате был получен образец рекомбинантного порина rOmpF/ПМВ.

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с положениями Директивы N 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского союза «О защите животных, используемых в научных целях». Мышей линии BALB/c (самки 4–8 недель, весом 20 $\pm$ 2 г, две группы по 20 животных для каждого образца белка), иммунизировали однократно образцами rOmpF и rOmpF/ПМВ в количестве 100 мкг на мыш. Забор крови для получения сыворотки от 5 животных каж-

дой группы проводили в течение суток, через 2, 4, 6, и 24 ч. В качестве контроля использовали пуловую сыворотку крови от 5 неиммунизированных мышей.

Содержание цитокинов в пуловой сыворотке крови иммунизированных животных определяли, используя набор «ELISAArray™ MEM-008A Multi-Analyte Kit» («QIAGEN», Нидерланды) в соответствии с протоколом производителя. Базовый уровень цитокинов в неиммунной сыворотке, выраженный в единицах оптической плотности, принимали за 100 %, а изменение содержания цитокинов в эксперименте выражали в процентах (%) относительно базового уровня.

Статистическую обработку результатов, включая расчет стандартного отклонения от среднего значения ($\pm$ SD), проводили с помощью операционной системы Windows XP с использованием пакета программного обеспечения Excel.

Результаты и обсуждение

Порообразующие белки НМ грамотрицательных бактерий играют важную роль во взаимодействии между организмом хозяина и патогеном. Порины являются высокоактивными антигенами, которые стимулируют специфические иммунные реакции макроорганизма. Антитела к поринам обнаруживаются в сыворотке крови как после вакцинации экспериментальных животных, так и у людей при естественном развитии инфекции [2, 6].

Ранее мы показали, что иммунизация мышей BALB/c rOmpF стимулирует развитие кислородозависимой бактерицидной активности фагоцитов и гуморального иммунного ответа [13]. В данной работе мы рассмотрели изменение содержания некоторых провоспалительных и регуляторных цитокинов (TNF α , IL-6, IL-12, IL-1 β , IL-17A) и хемокинов (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MDC, зотаксина, SDF-1, MCP-1) в крови мышей в течение 24 ч после однократного введения rOmpF *Y. pseudotuberculosis*. Интервал наблюдения за изменением уровней цитокинов и хемокинов в экспериментах на животных был выбран в соответствии с данными о динамике накопления TNF α и IL-6 в сыворотке крови мышей, иммунизированных ЛПС из *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598 Ib серовара), описанными в работе [10]. Согласно полученным данным, максимальная концентрация этих провоспалительных цитокинов наблюдалась, соответственно, через 2 и 8 ч после однократного введения ЛПС, а через 24 ч количество цитокинов было близко к контрольным значениям у интактных животных. Кроме того, известно, что обработка клеток (U937, THP-1 и макрофагов, полученных из костного мозга мыши) поринами, выделенными из *Neisseria* и *Salmonella*, приводила к экспрессии мРНК и высвобождению некоторых цитокинов в течение первых 24 ч после антигенной стимуляции [5, 12].

В нативной бактериальной мембране порин и липополисахарид связаны нековалентной, но очень прочной связью, что обуславливает взаимозависимость проявления их биологических свойств. Для того, чтобы оценить влияние собственно порина на продукцию цитокинов, мы сравнили стимулирующую активность двух образцов рекомбинантного белка: rOmpF, содержащего при-

месь эндотоксина (0,31 мкг ЛПС на 1 мг rOmpF), и rOmpF/ПМВ, обработанного полимиксином В (для связывания и нейтрализации ЛПС).

Как показано на рис. 1, а–е, через 4–6 ч уровни зотаксина, MDC, RANTES, IL-12, IL-1 β в крови иммунизированных мышей после инъекции rOmpF значительно увеличились. Напротив, при иммунизации животных rOmpF/ПМВ уровни

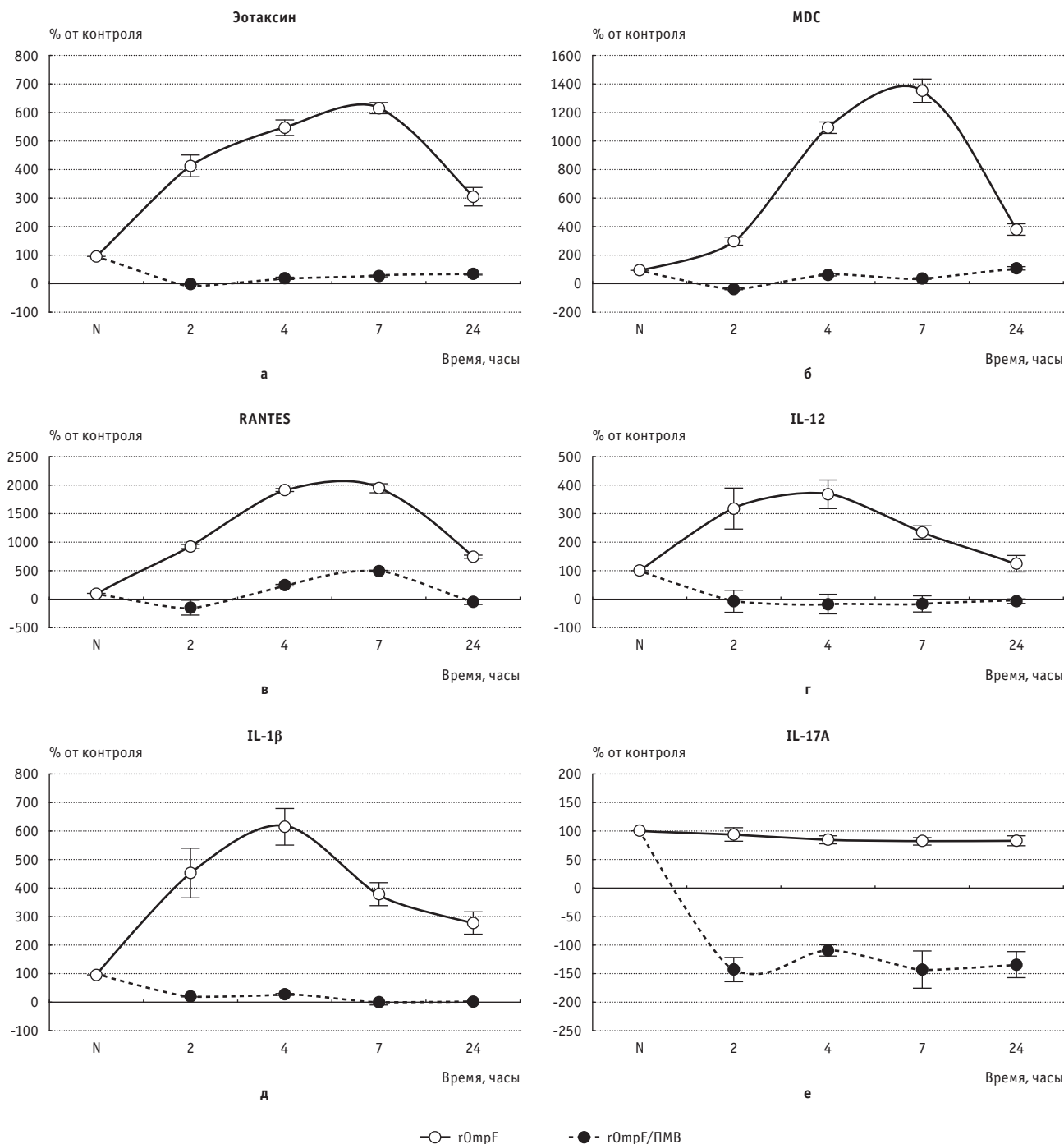


Рис. 1. Изменение содержания хемокинов (зотаксин, MDC, RANTES) (а, б, в) и цитокинов (IL-12, IL-1 β , IL-17A) (г, д, е) (% контроля) в сыворотке крови мышей BALB/c после однократного введения rOmpF и rOmpF/ПМВ, 100 мкг/мышь

Здесь и на рис. 2–3: ПМВ — полимиксин В; для получения иммунной сыворотки отбор проб крови проводили через 2, 4, 6 и 24 ч; первая точка на графике соответствует уровню цитокинов в неиммунной сыворотке, которая принята за 100%; данные приведены как средние значения трех независимых экспериментов с учетом стандартного отклонения; * — значительные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). Точка N на оси абсцисс соответствует уровню контроля, принятого за 100%.

эотаксина и MDC практически не изменились (см. **рис. 1, а, б**), а уровни IL-12, IL-1 β значительно снизились по сравнению с таковыми не только в иммунных сыворотках после введения rOmpF, но и в неиммунной сыворотке (см. **рис. 1, д, е**). IL-12 и IL-1 β относятся к провоспалительным цитокинам, которые синтезируются преимущественно макрофагами и моноцитами. Оба этих цитокина играют ключевую роль в развитии и регуляции как специфических, так и неспецифических защитных реакций организма.

Содержание хемокина RANTES, определенное в сыворотке через 6 ч после иммунизации rOmpF/ПМВ, было намного ниже по сравнению с его уровнем после иммунизации rOmpF, но в 5 раз превышало его уровень в неиммунной сыворотке (см. **рис. 1, в**). Этот хемокин продуцируется эпителиальными клетками, лимфоцитами, тромбоцитами и играет важную роль в различных типах иммунного ответа, действуя как сильный хемоаттрактант для моноцитов, лимфоцитов, эозинофилов и базофилов.

Обнаружен ингибирующий эффект порина на экспрессию интерлейкинов IL-12, IL-1 β и IL-17A (см. **рис. 1, е**). Интересно то, что иммунизация rOmpF привела лишь к небольшому снижению уровня IL-17A. Однако в случае rOmpF/ПМВ через 2 ч после иммунизации наблюдалось резкое снижение содержания IL-17A, и такой чрезвычайно низкий уровень медиатора по сравнению с неиммунной сывороткой поддерживался на протяжении всего времени эксперимента. Основная функция провоспалительного IL-17A заключается в вовлечении множества различных клеток в воспалительный ответ на бактериальную инвазию посредством индукции экспрессии определенных цитокинов, хемокинов и металлопротеиназ [12]. Отсутствие IL-17A и/или нарушение функций хелперных клеток Th17, продуцирующих этот интерлейкин, приводят к увеличению

бактериальной нагрузки и повышенной восприимчивости организма к инфекционным агентам [9].

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что активация синтеза эотаксина, MDC, RANTES, IL-12, IL-1 β в большей степени обусловлена примесью ЛПС в образце порина. В то же время под действием собственно порина, скорее всего, происходит ингибирование синтеза IL-12, IL-1 β и IL-17A, что может приводить к ослаблению воспалительной реакции у мышей. В связи с этим можно предположить, что порин действует так же, как и другие факторы вирулентности иерсиний, обеспечивая длительную персистенцию и выживаемость бактерий в клетках организма-хозяина [1].

Динамика накопления SDF-1 и MCP-1 после введения обоих образцов рекомбинантного порина показана на **рис. 2, а, б**. Эти факторы являются важными компонентами системы врожденного иммунитета, обеспечивающими бактериальный клиренс при попадании патогена в организм. Стромальный клеточный фактор SDF-1, являющийся сильным хемоаттрактантом для нейтрофилов, способствует их миграции к месту проникновения патогена, а хемотактический фактор моноцитов MCP-1 помогает превращать моноциты в макрофаги. Было показано, что введение обоих образцов порина приводит к уменьшению количества SDF-1 по сравнению с неиммунной сывороткой (см. **рис. 2, а**), однако через 24 ч исходный уровень этого хемоаттрактанта восстанавливался. Этот результат указывает на то, что оба основных компонента НМ *Y. pseudotuberculosis* (ЛПС и порин) могут выступать в качестве ингибиторов синтеза SDF-1 на ранних стадиях иммунного ответа.

Что касается MCP-1, было обнаружено, что присутствие примеси ЛПС в образце порина имеет решающее значение для экспрессии этого хемоаттрактанта. Так, после введения rOmpF со-

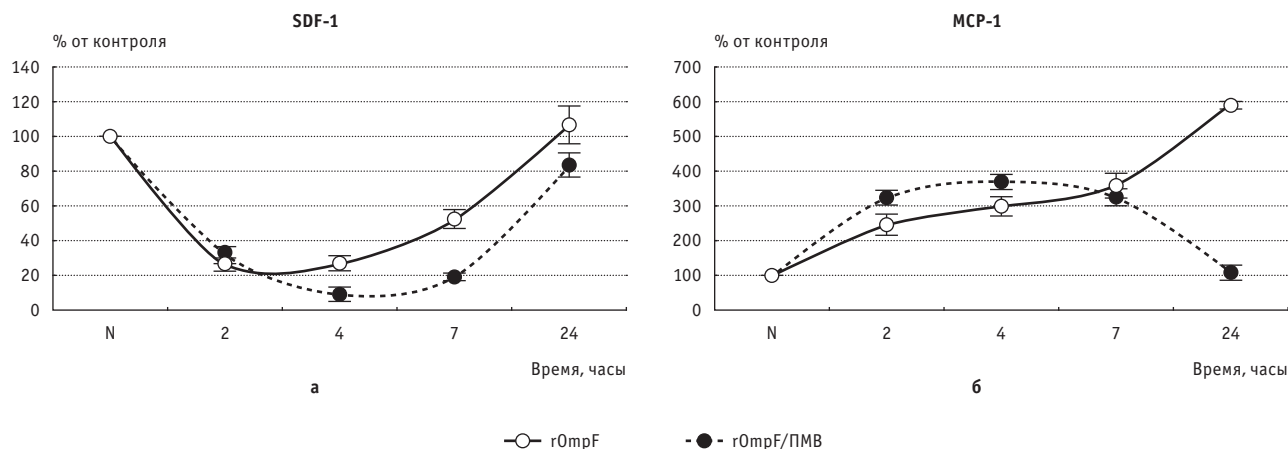


Рис. 2. Изменение содержания хемокинов SDF-1 (а) и MCP-1 (б) (% от контроля) в сыворотке крови мышей BALB/c после однократного введения rOmpF и rOmpF/ПМВ, 100 мкг/мышь

держание МСР-1 постепенно увеличивалось и через 24 ч достигало концентрации в 6 раз выше, чем в неиммунной сыворотке (см. **рис. 2, б**). Однако в случае *gOmpF*/ПМВ наблюдалась только кратковременная стимуляция синтеза МСР-1: через 4 ч уровень МСР-1 увеличился в 3 раза, а затем постепенно уменьшался и через 24 ч от начала эксперимента возвращался к исходному уровню.

При определении содержания IL-6, MIP-1 α , MIP-1 β в сыворотке иммунизированных животных (**рис. 3, а–в**) для обоих образцов порина был обнаружен стимулирующий эффект.

Однако уровень этих цитокинов после иммунизации *gOmpF* был меньше, чем в случае *gOmpF*/ПМВ. Таким образом, присутствие примеси ЛПС в образце порина *gOmpF* приводило к значительному подавлению синтеза IL-6: по сравнению с иммунизацией *gOmpF*/ПМВ содержание этого цитокина уменьшалось в 5 раз (см. **рис. 3, а**).

Значительно менее эффективно примесь ЛПС действовала на синтез MIP-1 α и MIP-1 β , тем не менее, содержание этих медиаторов после иммунизации мышей *gOmpF* также уменьшалось в 2 и 1,55 раза, соответственно (см. **рис. 3, б, в**). Таким

образом, можно предположить, что активация синтеза IL-6, MIP-1 α и MIP-1 β в большей степени обусловлена собственно *OmpF* порином. Известно, что макрофагальные белки воспаления MIP-1 α и MIP-1 β являются не только хемоаттрактантами, но также действуют как коактиваторы макрофагов, а IL-6 синтезируется активированными макрофагами и Т-клетками. IL-6 действует как провоспалительный, так и противовоспалительный цитокин, он в значительной степени стимулирует иммунный ответ, индуцируя синтез белков острой фазы, которые, в свою очередь, усиливают местное воспаление и мобилизуют антимикробную защиту организма. Однако перепроизводство IL-6 в макроорганизме может вызвать повреждение тканей вследствие аутоиммунной реакции [7].

Вместе с IL-6 ведущую роль в индукции ответа острой фазы и защите хозяина от бактериальной инфекции играет также TNF α . Через 2 ч после введения обоих образцов рекомбинантного порина наблюдалось резкое, но кратковременное увеличение уровня TNF α (см. **рис. 3, г**). А затем, к концу периода наблюдения, через 24 ч, в случае им-

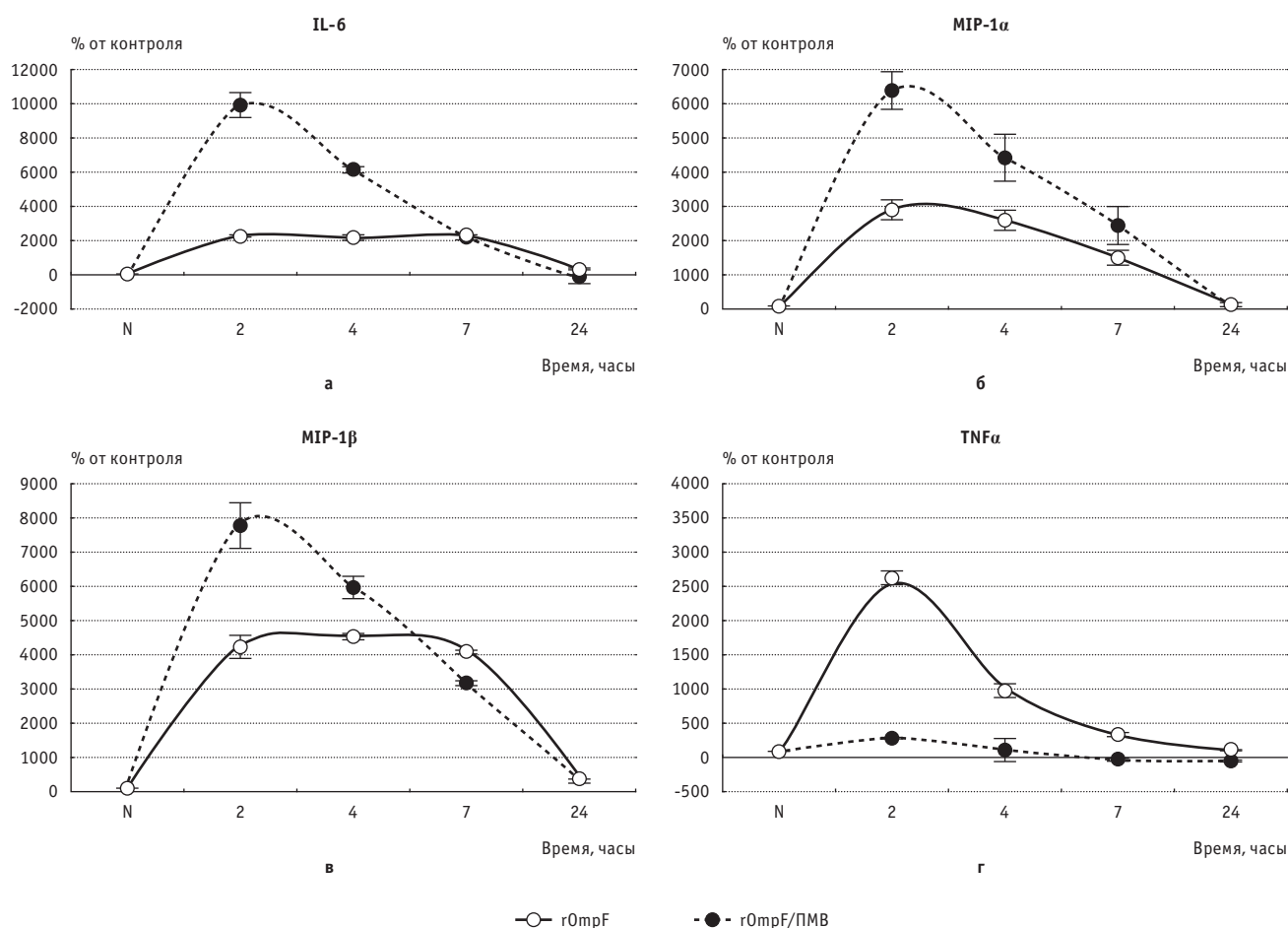


Рис. 3. Изменение содержания цитокинов IL-6 (а), TNF α (г) и хемокинов MIP-1 α (б), MIP-1 β (в) (% контроля) в сыворотке крови мышей BALB/c после однократного введения *gOmpF* и *gOmpF*/ПМВ, 100 мкг/мышь

мунизации rOmpF уровень TNFα в сыворотке возвращался к начальному значению, а в сыворотке мышей, иммунизированных rOmpF/ПМВ, количество этого цитокина значительно уменьшалось по сравнению с таковым в неиммунной сыворотке. Вероятно, именно порин оказывает значительный супрессирующий эффект на синтез TNFα, развивающийся через 4 ч после введения антигена. В случае образца rOmpF это воздействие, очевидно, частично нивелируется присутствием ЛПС.

Таким образом, показано существенное влияние порина *Y. pseudotuberculosis* на синтез провоспалительных цитокинов IL-6 и TNFα, которые оказывают разностороннее действие на иммунную систему макроорганизма как на клеточном, так и на гуморальном уровне. Вероятно, при естественном течении инфекционного процесса, порин OmpF способствует развитию местной воспалительной реакции организма на ранней стадии развития иммунного ответа. Однако, наблюдая последующее снижение уровня экспрессии этих цитокинов, особенно TNFα, можно предположить, что именно порин препятствует дальнейшей системной активации иммунных реакций хозяина, которая в значительной степени обусловлена IL-6 и TNFα. В таком поведении ярко проявляется дуализм иммунобиологических свойств этого компонента НМ бактерий.

Липополисахарид как основной активатор клеток иммунной системы традиционно используется для экспериментов *in vitro*. Однако в литературе существуют данные о том, что порообразующий белок может снижать интенсивность провоспалительных реакций, индуцированных липополисахаридом в клетках различных линий [15]. Использование двух разных образцов рекомбинантного порина, rOmpF и rOmpF/ПМВ, позволило нам не только изучить динамику изменения уровней отдельных медиаторов иммунного ответа на OmpF порин у мышей, но и дифференцировать влияние собственно порина и липополисахарида на иммунные реакции подопытных животных на ранних стадиях развития инфекции. Мы обнаружили, что ЛПС-опосредованный стимулирующий эффект на уровень различных медиаторов иммунного ответа может модулироваться разнонаправленным действием порина — как подавляющим (по отношению к IL-12, IL-1β и IL-17A), так и выраженным стимулирующим (по отношению к IL-6, MIP-1α, MIP-1β). Очевидно, во время развития псевдотуберкулезной инфекции порины и липополисахариды действуют на клетки организма-хозяина как единый эндотоксин-белковый комплекс, отдельные компоненты которого могут либо усиливать, либо ингибировать действие друг друга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2002. Т. 4. № 3. С. 248–266.
Tseneva G.Ia., Solodovnikova N.Yu., Voskresenskaia E.A. [Molecular aspects of *Yersinia* virulence] // Klin. Mikrobiol. Antimikrob. Khimioter. 2002. Vol. 4. № 3. P. 248–266. Russian.
2. Achouak W., Heulin T., Pages J.M. Multiple facets of bacterial porins // FEMS Microbiol. Lett. 2001. Vol. 199. № 1. P. 1–7.
3. Auerbuch V., Isberg R.R. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice occurs independently of Toll-like receptor 2 expression and induction of interleukin-10 // Infect. Immun. 2007. Vol. 75. № 7. P. 3561–3570.
4. Blanchard D.K., Klein T.W., Friedman H., Stewart W.E. Induction of Gamma Interferon by Endotoxin in "Aged" Murine Splenocyte Cultures // In: Immunobiology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins / Ed. By A. Szentivanyi, H. Friedman, A. Nowotny. University of South Florida International Biomedical Symposia series. New York–London: Plenum press, 1986. P. 353–358.
5. Finamore E., Vitiello M., D'Isanto M., Galdiero E., Falanga A., Kampanaraki A., Raieta K., Galdiero M. Evidence for IL-6 promoter nuclear activation in U937 cells stimulated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium porins // Eur. Cytokine Netw. 2009. Vol. 20. № 3. P. 140–147.
6. Galdiero S., Falanga A., Cantisani M., Tarallo R., Della Pepa M.E., D'Orlando V., Galdiero M. Microbe-host interactions: structure and role of gram-negative bacterial porins // Curr. Prot. Pept. Sci. 2012. Vol. 13. № 8. P. 843–854.
7. Galindo C.L., Rosenzweig J.A., Kirtley M.L., Chopra A.K. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in human yersiniosis // J. Pathog. 2011. Vol. 2011. P. 182051. doi: 10.4061/2011/182051.
8. Heesemann J., Gaede K., Autenrieth I. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rodents: a model for human yersiniosis // APMIS. 1993. Vol. 101. № 6. P. 417–429.
9. Kara E., Comerford I., Fenix K.A., Bastow C.R., Gregor C.E., McKenzie D.R., McColl S.R. Tailored immune responses: novel effector helper T cell subsets in protective immunity // PLoS Pathog. 2014. Vol. 10. № 2. P. e1003905. doi: 10.1371/journal.ppat.1003905.
10. Kuznetsova T.A., Besednova N.N., Somova L.M., Plekhova N.G. Fucoidan extracted from *Fucus evanescens* prevents endotoxin-induced damage in a mouse model of endotoxemia // Mar. Drugs. 2014. Vol. 12. № 2. P. 886–898.
11. Philip N.H., Brodsky I.E. Cell death programs in *Yersinia* immunity and pathogenesis // Front. Cell Infect. Microbiol. 2012. Vol. 2. P. 149. doi: 10.3389/fcimb.2012.00149.
12. Platt A., MacLeod H., Massari P., Liu X., Wetzler L. In vivo and in vitro characterization of the immune stimulating activity of the Neisserial porin PorB // PLoS One 2013. Vol. 8. № 12. P. e82171. doi: 10.1371/journal.pone.0082171.
13. Portnyagina O., Sidorova O., Khomenko V., Novikova O., Issaeva M., Solov'eva T. Immunochemical properties of recombinant OmpF porin from outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis* // In: Trends in Immunolabelled and Related Techniques, ed. By E. Abuelzein. Publ.InTech, Croatia, 2012. P. 243–258.
14. Reithmeier-Rost D., Bierschenk S., Filippova N., Schroder-Braunstein J., Sing A. *Yersinia* V antigen induces both TLR homo- and heterotolerance in an IL-10-involving manner // Cell. Immunol. 2004. Vol. 231. № 1–2. P. 63–74.
15. Sakharwade S.C., Mukhopadhyaya A. *Vibrio cholerae* porin OmpU induces LPS tolerance by attenuating TLR-mediated signaling // Mol. Immunol. 2015. Vol. 68. № 2 (Pt. A). P. 312–324.

Induction of interleukin and hemotaxis activators synthesis under the action of OmpF porin from *Yersinia pseudotuberculosis* in vivo

O.Iu. Portnyagina, A.S. Kuz'mich, V.A. Khomenko,
M.P. Isaeva, T.F. Solov'eva, O.D. Novikova

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry,
Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok

The aim: to characterize the early cytokine response after a single immunization of mice with recombinant OmpF (rOmpF) porin of the outer membrane of the pseudotuberculosis microbe. *Yersinia pseudotuberculosis* rOmpF was expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Protein was extracted from inclusion bodies with 8 M urea, refolding of porin oligomer was performed using exhaustive dialysis. The resulting protein sample contained an admixture of lipopolysaccharide (LPS). The content of cytokines in the blood of mice immunized once with 100 µg of the protein was determined during the day (after 2, 4, 6 and 24 hours) using the ELISArray™ MEM-008A Multi-Analyte Kit (QIAGEN, the Netherlands). An increase in the expression level of pro-inflammatory endogenous mediators in mice immunized with *Y. pseudotuberculosis* porin was found to be mainly due to LPS admixture. However, a comparison of the activity of two porin samples: rOmpF, containing 0.31 µg LPS per 1 mg of protein, and rOmpF treated with polymyxin B (rOmpF/PMB), revealed the effect of the porin itself, which was stimulatory (for IL-6, MIP-1α, MIP-1β), and suppressive (for IL-12, IL-1β and IL-17A). Obviously, in the early stages of the development of pseudotuberculosis infection, OmpF porin and LPS act on the cells of the host organism as a single endotoxin-protein complex, the individual components of which can either strengthen or inhibit the action of each other. (Cytokines and Inflammation. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 43–49.)

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, recombinant OmpF porin, immunization, cytokines, chemokines.

Субпопуляционный состав цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови и спинномозговой жидкости при рассеянном склерозе

И.В. Кудрявцев¹, А.Г. Ильвес², О.М. Новоселова²,
К.С. Рубаник², М.К. Серебрякова¹, Л.Н. Прахова²

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

² ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург

С применением многоцветной проточной цитометрии проведен анализ основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов (Тцит), выявленных на основании экспрессии CD45RA и CD62L в парных образцах периферической крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) больных рассеянным склерозом (РС) в период обострения (n=32) и период ремиссии (n=20), а также в периферической крови условно здоровых доноров (n=51). При обострении РС наблюдается снижение относительного содержания CD3⁺CD4⁺ и соотношения CD4/CD8 лимфоцитов в ликворе. При анализе образцов периферической крови, полученных от больных РС в период обострения, были выявлены обратные зависимости между баллами шкалы EDSS и абсолютным ($r=-0,430$ при $p=0,014$) и относительным ($r=-0,502$ при $p=0,003$) содержанием CD45RA⁺CD62L⁺ Тцит. При ремиссии РС относительное содержание CD45RA⁺CD62L⁺ Тцит снижалось до 8,70 % (6,51; 11,63), что было достоверно ($p=0,005$) ниже значений контрольной группы — 12,18 % (10,38; 15,24), хотя и не отличалось ($p=0,114$) от значений больных в период обострения — 11,31 % (8,28; 13,90). Анализ образцов ликвора выявил, что при рецидиве РС имеет место увеличение ($p=0,027$) уровня ЕМ Тцит до 8,16 % (6,40; 11,40), тогда как в период ремиссии лимфоциты данной популяции составляли 6,49 % (4,51; 8,39) от общего числа CD3⁺ клеток СМЖ. При обострении РС, как правило, наблюдается положительная взаимосвязь между относительным содержанием отдельных субпопуляций Тцит в СМЖ и процентным содержанием, а также концентрацией аналогичных популяций Т-лимфоцитов в периферической крови. Обратная зависимость между уровнем ЕМ Тцит, циркулирующих в СМЖ, и «наивными» клетками периферической крови может объясняться тесной связью между этими двумя популяциями Тцит и клиническими проявлениями РС (в баллах по шкале EDSS). В период ремиссии большая часть этих зависимостей нарушается. Дальнейшие исследования динамики изменения цитотоксических Т-клеток в периферической крови и СМЖ помогут приблизиться к пониманию патогенеза РС, а также позволят обнаружить новые маркеры прогноза развития и течения данного заболевания. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 50–57.)

Ключевые слова: проточная цитометрия, рассеянный склероз, цитотоксические Т-лимфоциты, CD45RA и CD62L, спинномозговая жидкость.

Патогенез рассеянного склероза (РС) традиционно связывают с появлением в организме больного аутореактивных клонов Т-хелперов, способных проникать через гематоэнцефалический барьер и мигрировать в нервную ткань, но в последние годы

все большее внимание уделяется роли цитотоксических Т-лимфоцитов (Тцит) в развитии данного заболевания. Многочисленные исследования функциональных особенностей Тцит показали, что эти клетки, подобно Т-хелперам 17, способны продуцировать широкий спектр провоспалительных цитокинов, вызывающих нарушения целост-

Кудрявцев Игорь Владимирович, e-mail: igorek1981@yandex.ru

ности гематоэнцефалического барьера, что делает его проницаемым для иммунных клеток, циркулирующих в периферической крови [26]. С использованием молекулярно-биологических методов было показано, что у больных РС в периферической крови, спинномозговой жидкости (СМЖ) и в участках поражения нервной ткани обнаруживались $CD3^+CD8^+$ лимфоциты всего лишь нескольких клонов, выявленных на основании анализа последовательности CDR3 участка Т-клеточного рецептора (TcR) [24]. Более того, такая узко специфическая олигоклональность клеток была характерна только для цитотоксических Т-лимфоцитов, тогда как популяция Т-хелперов во всех исследованных тканях была весьма гетерогенна с точки зрения строения TcR. Эти результаты подтверждаются современными исследованиями, указывающими на то, что большинство клонов $CD3^+CD8^+$ клеток, обнаруживаемых в составе очагов поражения нервной системы, обычно представлены на значительном уровне и в периферической крови больных [20].

Другим важнейшим фактором, свидетельствующим о существенной роли цитотоксических Т-лимфоцитов в патогенезе РС, являются результаты генетических исследований, указывающих на значимость некоторых аллельных форм молекул главного комплекса гистосовместимости I класса, распознавание которых связано с функциональной активностью именно $CD3^+CD8^+$ клеток. Показано, что вероятность развития РС резко возрастала при наличии у пациентов аллели HLA-A*0301, тогда как присутствие в геноме аллели HLA-A*0201 существенно снижало риски развития данной патологии [9]. Анализ гистохимического строения зон поражения нервной ткани выявил, что в составе периваскулярных лимфатических скоплений, встречающихся по периферии активных демиелинизирующих бляшек, относительное содержание $CD8^+$ Т-лимфоцитов в пятьдесят и более раз превосходит содержание Т-хелперов [10]. Хотя в настоящее время чаще указывается, что соотношение $CD8/CD4$ в рамках очагов составляет, в среднем, 10:1 [16]. В зонах воспаления с демиелинизированными нервными волокнами отмечается накопление зрелых эффекторных $CD8^+$ Т-клеток, несущих в своей цитоплазме гранулы с гранзимом В, способным вызывать апоптоз в клетках-мишенях [16]. Накопление $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов в составе очагов поражения нервной ткани тесно связано с уровнем демиелинизации поврежденных аксонов [5].

К направленной миграции в очаги воспаления способны только зрелые Т-клетки, прошедшие антиген-зависимую дифференцировку в периферических лимфоидных органах, утратившие молекулы «хоуминга» в лимфоидную ткань, но обладающие выраженными эффекторными свой-

ствами и необходимым набором «адресинов» для проникновения в нервную ткань. Именно этим группам Т-клеток, способным синтезировать эффекторные цитокины и разрушать клетки-мишени за счет секреции перфоринов и гранзимов, отводится ключевая роль в патогенезе различных заболеваний, включая РС. Поэтому целью данной работы стал анализ субпопуляционного состава Т-клеток периферической крови и СМЖ больных РС, а также поиск взаимосвязей между отдельными популяциями клеток различной локализации в периоды обострения и ремиссии РС.

Материалы и методы

Объектом исследования служила венозная кровь и СМЖ больных с рецидивирующим РС ($n=52$), полученные путем пункции кубитальной вены и люмбальной пункции, соответственно, и собранные в вакуумные пробирки с содержанием K_2EDTA . Группой сравнения служили образцы периферической крови, полученные от 51 условно здорового добровольца. Диагноз РС устанавливали согласно критериям МакДональда [21]. В исследование вошли пациенты, никогда не получавшие препаратов, изменяющих течение РС (ПИТРС), и системных кортикостероидов в течение последних 90 дней. Все больные были разделены на две группы: находившиеся в стадии ремиссии ($n=20$) и клинического обострения ($n=32$). Под обострением понимали острое (в течение нескольких часов) или подострое (в течение нескольких дней) появление новой или усугубление имеющейся очаговой неврологической симптоматики, сохранявшееся не менее 48 часов при отсутствии лихорадки и других возможных причин псевдообострения. Результаты магнитно-резонансного томографического исследования (накопление очагами контраста) при определении наличия обострения не учитывались. Всем пациентам проводили стандартный неврологический осмотр с последующей балльной оценкой степени поражения функциональных систем: зрительной, пирамидной, мозжечковой, чувствительной, функций тазовых органов, ствола мозга. Также подсчитывали балл по интегративной шкале EDSS — расширенной шкале инвалидизации [14].

Обе группы пациентов не различались по половому и возрастному составу. Исследования были проведены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 года и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследование одобрено Комиссией по этике ФГБУН «Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева» РАН 23 октября 2014 года.

Все исследования проводили в день взятия образцов. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями производителей антител. Для выявления основных популяций Т-клеток в случае образцов периферической крови применяли следующую панель моноклональных антител,

конъюгированных с различными флуорохромами (все анти-тела производства «Beckman Coulter», США): CD62L-ECD (клон DREG56, кат. № IM2713U), CD3-APC (клон UCHT1, кат. № IM2467), CD8-APC-Alexa Fluor 700 (клон B9.11, кат. № A66332), CD45RA-APC-Alexa Fluor 750 (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4), кат. № A86050), CD4-Pacific Blue (клон 13B8.2, кат. № A82789), CD45-Krome Orange (клон J.33, кат. № A96416). Указанным набором моноклональных антител окрашивали 100 мкл периферической крови в соответствии с рекомендациями производителя. Удаление эритроцитов из образцов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse (кат. № A09777), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800).

Для анализа образцов СМЖ больных РС применяли следующий набор моноклональных антител: CD45RA-FITC (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4), кат. № 6603117), CD56-PE (клон N 901 (NKH-1), кат. № A07788), CD62L-ECD (клон DREG56, кат. № IM2713U), CD8-PC5.5 (клон B9.11, кат. № B21205), CD4-PC7 (клон SFC112T4D11 (T4), кат. № 737660), CD3-APC (клон UCHT1, кат. № IM2467), CD45-Krome Orange (клон J.33, кат. № A96416). Непосредственно после пункции образцы СМЖ однократно отмывали избытком физиологического раствора с pH 7,2–7,4 (330 г, 7 минут), клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл свежего физиологического раствора и окрашивали указанным выше набором антител. По завершении 15-минутной инкубации в образцы вносили по 200 мкл физиологического раствора, содержащего 2% нейтрального параформальдегида (кат. № HT5011, «Sigma-Aldrich», США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ («Beckman Coulter», США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Для выявления основных популяций Тцит периферической крови использовали алгоритм, детально описанный ранее [2]. Анализ образцов СМЖ проводили с использованием тактики «гейтирования», приведенной на рис. 1. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ «Navios Software v.1.2» и «Kaluza™ v.1.2» («Beckman Coulter», США).

Статистическую обработку проводили при помощи пакетов программ «Statistica 8.0» («StatSoft», США) и «GraphPad Prism 4.00» for Windows («GraphPad Prism Software Inc.», США). Результаты, полученные в ходе исследования относительного содержания различных субпопуляций цитотоксических Т-клеток, приводили в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_{25} и Q_{75}). Для сравнения относительного содержания различных субпопуляций Тцит в периферической крови и СМЖ применяли критерий Вилкоксона для парных выборок, тогда как корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции r Спирмена.

Результаты и обсуждение

В периферической крови больных РС в период ремиссии относительное и абсолютное содержание общей популяции $CD3^+$ клеток не изменялось достоверно ($p=0,295$ и $p=0,277$, соответственно)

по сравнению с группой контроля, тогда как у больных РС при обострении было отмечено снижение этих показателей с 78,10% (72,95; 83,61) и 1327 кл/мкл (11,24; 1651) до 75,55% (66,64; 77,90) и 1205 кл/мкл (900; 1466), соответственно (при $p=0,026$ и $p=0,043$). Также выявлена обратная зависимость между относительным содержанием $CD3^+CD8^+$ в рамках общей популяции лимфоцитов и баллом по шкале EDSS ($r=-0,448$ при $p=0,010$). При сравнении относительного и абсолютного содержания Тцит периферической крови во всех трех группах выявлено достоверное ($p=0,042$) снижение Тцит у больных РС в период ремиссии по сравнению с контролем (394 кл/мкл (282; 439) против 443 кл/мкл (365; 530), соответственно). Сходные изменения были отмечены и другими группами исследователей. Так, у больных РС в периферической крови повышалось соотношение $CD4/CD8$ лимфоцитов, главным образом, за счет снижения относительного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов [7]. Данное обстоятельство было связано с уменьшением в циркуляции уровня $CD28^-CD8^+$ лимфоцитов, тогда как относительное содержание $CD28^+CD8^+$ клеток достоверно не различалось между сравниваемыми группами. В рамках другого исследования также отмечено снижение общего пула циркулирующих $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов за счет уменьшения уровней клеток эффекторной памяти (ЕМ) и эффекторных клеток (TEMRA) в периферической крови [19].

Лимфоциты, выявлявшиеся в составе СМЖ больных РС, были представлены в основном Т-клетками с фенотипом $CD3^+$, относительное содержание которых в период ремиссии находилось в пределах 94,56% (91,89; 95,70), тогда как на фоне обострения составляло 93,71% (91,64; 95,32). Более того, у больных РС в период обострения отмечена обратная зависимость между уровнями этих клеток в СМЖ и баллом по шкале EDSS ($r=-0,504$ при $p<0,001$). Анализ основных популяций $CD3^+$ лимфоцитов СМЖ показал, что при обострении РС наблюдается снижение относительного содержания $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов до 64,16% (55,41; 68,91) по сравнению с образцами от пациентов в период ремиссии (70,67% (63,82; 72,41) при $p=0,016$). Уровень цитотоксических Т-клеток при обострении несколько увеличивался, хотя достоверных различий по данному показателю между группами отмечено не было (23,81% (19,33; 28,43) против 19,09% (16,77; 23,06) при $p=0,100$). Вместе с тем, соотношение $CD4/CD8$ лимфоцитов в период рецидива РС достоверно ($p=0,043$) снижалось до 2,55 (2,13; 3,67) с 3,44 (3,02; 4,40) в период ремиссии. Данные литературы также указывают на то, что основным типом циркулирующих лимфоцитов в СМЖ являются Т-клетки, составляющие по некоторым оценкам

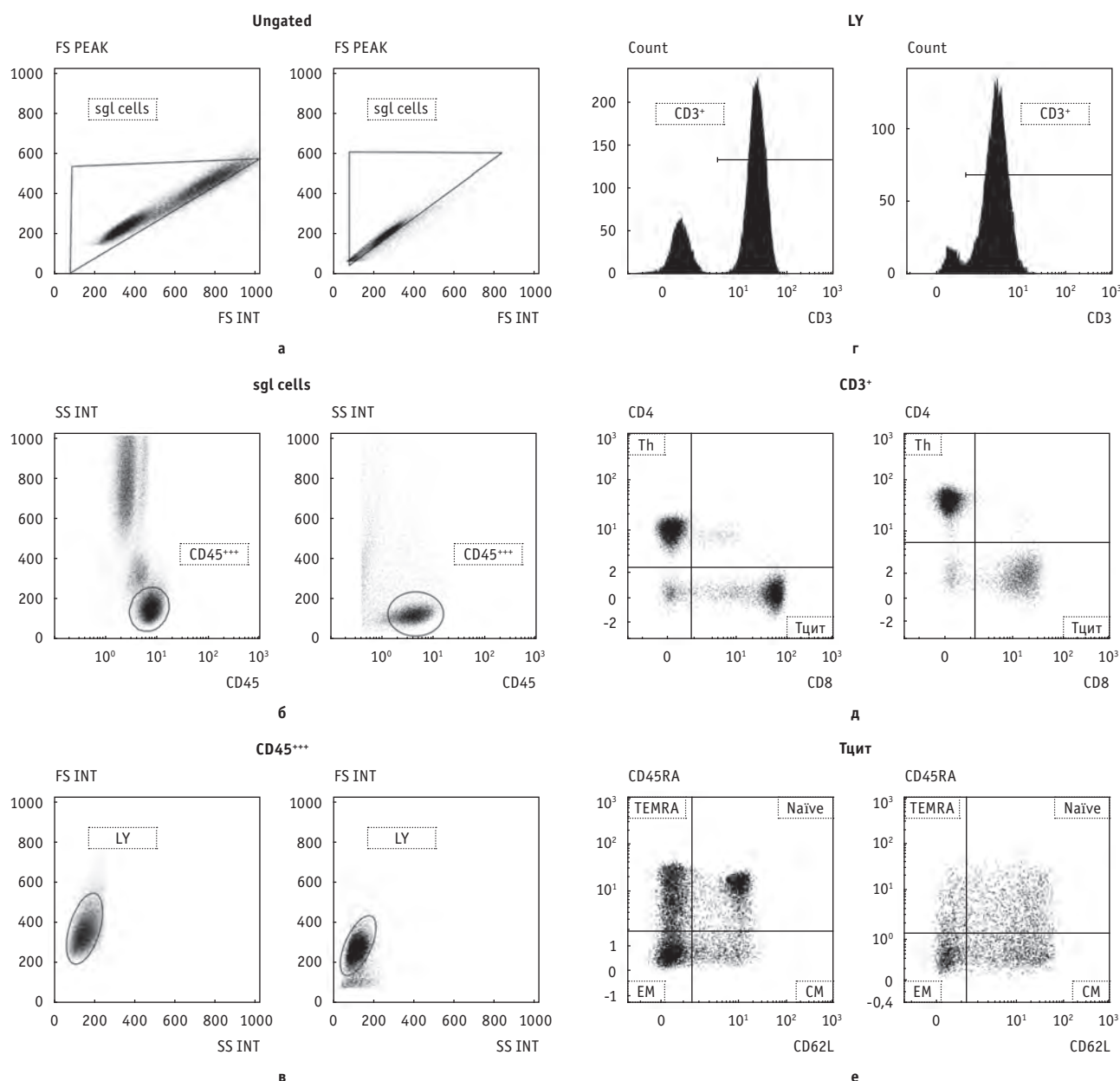


Рис. 1. Алгоритмы выявления основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови (левый ряд гистограмм) и спинномозговой жидкости (правый ряд гистограмм) при помощи многоцветной проточной цитометрии

Слева направо: Гистограммы а: по оси абсцисс — интегральный сигнал прямого светорассеяния (FS int); по оси ординат — пиковый сигнал прямого светорассеяния (FS peak); в области «sgl cells (одиночные клетки)» находятся неслипшиеся лимфоциты, на гистограмме отображены все проанализированные клетки. Гистограммы б: по оси абсцисс — уровень экспрессии CD45; по оси ординат — боковое светорассеяние (SS), характеризующее структуру цитоплазмы клеток; в области «CD45***» находятся клетки с высокой экспрессией CD45 и низкими значениями бокового светорассеяния, показаны только одиночные клетки из гистограммы а. Гистограммы в: по оси абсцисс — боковое светорассеяние (SS); по оси ординат — прямое светорассеяние (FS), характеризующее размер клеток; в области «LY» находятся клетки соответствующие по своим размерам и структуре популяции лимфоцитов периферической крови. Гистограммы г: по оси абсцисс — уровень экспрессии CD3; по оси ординат — количество проанализированных клеток; в области «CD3+» находятся Т-лимфоциты. Гистограммы д: по оси абсцисс — уровень экспрессии CD8; по оси ординат — уровень экспрессии CD4; в области «Тцит» располагаются цитотоксические Т-лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD8⁺. Гистограммы е: по оси абсцисс — уровень экспрессии CD62L; по оси ординат — уровень экспрессии CD45RA; в областях «naive», «CM», «EM» и «TEMRA» располагаются, соответственно, клетки: «наивные», центральной и эффекторной памяти, а также «терминально-дифференцированные» CD45RA-положительные цитотоксические Т-лимфоциты.

около 97 % или 95 % от общего числа лимфоцитов [11, 25]. Причем подавляющее большинство клеток являются Т-хелперами, на которые приходится около 70 % или 67 % лимфоцитов [8, 11]. При РС ранее отмечалось увеличение относительного содержания Т-хелперов в СМЖ при сравнении с условно здоровыми добровольцами [23]. Более того, сравнение различных нейровоспалитель-

ных заболеваний выявило, что увеличение соотношения CD4⁺/CD8⁺ характерно именно для РС, тогда как результаты собственных исследований указывают на то, что данный показатель значительно изменяется в периоды ремиссии и обострения РС [18].

В ходе дальнейших исследований на основании экспрессии CD45RA и CD62L среди Тцит были

выделены четыре основных стадии дифференцировки клеток, относительное содержание которых анализировалось в рамках общей популяции Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+$ периферической крови и СМЖ. Как показано на **рис. 2**, снижение уровня «наивных» Тцит в периферической крови сопровождалось уменьшением данной популяции клеток в составе СМЖ больных РС как в период обострения, так и в период ремиссии. При этом, вне зависимости от стадии заболевания, в периферической крови содержание «наивных» клеток всегда превосходило показатели СМЖ. Более того, при анализе образцов периферической крови, полученных от больных РС в период обострения, были выявлены обратные зависимости между баллами шкалы EDSS и абсолютным ($r=-0,430$ при $p=0,014$) и относительным ($r=-0,502$ при $p=0,003$) содержанием $CD45RA^+CD62L^+$ Тцит. Клетки центральной памяти в образцах СМЖ превосходили значения, полученные для периферической крови, что подтверждается данными других исследователей [17]. Считается, что именно на этой стадии дифференцировки Т-лимфоциты способны направленно мигрировать в нервную ткань за счет взаимодействия поверхностного Р-селектина с ICAM-1 венул сосудистого сплетения и субарахноидального пространства [13]. В рамках другого исследования было показано, что именно цитотоксические Т-лимфоциты больных с активным рецидивирующим РС несли на своей поверхности высокий уровень PSGL-1 по

сравнению с аналогичной популяцией Т-лимфоцитов периферической крови условно здоровых доноров. Более того, именно $CD3^+CD8^+$ клетки обладали повышенной по сравнению с Т-хелперами способностью к миграции через активированные венулы мозговых оболочек в условиях *in vitro* [3].

Следует также отметить, что при сравнении разных субпопуляций Тцит в периферической крови больных РС с группой контроля основные изменения касались исключительно популяции ЕМ. Так, при ремиссии РС относительное содержание ЕМ Тцит снижалось до 8,70 % (6,51; 11,63), что было достоверно ($p=0,005$) ниже значений контрольной группы (12,18 % (10,38; 15,24)), хотя и не отличалось ($p=0,114$) от больных в период обострения (11,31 % (8,28; 13,90)). Исследование содержания Тцит с фенотипом $CD45RA^-CD62L^-$ периферической крови показало, что как при обострении (118 кл/мкл (80; 184) при $p=0,017$), так и при ремиссии РС (104 кл/мкл (85; 142) при $p=0,003$) их концентрация оставалась достоверно ниже значений контрольной группы (166 кл/мкл (124; 213)). Анализ образцов СМЖ выявил, что при рецидиве РС имеет место увеличение ($p=0,027$) уровня ЕМ Тцит до 8,16 % (6,40; 11,40), тогда как в период ремиссии лимфоциты данной популяции составляли 6,49 % (4,51; 8,39) от общего числа $CD3^+$ клеток СМЖ. Как показано на **рис. 2**, увеличение относительного содержания $CD45RA^-CD62L^-$ Тцит в периферической крови сопровождалось их из-

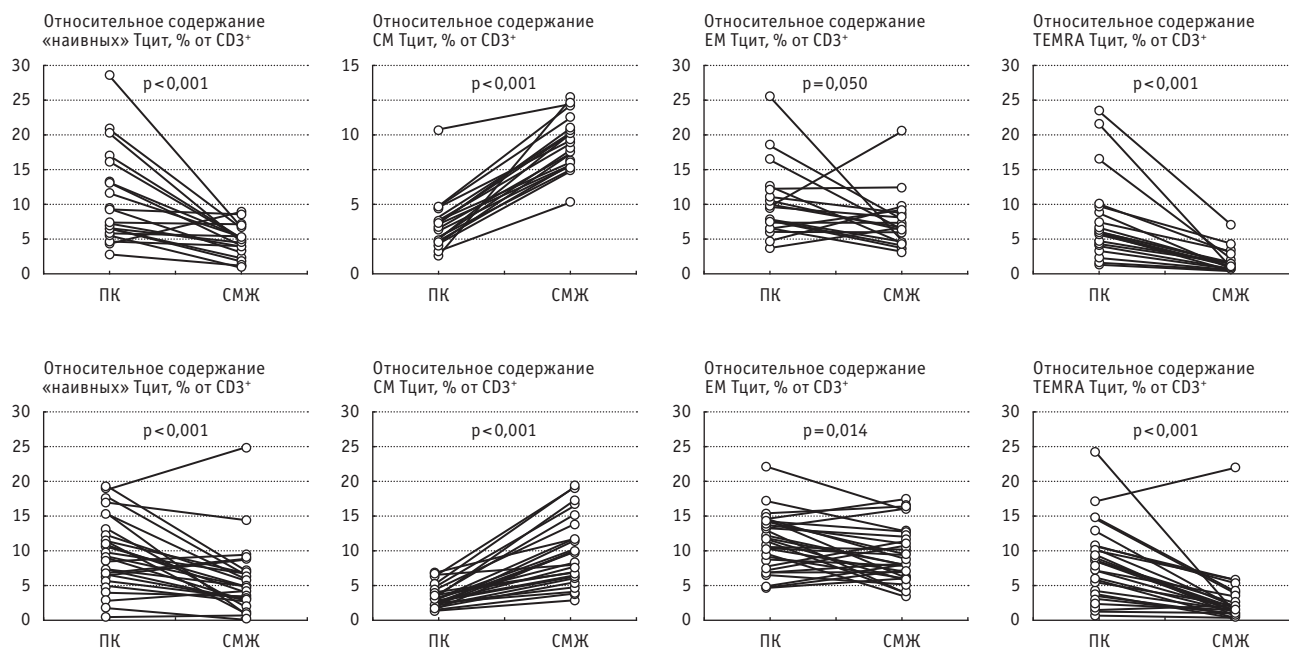


Рис. 2. Анализ относительного содержания различных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови и спинномозговой жидкости больных рассеянным склерозом в период ремиссии (верхний ряд) и обострения (нижний ряд)

ПК — относительное содержание клеток в периферической крови; СМЖ — относительное содержание клеток в спинномозговой жидкости. Результаты приведены в виде % клеток каждой из популяций Тцит в рамках общей популяции $CD3^+$ клеток. Статистическую значимость зависимости между выборками оценивали при помощи парного теста Вилкоксона.

менением в СМЖ ($p=0,014$), тогда как на стадии ремиссии подобной динамики не отмечалось. Кроме того, именно у больных с обострением РС была выявлена корреляционная связь между увеличением относительного содержания клеток данной популяции в СМЖ и баллом EDSS ($r=0,366$ при $p=0,047$), чего не было отмечено для больных в период ремиссии ($r=0,018$ при $p=0,945$). Таким образом, при рецидиве РС наблюдается увеличение уровня ЕМ Тцит в СМЖ при сравнении с показателями периферической крови, а также СМЖ больных в период ремиссии.

Принципиальным отличием ЕМ клеток от клеток центральной памяти (СМ) является выраженная способность к продукции эффекторных цитокинов и проявлению цитолитической активности в отношении клеток-мишеней [1]. Более того, именно на этой популяции клеток возрастает экспрессия молекул «хоуминга» в воспаленные ткани. Так, значительная часть цитотоксических Т-лимфоцитов, обнаруживаемых в составе нервной ткани, не экспрессировали CCR7 и CD62L, но несли на своей поверхности $\alpha 4$ -интегрин [12]. Ключевую роль в селективном проникновении клеток эффекторной памяти в пределы ЦНС играли эндотелиальные клетки сосудов гематоэнцефалического барьера, причем привлекались именно $CD3^+CD8^+$ лимфоциты, способные к синтезу и секреции IFN γ и IL-17. Другой важнейшей молекулой, определяющей миграцию $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов периферической крови в пределы нервной ткани, является МСАМ [15]. Уровень МСАМ $^+$ Тцит, способных синтезиро-

вать провоспалительные цитокины IL-17, IFN γ , GM-CSF и TNF, а также индуцировать апоптоз олигодендроцитов в условиях *in vitro*, у больных РС повышался во время рецидива заболевания.

Отдельно следует остановиться на результатах корреляционного анализа субпопуляционного состава Тцит периферической крови и СМЖ, приведенных для больных в период обострения в табл. 1, а для больных в период ремиссии — в табл. 2. Как видно из приведенных результатов, при обострении РС, как правило, наблюдается положительная взаимосвязь между относительным и абсолютным содержанием отдельных субпопуляций Тцит в СМЖ и концентрацией аналогичных популяций Т-лимфоцитов в периферической крови. Обратная зависимость между уровнем ЕМ Тцит, циркулирующими в СМЖ, и «наивными» клетками периферической крови может объясняться тесной связью между этими двумя популяциями Тцит и клиническими проявлениями РС (в баллах по шкале EDSS), как это было обнаружено нами.

По-видимому, обострение РС, ассоциированное с нарушением целостности гематоэнцефалического барьера и сопровождающееся направленной миграцией Т-клеток из периферических лимфоидных органов в нервную ткань, сопровождается сопоставленными изменениями субпопуляционного состава Тцит периферической крови и СМЖ (см. табл. 1). Последнее обстоятельство требует дальнейших детальных исследований, так как поможет определить роль цитотоксических Т-клеток в патогенезе РС. С одной стороны, Тцит за

Таблица 1

Взаимосвязь между относительным (% от CD3 $^+$ клеток) и абсолютным (#, кол-во клеток в 1 мкл) содержанием основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови и аналогичными популяциями CD3 $^+$ CD8 $^+$ клеток спинномозговой жидкости у больных рассеянным склерозом в период обострения (n = 32)

Спинномозговая жидкость		Периферическая кровь							
		«Наивные» Тцит		СМ Тцит		ЕМ Тцит		ТЕМРА Тцит	
		%	#	%	#	%	#	%	#
«Наивные» Тцит, %	r	0,456	0,554	0,370	0,441	-0,078	0,237	0,361	0,417
	p	0,011	0,001	0,044	0,015	0,683	0,207	0,050	0,022
СМ Тцит, %	r	0,248	0,375	0,627	0,645	0,315	0,551	-0,184	0,000
	p	0,187	0,041	<0,001	<0,001	0,090	0,002	0,330	1,000
ЕМ Тцит, %	r	-0,498	-0,524	0,033	-0,095	0,566	0,261	-0,226	-0,283
	p	0,005	0,003	0,864	0,618	0,001	0,164	0,229	0,129
ТЕМРА Тцит, %	r	-0,071	0,045	-0,027	0,081	0,030	0,265	0,671	0,664
	p	0,711	0,813	0,886	0,670	0,875	0,158	<0,001	<0,001

Примечание к таблице 1 и 2. Тцит — цитотоксические Т-лимфоциты; СМ — Т-клетки центральной памяти; ЕМ — Т-клетки эффекторной памяти, не экспрессирующие CD45RA; ТЕМРА — «терминально-дифференцированные» Т-клетки эффекторной памяти, экспрессирующие CD45RA. По горизонтали указаны популяции Тцит периферической крови, по вертикали — популяции Тцит спинномозговой жидкости; жирным шрифтом выделены достоверные корреляционные зависимости согласно коэффициенту ранговой корреляции Спирмена.

Таблица 2

Взаимосвязь между относительным (% от CD3⁺ клеток) и абсолютным (#, кол-во клеток в 1 мкл) содержанием основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови и аналогичными популяциями CD3⁺CD8⁺ клеток спинномозговой жидкости у больных рассеянным склерозом в период ремиссии (n = 20)

Спинномозговая жидкость		Периферическая кровь							
		«Наивные» Тцит		СМ Тцит		ЕМ Тцит		TEMRA Тцит	
		%	#	%	#	%	#	%	#
«Наивные» Тцит, %	r	0,380	0,463	-0,078	0,120	-0,126	-0,071	0,244	0,349
	p	0,098	0,040	0,743	0,613	0,596	0,767	0,301	0,132
СМ Тцит, %	r	-0,056	0,053	0,529	0,477	0,039	0,119	0,212	0,153
	p	0,816	0,826	0,016	0,034	0,870	0,618	0,369	0,519
ЕМ Тцит, %	r	-0,140	-0,250	-0,194	-0,328	0,110	-0,107	0,340	0,155
	p	0,556	0,289	0,413	0,158	0,645	0,654	0,143	0,514
TEMRA Тцит, %	r	0,206	0,053	0,051	-0,232	-0,235	-0,515	0,662	0,350
	p	0,383	0,823	0,830	0,324	0,319	0,020	0,001	0,131

счет продукции провоспалительных цитокинов (в первую очередь, IL-17) и запуска апоптоза в клетках нервной ткани способствуют развитию данной патологии. Увеличение относительного содержания IL-17-продуцирующих Тцит обнаружено как в составе очагов воспаления, так и в периферической крови больных РС [22, 27]. Эти клетки также обнаруживаются в составе активных очагов поражения нервной ткани при помощи гистологических методов исследования [26]. С другой стороны, некоторыми исследователями отмечается способность Тцит ограничивать воспалительные реакции, протекающие в нервной ткани за счет индукции апоптоза в активированных Т-хелперах, распознающих эпитопы основного белка миелина (MBP, от англ. «myelin basic protein») и гликопротеина олигодендроцитов мие-

лина (MOG, от англ. «myelin oligodendrocyte glycoprotein») при совместном культивировании [6]. Более того, в ходе экспериментов *in vitro* выявлена способность MOG1-специфических Тцит ингибировать пролиферацию MOG1-специфических Т-хелперов в условиях *in vitro* [4].

Приведенные выше собственные результаты и литературные данные подтверждают идею о том, что цитотоксические Т-лимфоциты больных рассеянным склерозом способны покидать кровотоки и мигрировать в пределы центральной нервной системы. Поэтому исследование этой популяции Т-клеток периферической крови и спинномозговой жидкости поможет подойти к пониманию патогенеза рассеянного склероза, а также обнаружить новые маркеры прогноза развития и течения данного заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Росс. иммунол. журн. 2014. Т. 8 (17). № 4. С. 947–964.
Kudryavtsev I.V. [Memory T cells: major populations and stages of differentiation] // Russ. J. Immunol. 2014. Vol. 8 (17). № 4. P. 947–964. Russian.

2. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Волков А.Е., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Полевщиков А.В. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки // Тихоокеанск. мед. журн. 2015. № 2 (60). С. 30–35.
Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Volkov A.E., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Polevshchikov A.V. [CD56 and CD57 expression by distinct populations of human cytotoxic T lymphocytes] // Tikhookeansk. Med. Zhurnal. 2015. Vol. 2. № 60. P. 30–35. Russian.

3. Battistini L., Piccio L., Rossi B., Bach S., Galgani S., Gasperini C., Ottoboni L., Ciabini D., Caramia M.D., Bernardi G., Laudanna C., Scarpini E., McEver R.P., Butcher E.C., Borsellino G., Constantin G. CD8⁺ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1 // Blood. 2003. Vol. 101. № 12. P. 4775–4782.

4. Baughman E.J., Mendoza J.P., Ortega S.B., Ayers C.L., Greenberg B.M., Frohman E.M., Karandikar N.J. Neuroantigen-specific CD8⁺ regulatory T-cell function is deficient during acute exacerbation of multiple sclerosis // J. Autoimmun. 2011. Vol. 36. № 2. P. 115–124.

5. Bitsch A., Schuchardt J., Bunkowski S., Kuhlmann T., Brück W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation // Brain. 2000. Vol. 123. Pt. 6. P. 1174–1183.

6. Correale J., Villa A. Isolation and characterization of CD8⁺ regulatory T cells in multiple sclerosis // J. Neuroimmunol. 2008. Vol. 195. № 1–2. P. 121–134.

7. Crucian B., Dunne P., Friedman H., Ragsdale R., Pross S., Widen R. Alterations in levels of CD28/CD8⁺ suppressor cell precursor and CD45RO⁺/CD4⁺ memory T lymphocytes in the peripheral blood of multiple sclerosis patients // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1995. Vol. 2. № 2. P. 249–252.

8. De Graaf M.T., Smitt P.A., Luitwieler R., van Vetzen C., van den Broek P.D., Kraan J., Gratama J.W. Central memory CD4⁺ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid // Cytometry B. Clin. Cytom. 2011. Vol. 80. № 1. P. 43–50.

9. Fogdell-Hahn A., Ligiers A., Grønning M., Hillert J., Olerup O. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease // Tissue Antigens. 2000. Vol. 55. № 2. P. 140–148.

10. Hauser S.L., Bhan A.K., Gilles F., Kemp M., Kerr C., Weiner H.L. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions // Ann. Neurol. 1986. Vol. 19. № 6. P. 578–587.

11. Ho E.L., Ronquillo R., Altmeyden H., Spudich S.S., Price R.W., Sinclair E. Cellular Composition of Cerebrospinal Fluid in HIV-1 Infected and Uninfected Subjects // PLoS One. 2013. Vol. 8. № 6. P. e66188.

12. Ifjergan I., Kebir H., Alvarez J.I., Marceau G., Bernard M., Bourbonnière L., Poirier J., Duquette P., Talbot P.J., Arbour N., Prat A. Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on $\alpha 4$ integrin // *Brain*. 2011. Vol. 134. (Pt.12). P. 3560–3577.
13. Kivisäkk P., Mahad D.J., Callahan M.K., Trebst C., Tucky B., Wei T., Wu L., Baekkevold E.S., Lassmann H., Staugaitis S.M., Campbell J.J., Ransohoff R.M. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. Vol. 100. № 14. P. 8389–8394.
14. Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS) // *Neurology*. 1983. Vol. 33. № 11. P. 1444–1452.
15. Larochelle C., Lécuyer M.A., Alvarez J.I., Charabati M., Saint-Laurent O., Ghanam S., Kebir H., Flanagan K., Yednock T., Duquette P., Arbour N., Prat A. Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation // *Ann. Neurol*. 2015. Vol. 78. № 1. P. 39–53.
16. Lassmann H., Brück W., Lucchinetti C.F. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview // *Brain Pathol*. 2007. Vol. 17. № 2. P. 210–218.
17. Mullen K.M., Gocke A.R., Allie R., Ntranos A., Grishkan I.V., Pardo C., Calabresi P.A. Expression of CCR7 and CD45RA in CD4+ and CD8+ subsets in cerebrospinal fluid of 134 patients with inflammatory and non-inflammatory neurological diseases // *J. Neuroimmunol*. 2012. Vol. 249. № 1–2. P. 86–92.
18. Oreja-Guevara C., Sindern E., Raulf-Heimsoth M., Malin J.P. Analysis of lymphocyte subpopulations in cerebrospinal fluid and peripheral blood in patients with multiple sclerosis and inflammatory diseases of the nervous system // *Acta Neurol. Scand*. 1998. Vol. 98. № 5. P. 310–313.
19. Pender M.P., Csurhes P.A., Pfluger C.M., Burrows S.R. Deficiency of CD8+ effector memory T cells is an early and persistent feature of multiple sclerosis // *Mult. Scler*. 2014. Vol. 20. № 14. P. 1825–1832.
20. Planas R., Metz I., Martin R., Sospedra M. Detailed Characterization of T Cell Receptor Repertoires in Multiple Sclerosis Brain Lesions // *Front. Immunol*. 2018. Vol. 9. P. 509.
21. Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B., Clanet M., Cohen J.A., Filippi M., Fujihara K., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., Lublin F.D., Montalban X., O'Connor P., Sandberg-Wollheim M., Thompson A.J., Waubant E., Weinshenker B., Wolinsky J.S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria // *Ann. Neurol*. 2011. Vol. 69. № 2. P. 292–302.
22. Salehi Z., Doosti R., Beheshti M., Janzamin E., Sahraian M.A., Izad M. Differential Frequency of CD8+ T Cell Subsets in Multiple Sclerosis Patients with Various Clinical Patterns // *PLoS One*. 2016. Vol. 11. № 7. P. e0159565.
23. Scolozzi R., Boccafogli A., Tola M.R., Vicentini L., Camerani A., Degani D., Granieri E., Caniatti L., Paolino E. T-cell phenotypic profiles in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of multiple sclerosis patients // *J. Neurol. Sci*. 1992. Vol. 108. № 1. P. 93–98.
24. Skulina C., Schmidt S., Dornmair K., Babbe H., Roers A., Rajewsky K., Wekerle H., Hohnfeld R., Goebels N. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. Vol. 101. № 8. P. 2428–2433.
25. Svenningsson A., Hansson G., Andersen O., Andersson R., Patarroyo M., Stemme S. Adhesion molecule expression on cerebrospinal fluid T lymphocytes: evidence for common recruitment mechanisms in multiple sclerosis, aseptic meningitis, and normal controls // *Ann. Neurol*. 1993. Vol. 34. № 2. P. 155–161.
26. Tzartos J.S., Friese M.A., Craner M.J., Palace J., Newcombe J., Esiri M.M., Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis // *Am. J. Pathol*. 2008. Vol. 172. № 1. P. 146–155.
27. Wang H.H., Dai Y.Q., Qiu W., Lu Z.Q., Peng F.H., Wang Y.G., Bao J., Li Y., Hu X.Q. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse // *J. Clin. Neurosci*. 2011. Vol. 18. № 10. P. 1313–1317.

Cytotoxic T cell subsets in peripheral blood and cerebrospinal fluid in patients with multiple sclerosis

I.V. Kudryavtsev¹, A.G. Ilves², O.M. Novoselova²,
K.S. Rubanik², M.K. Serebriakova¹, L.N. Prakhova²

¹Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg;

²N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain
of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

Using multicolor flow cytometry the main cytotoxic T lymphocytes (Tcyt) subsets were identified based on the expression of CD45RA and CD62L, in paired samples of peripheral blood and cerebrospinal fluid from the patients during the relapse (n = 32) and remission (n = 20) of multiple sclerosis (MS), as well as in the peripheral blood of healthy volunteers (n = 51). During the relapse of MS, the decreases in relative numbers of CD3⁺CD4⁺ cells and CD4/CD8 ratio were observed. In peripheral blood from relapse MS patients, the correlations between EDSS score and absolute (r = -0.430, p = 0.014) and relative (r = -0.502, p = 0.003) number of CD45RA⁺CD62L⁺ Tcyt were identified. During MS remission, relative number of blood CD45RA⁺CD62L⁺ Tcyt decreased significantly (p = 0.005) to 8.70 % (6.51; 11.63) in comparison with control group — 12.18 % (10.38; 15.24) although it did not differ (p = 0.114) from relapse patients — 11.31 % (8.28; 13.90). Analysis of liquor samples revealed that during the relapse of MS the percentage of CD45RA⁺CD62L⁺ Tcyt was increased (p = 0.027) up to 8.16 % (6.40; 11.40), while in remission these cells were only 6.49 % (4.51; 8.39) from the total number of CD3⁺ cells. During MS relapse, positive correlations between the relative number of "naïve", CM, EM and TEMRA Tcyt from liquor and the percentages, as well as the concentrations of similar T-lymphocytes subsets from peripheral blood were revealed. The inverse relationship between the level of EM Tcyt from liquor and peripheral blood "naïve" cells showed the close relationship between these two Tcyt subsets and clinical manifestations of MS (in scores of EDSS scale). During remission, most of these dependencies were disrupted. Further investigations of cytotoxic T cells dynamics in peripheral blood and cerebrospinal fluid will help to approach the understanding of the MS pathogenesis, and will also reveal new markers for the prognosis of the development and course of the disease. (Cytokines and Inflammation. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 50–57.)

Key words: flow cytometry, multiple sclerosis, cytotoxic T cells, CD45RA and CD62L, cerebrospinal fluid.

Холинергическая регуляция активности тучных клеток перитонеального экссудата

*Н.А. Кутукова¹, И.В. Кудрявцев^{1,2}, М.К. Серебрякова¹,
В.В. Гусельникова¹, О.В. Шамова¹, П.Г. Назаров^{1,2}*

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

²ФГОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Целью работы было изучение характера влияния холинергических агентов на спонтанную секрецию тучных клеток перитонеального экссудата, а также на индуцированную лигандом Fcε-рецепторов (FcεR). В качестве холиномиметика был выбран карбахол, неметаболизируемый аналог ацетилхолина. Путем регистрации высвобождения гистамина обнаружили двойственный характер регуляции активности мастоцитов с помощью карбахола. С одной стороны, холиномиметик стимулировал тучные клетки, способствуя дегрануляции, с другой — достоверно подавлял индуцированную лигандом FcεR активацию перитонеальных мастоцитов, соответственно концепции о противовоспалительной функции парасимпатической нервной системы. Удалось выявить отличия от классического представления нейрофизиологических основ холинергического противовоспалительного пути. В отличие от никотиновой регуляции «воспалительного рефлекса», в процесс модуляции активности тучных клеток перитонеального экссудата вовлечены мускариновые рецепторы. Таким образом, продемонстрирована гетерогенность холинергического влияния на тучные клетки в зависимости от тканевой принадлежности последних. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 58–65.)

Ключевые слова: тучные клетки, карбахол, холинергические нервные волокна.

Благодаря большому количеству активационных рецепторов, экспрессированных на поверхности тучных клеток, последние вовлечены в воспалительные процессы различной этиологии. Являясь ключевыми участниками гиперчувствительности немедленного типа, тучные клетки также играют не менее существенную роль в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета. Локализуясь в тканях, контактирующих с внешней средой, тучные клетки одними из первых реагируют на тканевые повреждения при травмах, при действии инфекционных агентов или их продуктов. Помимо Fcε-рецепторов, связывающих IgE (FcεR), среди мембранных молекул мастоцитов наиболее важными для реализации функций

врожденного иммунитета являются Fcγ-рецепторы и рецепторы для компонентов комплемента C3b и C3d, благодаря которым тучные клетки распознают опсонизированные антигены. Кроме того, мастоциты несут некоторые патогенраспознающие рецепторы (TLR-2, TLR-3, TLR-4, CD48), что позволяет им распознавать патогены напрямую и отвечать немедленным реагированием, высвобождая провоспалительные медиаторы [4, 23]. Выделение провоспалительных цитокинов способствует привлечению нейтрофилов и других эффекторных клеток и непосредственной организации иммунного ответа. Несмотря на хорошо исследованную роль мастоцитов в локальном и системном воспалении, процесс их регуляции вегетативным отделом нервной системы остается недостаточно охарактеризованным.

Кутукова Надежда Александровна, e-mail: i_n_a_777@mail.ru

Иммунорегуляторное влияние вегетативной нервной системы заключается в противовоспалительной функции холинергических нервных волокон [9]. Было показано, что при стимуляции макрофагов блуждающим нервом ацетилхолин связывается с $\alpha 7$ -субъединицей никотинового ацетилхолинового рецептора, ингибируя синтез TNF α , IL-1, IL-18 и ряда других провоспалительных цитокинов [27]. Вопрос о характере взаимоотношений между холинергическими нервными волокнами и тучными клетками весьма неоднозначен и, несмотря на длительность изучения, по-прежнему актуален и требует детального рассмотрения.

В нашей работе мы попытались внести вклад в понимание холинергической иннервации тучных клеток на примере перитонеальных мастоцитов.

Материалы и методы

В работе использовали самцов мышей линии СВА, полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская область, Россия), а также их потомство, выращенное в виварии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». Лабораторных животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (ETS № 123 от 18.03.1986, Страсбург, Франция).

Мышинный перитонеальный экссудат получали и анализировали согласно протоколам, описанным ранее [5, 12]. Для умерщвления лабораторных животных применяли метод цервикальной дислокации. Перитонеальную суспензию получали через 20 мин после внутрибрюшинного введения стерильного раствора Хенкса (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург), дополненного фетальной телячьей сывороткой (FCS — fetal calf serum; «Hyclone», США). Фракцию, обогащенную тучными клетками, получали с применением метода разделения клеток в градиенте плотности перколлы. Подсчет клеток проводили в камере Горяева по стандартной методике.

Оценку количества тучных клеток в перитонеальном экссудате мыши проводили с использованием метода проточной цитофлуориметрии по экспрессии маркеров Fc ϵ RI и CD117 (c-kit) на приборе «Navios™» («Beckman Coulter», США). Для цитометрического анализа использовали моноклональные антитела к поверхностному антигену Fc ϵ RI, конъюгированные с красителем «Alexa Fluor 647» (Clone MAR-1) («BioLegend», США), детекция флуоресценции которого наблюдалась при длине волны 668 нм. Моноклональные антитела к c-kit рецептору были конъюгированы с красителем «Alexa Fluor 488» (Clone 2B8) («BioLegend», США), длина волны пика эмиссии которого составляла 519 нм. Для каждого из моноклональных антител были использованы соответствующие изотипические контроли. Образцы клеточной суспензии для иммунофенотипирования брали до и после разделения в перколле.

Тучные клетки мышиного перитонеального экссудата визуализировали, применяя гистохимический метод окрашивания толуидиновым синим красителем (ООО «ЛабПоинт», Санкт-

Петербург). Окрашенные мазки заключали в перманентную среду «Cytoseal 60» («Thermo Scientific», США). Полученные препараты исследовали под микроскопом «Leica DM750» («Leica», Германия), фотографировали с помощью цифровой фотокамеры ICC50 («Leica», Германия). Обработку полученных изображений проводили с применением компьютерной программы «LAS EZ». Гистохимические исследования проводили на базе отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Фракцию мышиного перитонеального экссудата, обогащенную тучными клетками, промывали и разводили в растворе Хенкса, дополненном 2% FCS. После этого клеточную суспензию делили на равные части и добавляли равный объем исследуемых в работе препаратов. В качестве положительного контроля дегрануляции использовали очищенные крысиные антитела против мышиного IgE (анти-IgE, α IgE) (клон R35-72) («BD Pharmingen», США). Для изучения холинергической модуляции функциональной активности тучных клеток проводили дополнительную предобработку клеток с помощью карбахола (Cch) («Sigma-Aldrich», США), предшествующую добавлению положительного контроля. Для изучения вовлеченности холинорецепторов в данный процесс клетки поочередно подвергали предобработке блокаторами ацетилхолиновых рецепторов никотинового или мускаринового типа (н-АХР или м-АХР, соответственно), предшествующей добавлению в реакционную смесь карбахола, положительного контроля или стимулирующих агентов вместе. Холинергические препараты добавляли к клеточной суспензии также и поодиночке. Каждую обработку тучных клеток исследуемыми веществами сопровождали инкубацией в течение 30 минут при температуре 37 °С. По истечении времени инкубации эппендорфы с клеточной суспензией помещали на лед для остановки реакции. Далее клетки осаждали центрифугированием. Надосадочную фракцию, содержащую выделившиеся преформированные медиаторы, отбирали в отдельные пробирки и замораживали при –20 °С. Для тотального выхода медиаторов мастоциты разводили деионизированной водой и разрушали замораживанием/оттаиванием.

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (н-АХР) блокировали с использованием гексаметония бензолсульфоната (бензогексоний) (Hex) («Sigma-Aldrich», США), неселективного блокатора н-АХР. Мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (м-АХР) блокировали с использованием атропина (ATR) (ОАО «Дальхимфарм», г. Хабаровск), неселективного блокатора м-АХР, и пирензепина (Prz) («Sigma-Aldrich», США), специфического блокатора M1-холинорецептора. Жизнеспособность клеток в ответ на действие рабочих концентраций препаратов оценивали на проточном цитофлуориметре с помощью раствора йодистого пропидия (PI, «Sigma-Aldrich», США).

Оценку активации тучных клеток регистрировали с помощью модифицированного метода Шора, основанного на реакции конденсации гистамина с ортофталевым альдегидом (ОФА) [26]. В результате реакции образовывался высокофлуоресцирующий комплекс, который измеряли на приборе «Fluoroscan Accent FL» («Thermo Fisher Scientific», США) при длине волны возбуждения 350 нм и эмиссии 460 нм. По яркости флуоресценции, выраженной в единицах флуоресценции (relative fluorescent units (RFU)), судили о количестве гистамина в пробе. Долю выделившегося гистамина высчи-

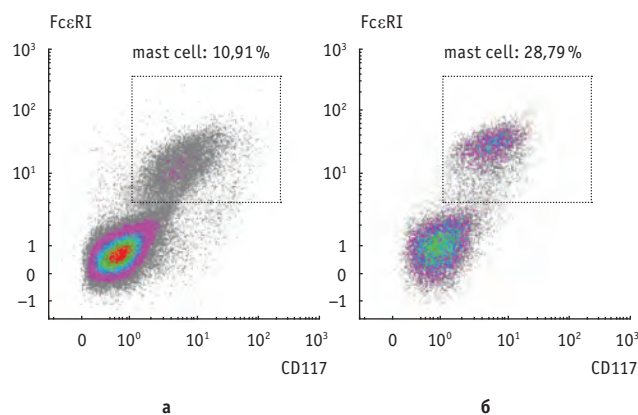


Рис. 1. Характеристика перитонеальных тучных клеток мыши с помощью проточной цитометрии по экспрессии поверхностных маркеров FcεRI и CD117 (c-kit)

а — анализ клеток мышинного перитонеального экссудата до их разделения в градиенте плотности перколлы; б — анализ перитонеального экссудата, обогащенного фракцией тучных клеток, после разделения клеток в градиенте плотности перколлы.

тывали по формуле: $A/(A+B)$, где А — содержание биогенного амина в надосадочной жидкости, В — содержание медиатора в осадке (клеточном лизате). RFU пересчитывали в условные единицы (у. е.) в виде отношения к действию отрицательного контроля, который был принят за единицу.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов программ «Microsoft Office Excel», «BioStat». Результаты представляли в виде средней арифметической значений, полученных в 3–10 независимых опытах, и средней квадратичной ошибки ($M \pm m$). Для определения различий между независимыми группами нормально распределенных данных использовали t-критерий Стьюдента. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Используя метод проточной цитофлуориметрии, мы показали, что доля мастоцитов от обще-

го числа клеток мышинной перитонеальной полости составляла 10,91 % (рис. 1, а). После очистки клеток в градиенте плотности перколлы на фракцию тучных клеток стало приходиться 28,79 % от всего количества клеток перитонеального экссудата (рис. 1, б).

Как упоминалось ранее, визуализацию тучных клеток в перитонеальном экссудате проводили с применением гистохимического метода окрашивания толуидиновым синим красителем (рис. 2). В мазках перитонеальной жидкости тучные клетки хорошо выявлялись по характерной метакроматической окраске гранул в фиолетовый цвет. Насыщенная фиолетовая окраска гранул тучных клеток указывает на высокую концентрацию гепарина и достигнутый уровень зрелости. Плотно упакованные гранулы заполняли всю цитоплазму мастоцитов, экранируя ядра клеток. На данных препаратах перитонеальные тучные клетки имели округлую, овальную или слегка вытянутую форму и относительно крупные размеры (15–25 мкм).

В рамках данного исследования мы изучали регуляторное воздействие холинергических препаратов на работу тучных клеток перитонеального экссудата. Путем регистрации высвобождения гистамина нам удалось показать, что карбахол, неметаболизируемый аналог ацетилхолина, стимулировал дегрануляцию перитонеальных мастоцитов (рис. 3). Холиномиметик оказывал достаточно слабое влияние на высвобождение биогенного амина перитонеальными тучными клетками, однако данный эффект являлся воспроизводимым и повторялся в 10 независимых экспериментах. При этом степень воздействия карбахола увеличивалась с уменьшением его концентрации.

Наши результаты сопоставимы с описанными в литературе данными. В ряде работ было показано достоверное дозозависимое высвобождение гистамина из крысиных перитонеальных и плев-

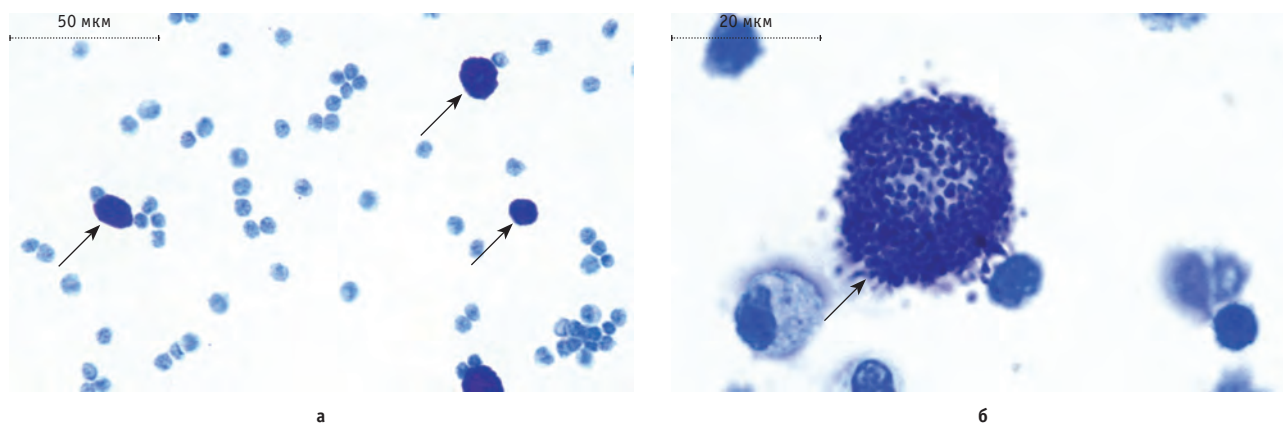


Рис. 2. Характеристика перитонеальных тучных клеток мыши гистохимическим методом окрашивания толуидиновым синим красителем на кислые полисахариды

а — увеличение $\times 40$, масштабный отрезок равен 50 мкм; б — увеличение $\times 100$, масштабный отрезок равен 20 мкм. Стрелками отмечены перитонеальные тучные клетки.

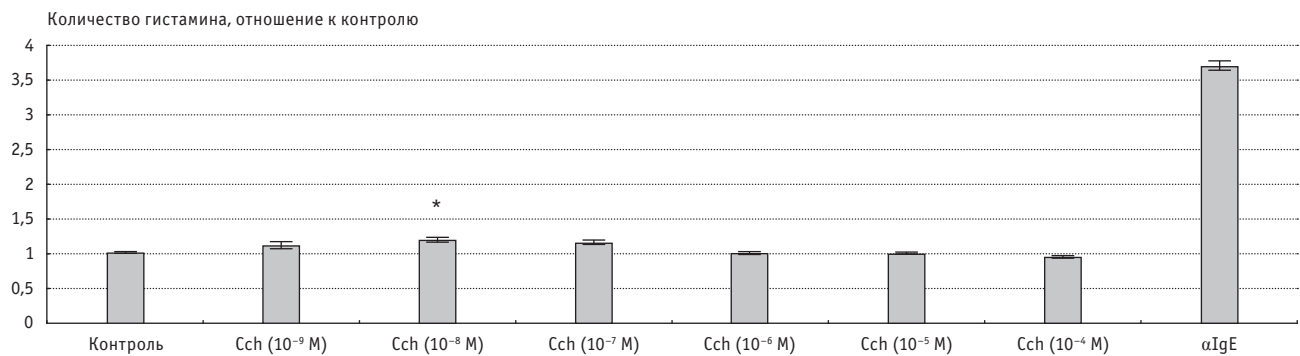


Рис. 3. Влияние разных концентраций карбахола на высвобождение гистамина тучными клетками мышинного перитонеального экссудата

По оси абсцисс — молярные концентрации карбахола, отрицательный контроль — раствор Хенкса, положительный контроль — антитела против мышиного IgE (α IgE, 0,5 мкг/мл). По оси ординат — средние показатели высвобождения гистамина в ответ на влияние стимулирующих агентов, пересчитанные по отношению к отрицательному контролю, который был принят за единицу. Результаты представлены в виде средней арифметической значений, полученных в 10 независимых опытах, и ошибки средней ($M \pm m$). * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$.

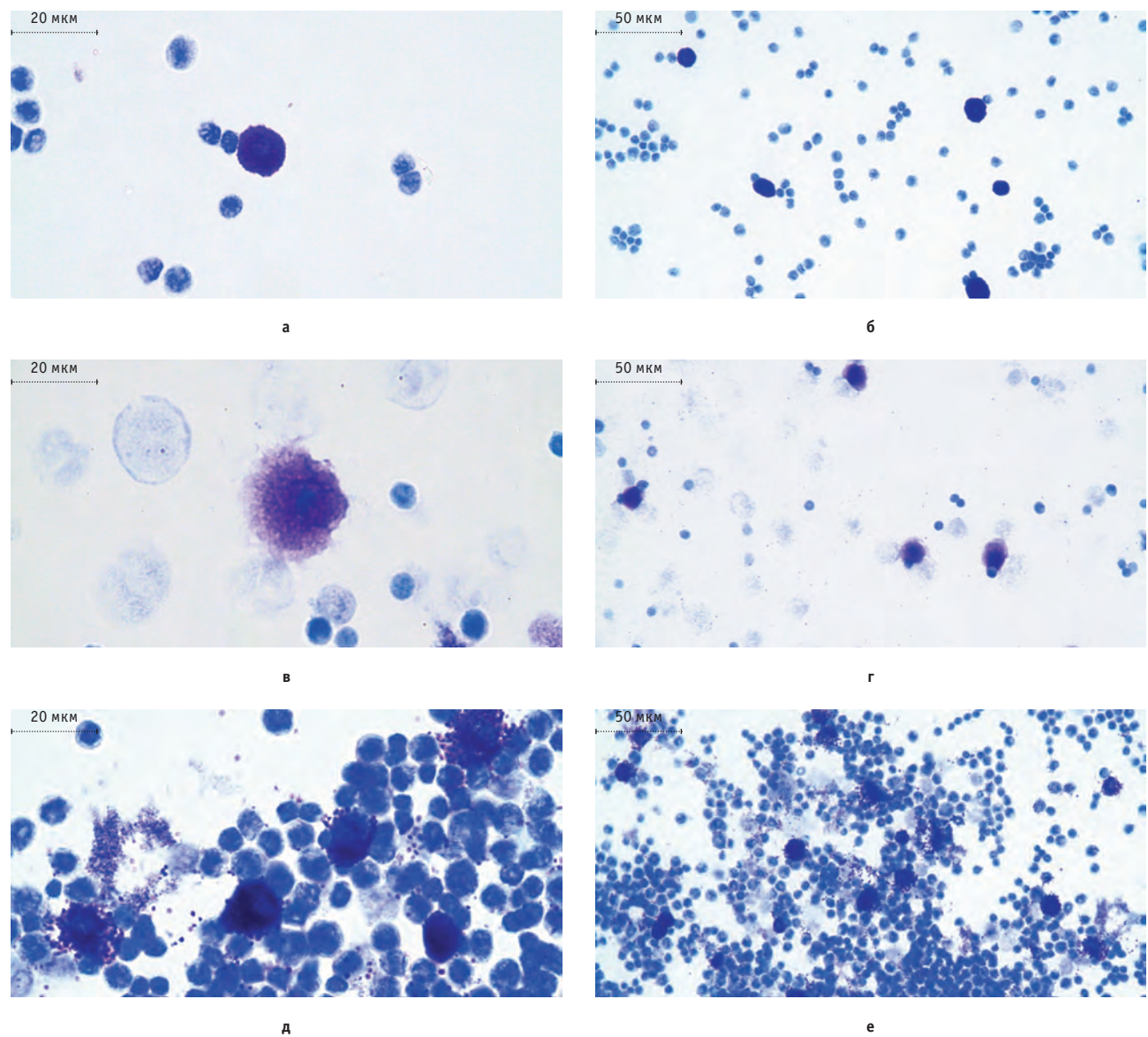


Рис. 4. Мышиный перитонеальный экссудат, обогащенный фракцией тучных клеток

Окрашивание толуидиновым синим. а, б — контроль (интактные клетки); в, г — клетки, стимулированные карбахолом (10^{-8} M); д, е — клетки, стимулированные антителами против мышиного IgE (0,5 мкг/мл). Фотографии левого ряда — увеличение $\times 100$, масштабный отрезок равен 20 мкм, фотографии правого ряда — увеличение $\times 40$, масштабный отрезок равен 50 мкм.

ральных тучных клеток под действием ацетилхолина и карбахолина [6, 8, 24]. Гистамин-либерирующие свойства применяемого в нашей работе холиномиметика карбахола были проявлены и по отношению к перевиваемой линии тучных клеток человека НМС-1 и по отношению к базофилам крови человека [1–3, 17–20].

Результаты по влиянию карбахола на спонтанную дегрануляцию тучных клеток перитонеального экссудата, выраженные в виде средних показателей высвобождения гистамина, согласуются с результатами гистохимических исследований. На **рис. 4** представлены фотографии клеток перитонеального экссудата, обогащенного фракцией мастоцитов, окрашенного толуидиновым синим красителем. Фотографии сфокусированы на перитонеальных тучных клетках, стимулированных карбахолом (10^{-8} М) (**рис. 4, в, г**) в сравнении с интактными мастоцитами (**рис. 4, а, б**) и тучными клетками, активированными α IgE (**рис. 4, д, е**). В необработанном перитонеальном экссудате тучные клетки плотно упакованы гранулами, ядра мастоцитов визуально не определяются (см. **рис. 4, а, б**). Тучные клетки, обработанные карбахолом, напротив, имеют рыхлую неровную мембрану (**рис. 4, в, г**). Окраска таких клеток ослабляется до светло-фиолетовой по сравнению с интенсивно-фиолетовой в контроле. В цитоплазме карбахол-индуцированных мастоцитов обнаруживаются вакуоли, ядра просматриваются. По **рис. 4, д, е** видно, что при обработке перитонеального экссудата антителами к IgE происходит дегрануляция тучных клеток путем экскреции целых гранул. При этом нарушается целостность плазматической мембраны, которая частично отделяется от клетки вместе с гранулами. Неполностью дегранулированные клетки сохраняют плотно упакованную структуру и интенсивность окраски гранул. Таким образом, полученные нами фотографии гистологических препаратов демонстрируют разные морфологические картины дегрануляции тучных клеток. Согласно литературным данным, преформированные компоненты

гранул тучных клеток (такие как гистамин) высвобождаются в растворимой форме, в то время как остальные неразрывно связаны с гранулярным матриксом [28]. В случае взрывной дегрануляции, которая реализуется в ходе развития реакций немедленного типа (при индукции Fc ϵ RI-зависимого ответа тучных клеток), происходит массовый выброс всего содержимого гранул, что на гистологических препаратах выглядит как выход цельных гранул.

Помимо влияния на спонтанную дегрануляцию тучных клеток, холиномиметики также могут модулировать их антиген-индуцированную активацию. На мышинных тучных клетках костного мозга было показано, что ацетилхолин и агонисты никотиновых рецепторов достоверно ослабляют IgE-зависимое, а также TLR4-опосредованное высвобождение медиаторов, связываясь с $\alpha 7$ -субъединицей n-АХР [10, 11]. Подавляющее воздействие агонистов $\alpha 7$ -субъединицы никотинового рецептора было показано и на крысиной линии тучных клеток RBL-2H3. В этом случае ингибция распространялась как на раннюю, так и на позднюю фазу дегрануляции тучных клеток [16, 25].

Результаты наших экспериментов показали подавляющее действие карбахола, оказанное в отношении стимул-индуцированной активации тучных клеток (**рис. 5**). Было установлено, что карбахол в рабочей концентрации 10^{-8} М, способствующей дегрануляции перитонеальных мастоцитов *per se*, в концентрации 10^{-9} М, модулировал также анти-IgE-зависимый ответ тучных клеток, достоверно уменьшая высвобождение гистамина. Таким образом, дозозависимый эффект сохранялся и в этом случае: с уменьшением концентрации карбахола уменьшался выход гистамина из тучных клеток мышинного перитонеального экссудата, индуцированных антителами к IgE.

Таким образом, полученные нами данные указывают на амбивалентное действие карбахола. С одной стороны, холиномиметик *per se* стимулирует тучные клетки, способствуя секреции гистамина.

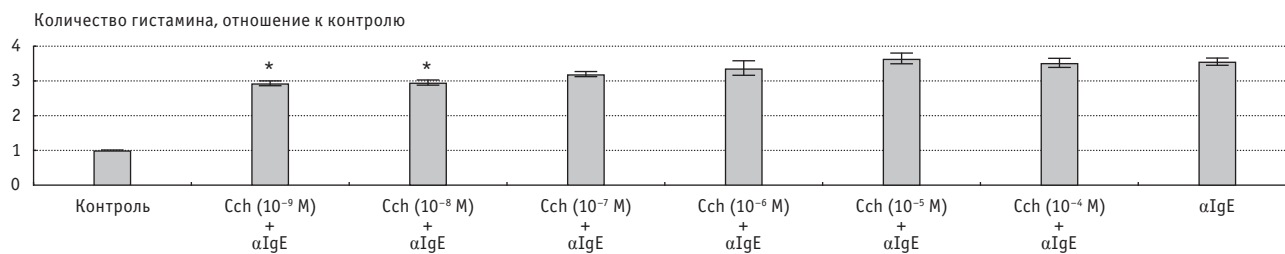


Рис. 5. Влияние разных концентраций карбахола на анти-IgE-зависимую дегрануляцию тучных клеток мышинного перитонеального экссудата

По оси абсцисс — молярные концентрации карбахола, предобработывающие взвесь клеток до добавления антител к IgE (α IgE), отрицательный контроль — раствор Хенкса, положительный контроль — антитела против мышинного IgE (0,5 мкг/мл). По оси ординат — средние показатели по высвобождению гистамина в ответ на влияние стимулирующих агентов, пересчитанные по отношению к отрицательному контролю, который был принят за единицу. Результаты представлены в виде средней арифметической значений, полученных в 10 независимых опытах, и ошибки средней ($M \pm m$). * — достоверное отличие от α IgE при $p < 0,05$.

Это действие слабое, однако, воспроизводимое из опыта в опыт. С другой стороны, карбахол также слабо, но достоверно подавляет стимул-индуцированную активацию мастоцитов, что соответствует концепции о противовоспалительной функции парасимпатической нервной системы и ацетилхолина как ее основного медиатора. Такой двойственный характер регуляции активности мастоцитов, по всей видимости, указывает на наличие так называемого холинергического тонуса, который поддерживает возбуждение тучных клеток на определенном уровне.

Для понимания механизма действия карбахола были использованы антагонисты ацетилхолиновых рецепторов. Учитывая нейрофизиологические основы холинергического противовоспалительного пути, проходящего через никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, мы, прежде всего, использовали бензогексоний, неселективный блокатор никотиновых рецепторов. Однако, на тучных клетках мыши, выделенных из перитонеальной полости, нами было показано отсутствие никотинового контроля над модуляцией функциональной активности перитонеальных мастоцитов (рис. 6). Бензогексоний сам по себе не вызывал высвобождение гистамина, а также не влиял на карбахол-стимулированную дегрануляцию. Кроме того, н-холинолитик бензогексоний не отменял ингибирующее воздействие карбахола на анти-IgE-опосредованное высвобождение гистамина перитонеальными мастоцитами, а, подобно холиномиметику, подавлял данный ответ (см. рис. 6).

В более ранних работах, выполненных, как и часть нашего исследования, на перитонеальных мастоцитах, выявлена вовлеченность мускариновых рецепторов в модулирование антиген-индуцированного ответа тучных клеток [6, 7, 13, 14]. Было показано, что тучные клетки крыс, выделенные из перитонеального экссудата, высвобождали гистамин в ответ на применение низких концентраций ацетилхолина. Атропин, неселективный антагонист мускариновых рецепторов, полностью блокировал ацетилхолин-индуцированную секрецию биогенного амина.

Для оценки участия мускариновых рецепторов в регуляции работы тучных клеток перитонеального экссудата мы, как и в вышеописанных исследованиях, использовали атропин. Для селективной ингибиции применяли также пирензепин, блокатор M1-ацетилхолинового рецептора, экспрессия которого описана как на тучных клетках грызунов, так и на тучных клетках человека [15, 22].

Наши результаты показали, что в процессе карбахол-зависимого высвобождения гистамина из перитонеальных мастоцитов задействованы мускариночувствительные холинорецепторы, равно как и в карбахол-опосредованной регуляции FcεR-зависимого ответа тучных клеток мышинного перитонеального экссудата (рис. 7). Оба антагониста полностью блокировали действие холиномиметика, а в случае FcεR-зависимого ответа перитонеальных мастоцитов антагонизировали ингибиции карбахола.

Модуляция работы тучных клеток антагонистами мускариновых рецепторов наблюдалась и на модели мастоцитов слизистой оболочки дыхательных путей человека [21, 22]. Для этого использовали фрагменты бронхов здоровых доноров, изолированные после лобэктомии. Было показано ингибирующее влияние ацетилхолина на дегрануляцию тучных клеток, вызванную кальциевым ионофором A23187 и антителами против IgE. Данная супрессия отменялась при применении блокаторов мускариновых рецепторов, в большей степени при использовании пирензепина — антагониста мускариночувствительного рецептора 1-го типа.

Таким образом, как и авторам вышеизложенной статьи, нам удалось обнаружить ингибирующее мускариновое звено иммунорегуляторной функции парасимпатической регуляции, что контрастирует с выводами о механизмах влияния ацетилхолина на функциональную активность тучных клеток других систем организма. По всей видимости, существует гетерогенность холинергического влияния на тучные клетки в зависимости от тканевой принадлежности последних.

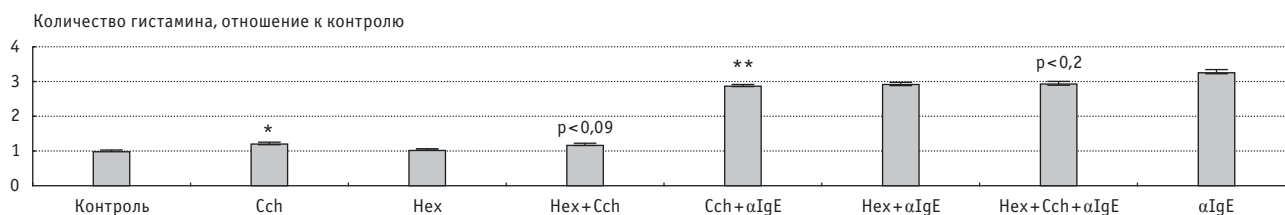


Рис. 6. Влияние бензогексония (Hex), блокатора н-АХР, на высвобождение гистамина тучными клетками мышинного перитонеального экссудата, вызванное Cch, антителами против мышинного IgE и совместным использованием индукторов

По оси абсцисс — холинергические агенты сами по себе (Cch (10^{-8} М), Hex (10^{-7} М)), а также в комбинации друг с другом и с αIgE, отрицательный контроль — раствор Хенкса, положительный контроль — антитела против мышинного IgE (0,5 мкг/мл). По оси ординат — средние показатели по высвобождению гистамина в ответ на влияние стимулирующих агентов, пересчитанные по отношению к отрицательному контролю, который был принят за единицу. Результаты представлены в виде средней арифметической значений, полученных в 3 независимых опытах, и ошибки средней ($M \pm m$). * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$; ** — достоверное отличие от αIgE при $p < 0,001$.

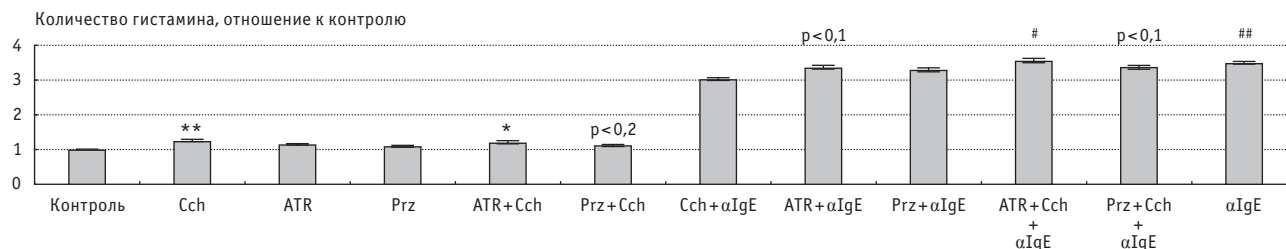


Рис. 7. Влияние блокаторов мускариновых холинорецепторов на высвобождение гистамина тучными клетками мышиного перитонеального экссудата, вызванное Cch, антителами против мышиного IgE и совместным использованием индукторов

По оси абсцисс — холинергические агенты сами по себе (Cch (10^{-8} M), ATR (10^{-4} M), Prz (10^{-6} M)), а также в комбинации с Cch и αIgE, отрицательный контроль — раствор Хенкса, положительный контроль — антитела против мышиного IgE (0,5 мкг/мл). По оси ординат — средние показатели по высвобождению гистамина в ответ на влияние стимулирующих агентов, пересчитанные по отношению к отрицательному контролю, который был принят за единицу. Результаты представлены в виде средней арифметической значений, полученных в 7 независимых опытах, и ошибки средней ($M \pm m$). * — достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$; # — достоверное отличие от (Cch+αIgE) при $p < 0,05$; ## — достоверное отличие от (Cch+αIgE) при $p < 0,01$.

Однако, вне зависимости от того, какие рецепторы задействованы, модуляция функциональной активности тучных клеток холинергическими волокнами оказывает противовоспалительное действие.

Резюмируя результаты нашего исследования, следует отметить, что холинергическое влияние не изменяет работу тучных клеток существенно, но модулирует их функциональную активность, удерживая процесс возбуждения мастоцитов в определенных границах. Наши данные указывают на то, что взаимодействие холинергических нервных волокон и тучных клеток не статично, а носит динамичный характер. По-видимому, тучные клетки можно рассматривать в качестве трансдукторов, перерабатывающих и распространя-

ющих электрический импульс, идущий из центральной нервной системы к внутренним органам по волокнам разных типов, в том числе и по эфферентным волокнам блуждающего нерва. Ацетилхолин, доминирующий медиатор волокон блуждающего нерва, способен связываться с тучными клетками, как с иммунными аналогами чувствительных окончаний, и корректировать их антиген-индуцированный ответ. Действуя в том числе и через тучные клетки, холинергическая иннервация вносит свой вклад в направление протекающей воспалительной реакции.

Результаты работы способствуют углублению представлений о механизмах негативной регуляции функциональной активности тучных клеток холинергической нервной системой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пронина А.П., Назаров П.Г. Активация базофилов крови человека лигандами Fc-γ-рецепторов: холинергический тунинг // Цитокины и воспаление. 2008. Т. 7. № 4. С. 42–48. (а).
2. Пронина А.П., Назаров П.Г. [Activation of human blood basophils by the Fcγ receptor ligands: a cholinergic tuning] // Cytokines and Inflammation (St. Petersburg). 2008. Vol. 7. № 4. P. 42–48. Russian.
3. Пронина А.П., Назаров П.Г. Влияние пентраксина и агрегированного IgG на выброс гистамина из базофилов человека при блокаде ацетилхолиновых рецепторов // Росс. аллергол. ж. 2008. № 51. С. 237–238. (б).
4. Пронина А.П., Назаров П.Г. [Effect of pentraxins and aggregated IgG on histamine release from human basophils under the blockade of acetylcholine receptors] // Ross. Allergol. Zh. 2008. № 51. P. 237–238. Russian.
5. Пронина А.П. Влияние факторов острой фазы воспаления на активацию базофилов и тучных клеток in vitro: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук, СПб., 2011. 19 с.
6. Пронина А.П. [Influence of factors of the acute phase of inflammation on the activation of basophils and mast cells in vitro: Abstract of the Dissertation for the degree of Candidate of Biol. Sciences]. St. Petersburg, 2011. 19 p. Russian.
7. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2010. 752 с.
8. Yarin A.A. [Immunology: Textbook]. Moscow: GEOTAR-Media. 2010. 752 p. Russian.
9. Arock M., Le Nours A., Malbec O., Daëron M. Ex vivo and in vitro primary mast cells // Methods Mol. Biol. 2008. Vol. 415. P. 241–254.
10. Blandina P., Fantozzi R., Mannaioni P.F., Masini E. Characteristics of histamine release evoked by acetylcholine in isolated rat mast cells // J. Physiol. 1980. Vol. 301. P. 281–293.
11. Erjavec F., Iskra M. The interaction of cholinomimetics, peptides and compounds 48/80 on histamine secretion from the mast cell // Agents Actions. 1984. Vol. 14. № 3–4. P. 373–375.
12. Fantozzi R., Masini E., Blandina P., Mannaioni P.F., Bani-Sacchi T. Release of histamine from rat mast cells by acetylcholine // Nature. 1978. Vol. 273. № 5662. P. 473–474.
13. Forsythe P., Bienenstock J. The mast cell-nerve functional unit: a key component of physiologic and pathophysiologic responses // Chem. Immunol. Allergy. 2012. Vol. 98. P. 196–221.
14. Guzmán-Mejía F., López-Rubalcava C., González-Espinosa C. Stimulation of nAChRα7 receptor inhibits TNF synthesis and secretion in response to LPS treatment of mast cells by targeting ERK1/2 and TACE activation // J. Neuro-immune Pharmacol. 2018. Vol. 13. № 1. P. 39–52.
15. Kageyama-Yahara N., Suehiro Y., Yamamoto T., Kadowaki M. IgE-induced degranulation of mucosal mast cells is negatively regulated via nicotinic acetylcholine receptors // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. Vol. 377. № 1. P. 321–325.
16. Kovarova M. Isolation and characterization of mast cells in mouse models of allergic diseases // Methods Mol. Biol. 2013. Vol. 1032. P. 109–119.
17. Masini E., Blandina P., Fantozzi R., Brunelleschi S., Mannaioni P.F. Correlation between cholinergic histamine release and quinuclidinyl-benzilate ([3H]-QNB) binding in mast cell membranes // Agents Actions. 1981. Vol. 11. № 1–2. P. 55–59.
18. Masini E., Fantozzi R., Conti A., Blandina P., Brunelleschi S., Mannaioni P.F. Immunological modulation of cholinergic histamine release in isolated rat mast cells // Agents Actions. 1985. Vol. 16. № 3–4. P. 152–154.
19. Masini E., Fantozzi R., Blandina P., Brunelleschi S., Mannaioni P.F. Muscarinic cholinergic receptor binding in rat mast cells // Agents Actions. 1983. Vol. 13. № 4. P. 327–332.
20. Mishra N.C., Rir-sima-ah J., Boyd R.T., Singh S.P., Gundavarapu S., Langley R.J., Razani-Boroujerdi S., Sopori M.L. Nicotine inhibits Fc epsilon RI-induced cysteinyl leukotrienes and cytokine production without affecting mast cell degranulation through alpha 7/alpha 9/alpha 10-nicotinic receptors // J. Immunol. 2010. Vol. 185. № 1. P. 588–596.

17. Nazarov P.G., Pronina A.P. The influence of cholinergic agents on histamine release from HMC-1 human mast cell line stimulated with IgG, C-reactive protein and compound 48/80 // *Life Sci.* 2012. Vol. 91. № 21–22. P. 1053–1057.
18. Nazarov P.G., Pronina A.P., Trulioff A.S. C-reactive protein: Fc receptor-mediated effects on human peripheral blood basophils. In: *Basophil Granulocytes*. Ed. P.K. Vellis. New York: Nova Science Publishers. 2009. P. 95–121. (a).
19. Nazarov P.G., Pronina A.P., Trulioff A.S. C-reactive protein: Fc-gamma receptor-mediated effects on human peripheral blood basophils in vitro. In: *C-Reactive Protein: New Research*. Ed. S. Nagasawa. New York: Nova Science Publishers. 2009. P. 147–169. (b).
20. Radosa J., Dyck W., Goerdts S., Kurzen H. The cholinergic system in guttate psoriasis with special reference to mast cells // *Exp. Dermatol.* 2011. Vol. 20. № 8. P. 677–679.
21. Reinheimer T., Baumgärtner D., Höhle K.D., Racké K., Wessler I. Acetylcholine via muscarinic receptors inhibits histamine release from human isolated bronchi // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997. Vol. 156. № 2. Pt. 1. P. 389–395.
22. Reinheimer T., Möhlig T., Zimmermann S., Höhle K.D., Wessler I. Muscarinic control of histamine release from airways. Inhibitory M1-receptors in human bronchi but absence in rat trachea // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000. Vol. 162. № 2. Pt. 1. P. 534–538.
23. Ribatti D., Crivellato E. *Mast Cells and Tumours: from Biology to Clinic*. Springer Science+Business Media B.V., 2011. 142 p.
24. Schmutzler W., Poblete-Freundt G., Rauch K., Schoenfeld W. Response to immunological or cholinergic stimulation of isolated mast cells from man, guinea pig and rat // *Monogr. Allergy.* 1979. Vol. 14. P. 288–292.
25. Shi L., Zou L., Gao J., Xu H., Shi X., Chen H. Imidacloprid inhibits IgE-mediated RBL-2H3 cell degranulation and passive cutaneous anaphylaxis // *Asia Pac. Allergy.* 2016. Vol. 6. № 4. P. 236–244.
26. Shore P.A., Burkhalter A., Cohn V.H.Jr. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1959. Vol. 127. P. 182–186.
27. Tracey K.J. The inflammatory reflex // *Nature.* 2002. Vol. 420. № 6917. P. 853–859.
28. Wernersson S., Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle // *Nat. Rev. Immunol.* 2014. Vol. 14. № 7. P. 478–494.

Cholinergic regulation of peritoneal exudate mast cells activity

N.A. Kutukova¹, I.V. Kudryavtsev^{1,2}, M.K. Serebryakova¹,
V.V. Guselnikova¹, O.V. Shamova¹, P.G. Nazarov^{1,2}

¹Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg;

²Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg

The aim of the work was to study the nature of the effect of cholinergic agents on the spontaneous as well as on the induced by Fcε receptor (FcεR) ligand secretion of peritoneal exudate mast cells. Carbachol, a non-metabolizable acetylcholine analog, was chosen as a cholinomimetic. By recording histamine release, a dual pattern was found in the regulation of mast cell activity with carbachol. On one hand, the cholinomimetic stimulated mast cell degranulation, on the other — reliably suppressed the activation of peritoneal mast cells induced by the FcεR ligand in accordance with the concept of anti-inflammatory function of the parasympathetic nervous system. It was possible to identify differences from the classical idea of the cholinergic anti-inflammatory path. In contrast to the nicotine regulation of the "inflammatory reflex", muscarinic receptors are also involved in the process of peritoneal exudate mast cells activity modulation. Thus, the heterogeneity of the cholinergic effect on mast cells was demonstrated depending on the tissue affiliation of the latter. (*Cytokines and Inflammation*. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 58–65.)

Key words: mast cells, carbachol, cholinergic regulation.

Лептин и индекс апноэ/гипопноэ у больных бронхиальной астмой (Предварительное исследование)

В.Н. Минеев, Т.М. Лалаева, Р.Д. Скворцова, А.Н. Куликов

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург

Лептин: биомаркер расстройств сна?
(Leptin: A biomarker for sleep disorders? [1])

Цель исследования — установить возможную патогенетическую роль лептина при обструктивном апноэ сна у больных бронхиальной астмой (БА). Материалы и методы. Обследованы 18 больных БА. Лептин и адипонектин плазмы крови определяли иммуноферментным методом с использованием реактивов «Leptin ELISA» («DRG Diagnostics», Германия) и «Adiponectin ELISA» («DRG Diagnostics», Германия). Ночное респираторное мониторирование выполняли прибором «Somnolab 2 (Effort) Respiratory System» WM95115 07/2012 года фирмы «Weinmann» (Германия). Определяли индекс апноэ/гипопноэ сна. Результаты. Индекс апноэ/гипопноэ сна различается в зависимости от варианта БА, причем только при аллергическом варианте заболевания выявлены значения этого показателя, соответствующие легкой степени обструктивного апноэ сна. Корреляционный анализ значений индекса апноэ/гипопноэ и уровней лептина в группе больных БА с аллергическим и неаллергическим вариантами заболевания выявил достоверную обратную корреляцию. При факторном анализе выявлено, что уровень лептина в плазме крови негативно связан с уровнем индекса апноэ/гипопноэ и, наоборот, уровень адипонектина — позитивно. Заключение. Выявлено возможное участие адипокинов (лептина, адипонектина) в регуляции эпизодов апноэ/гипопноэ при БА, прежде всего при аллергическом варианте заболевания. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 66–70.)

Ключевые слова: лептин, адипонектин, обструктивное апноэ сна, бронхиальная астма.

Вынесенный в эпиграф вопрос о роли лептина в качестве индикатора нарушений сна представляет не только теоретический, но и важный практический интерес, в частности, у больных бронхиальной астмой (БА) в сочетании с обструктивным апноэ сна (ОАС) [1, 2]. Обращаем внимание на то, что вопросительный знак в эпиграфе означает, несомненно, отсутствие к сегодняшнему дню однозначного ответа на вопрос о роли лепти-

на в патогенезе ОАС и тем более при его сочетании с БА.

Как известно, у детей и взрослых больных БА наблюдается существенное возрастание числа случаев ОАС, особенно при тяжелом течении заболевания.

Нами ранее изучен целый ряд патогенетических механизмов БА, сочетающейся с избыточной массой тела, в частности, была показана роль лептина как одного из основных адипокинов, принимающих участие в развитии заболевания [3].

Минеев Валерий Николаевич, e-mail: vnmineev@mail.ru

С другой стороны, предполагается, что лептин может быть одним из связующих звеньев формирования ОАС при БА [2].

Цель исследования — установить возможную патогенетическую роль лептина в формировании синдрома ОАС у больных БА.

Материалы и методы

Обследованы 18 больных БА. Диагноз устанавливали в соответствии с критериями и стандартами международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА (GINA, 2016). Все обследованные больные БА находились в клинике госпитальной терапии им. акад. М.В. Чернуцкого Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. Проводили комплексное клинико-лабораторное и инструментальное обследование, включавшее общеклинические методы, цитологический и бактериологический анализы мокроты, а также аллергологическое исследование и исследование функции внешнего дыхания (ФВД).

Лептин и адипонектин плазмы крови определяли иммуноферментным методом по стандартному протоколу, основанному на принципе «сэндвич». Использовали наборы реактивов «Leptin ELISA» («DRG Diagnostics», Германия) и «Adiponectin ELISA» («DRG Diagnostics», Германия).

Проведение анализа осуществляли на иммуноанализаторе «Униплан-М» версия 1.04 с длиной волны 450 нм.

Ночное респираторное мониторирование (PM) выполняли прибором «Somnolab 2 (Effort) Respiratory System» WM95115 07/2012 года фирмы «Weinmann» (Германия) с регистрацией храпа и потока воздуха через нос с помощью канюли назального давления, сатурации с помощью датчика пульсоксиметрии, движений грудной клетки и живота с применением двойного торакоабдоминального ремня.

Статистическую обработку материала выполняли с использованием стандартного пакета прикладного статистического анализа «SPSS» для Windows (русифицированная версия 21.0).

Результаты и обсуждение

Результаты оценки некоторых показателей ОАС у больных с различными вариантами БА приведены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что один из важных критериев ОАС и его степени тяжести — индекс апноэ/гипопноэ сна — различается в зависимости от варианта БА, причем только при аллергическом варианте выявлены существенные значения этого показателя, которые соответствуют легкой степени ОАС.

Что касается других критериев ОАС, то, хотя выявлены различия между вариантами БА по этим критериям, но их значения не достигают статистической значимости, за исключением такого важного дополнительного критерия оценки тяжести ОАС как показатель снижения насыщения крови кислородом на фоне эпизодов апноэ/гипопноэ — индекс десатурации. Именно этот индекс существенно выше при аллергическом варианте БА.

При проведении корреляционного анализа в группе больных БА с аллергическим и неаллергическим вариантами заболевания значений индекса апноэ/гипопноэ и уровней лептина выявлена достоверная обратная корреляция (коэффициент корреляции Кендала): $\tau = -0,490$; $p = 0,01$; $n = 15$.

Таким образом, высокий уровень лептина в плазме крови у больных БА коррелирует с низкими значениями критериев ОАС.

Отметим, что корреляционный анализ не выявил связи значений индекса апноэ/гипопноэ и индекса массы тела.

Роль лептина при ОАС активно обсуждается в литературе и, если патогенетическая роль лептина плазмы крови окончательно не установлена, то его уровень в органе-мишени (мокрота, конденсат выдыхаемого воздуха) связывают практически бесспорно с наличием и формированием

Таблица 1

Результаты оценки некоторых показателей обструктивного апноэ сна у больных с различными вариантами бронхиальной астмы (M ± m)

Показатели	Аллергический вариант БА (1)	Неаллергический вариант БА (2)	p ₁₋₂
Индекс апноэ/гипопноэ	8,6 ± 2,3 (n = 9)	2,5 ± 1,1 (n = 6)	0,044
Средняя сатурация	94,2 ± 0,5 (n = 9)	93,7 ± 1,0 (n = 6)	> 0,05
Индекс десатурации	10,2 ± 2,5 (n = 4)	2,7 ± 0,7 (n = 5)	0,017
Средняя ЧСС	74,9 ± 6,7 (n = 9)	71,6 ± 6,1 (n = 6)	> 0,05
Количество эпизодов обструктивного апноэ	11,4 ± 6,0 (n = 5)	3,8 ± 2,0 (n = 5)	> 0,05
Количество эпизодов центрального апноэ	1,8 ± 0,9 (n = 5)	2,8 ± 1,5 (n = 5)	> 0,05
Средняя длительность апноэ	17,2 ± 0,6 (n = 5)	16,4 ± 5,4 (n = 5)	> 0,05
Лептин в плазме крови (нг/мл)	75,4 ± 10,6 (n = 9)	86,8 ± 19,3 (n = 6)	> 0,05
Адипонектин в плазме крови (мкг/мл)	12,5 ± 2,2 (n = 9)	13,4 ± 5,9 (n = 6)	> 0,05

Примечание. БА — бронхиальная астма, ЧСС — частота сердечных сокращений.

ОАС [4, 5]. Это мнение базируется на том факте, что лептин в органе-мишени — легких — отражает, прежде всего, нейтрофильное воспаление в бронхах.

Учитывая эти данные, нами проведен корреляционный анализ связи уровня лептина в мокроте у 5 больных БА со значениями индекса апноэ/гипопноэ, который выявил положительную, хотя и незначимую корреляционную зависимость между этими показателями: $r=0,446$, $n=5$, $p>0,05$.

Что касается обнаружения лептина в бронхиальном содержимом при БА, то нами этот феномен рассмотрен ранее с позиции нереспираторных функций легких как выделительного органа, реализующего эту функцию, в частности, при повышении проницаемости бронховаскулярного барьера при аллергическом воспалении [6].

Кроме этого, нами проведен факторный анализ, который, как известно, способствует отысканию скрытых, но объективно существующих закономерностей исследуемого процесса. В факторный анализ включены (табл. 2) как уровень лептина и адипонектина (характеристика адипоки-

новой системы), индекс апноэ/гипопноэ (характеристика ОАС), так и показатели, характеризующие некоторые факторы риска (пол, возраст), а также показатели, связанные с характеристикой БА (клинико-патогенетический вариант заболевания, тяжесть течения, длительность патогенетической противовоспалительной терапии (ингаляционные глюкокортикостероиды (ГКС)).

Необходимо подчеркнуть, что в ходе проведения факторного анализа была выполнена проверка целесообразности использования факторной модели: критерий сферичности Бартлетта составил $p<0,00001$; значение критерия адекватности выборки Кайзера — Мейера — Олкина — $0,427$, что свидетельствует о приемлемой адекватности примененного нами факторного анализа.

Как видно из табл. 2, факторный анализ позволил выделить 3 фактора.

Фактор 1 отражает те регуляторные механизмы при бронхиальной астме, которые связаны с эпизодами апноэ/гипопноэ, а именно адипокиновую регуляцию, причем высокий уровень индек-

Таблица 2

Результаты факторного анализа при бронхиальной астме

Фактор 1, дисперсия 39,1%		Фактор 2, дисперсия 27,1%		Фактор 3, дисперсия 15,3%	
Лептин (нг/мл)	-0,883	Тяжесть течения БА:	0,965	Пол пациента:	0,796
		1 — легкое		1 — мужчины	
		2 — средней тяжести		2 — женщины	
		3 — тяжелое			
Индекс апноэ/гипопноэ	0,857	Длительность применения ИКС на догоспитальном этапе (лет)	0,965	Адипонектин (мкг/мл)	0,707
Возраст пациента (лет)	0,766	Вариант БА:	0,797	Вариант БА:	0,398
		1 — аллергический		1 — аллергический	
		2 — неаллергический		2 — неаллергический	
Адипонектин (мкг/мл)	0,535	Адипонектин (мкг/мл)	0,176	Индекс апноэ/гипопноэ	-0,177
Пол пациента:	-0,382	Лептин (нг/мл)	0,143	Лептин (нг/мл)	-0,114
1 — мужчины					
2 — женщины					
Тяжесть течения БА:	-0,181	Индекс апноэ/гипопноэ	-0,136	Возраст пациента (лет)	-0,052
1 — легкое					
2 — средней тяжести					
3 — тяжелое					
Длительность применения ИКС на догоспитальном этапе (лет)	-0,180	Возраст пациента (лет)	-0,076	Тяжесть течения БА:	-0,044
				1 — легкое	
				2 — средней тяжести	
				3 — тяжелое	
Вариант БА:	0,056	Пол пациента:	-0,003	Длительность применения ИКС на догоспитальном этапе (лет)	-0,044
1 — аллергический		1 — мужчины			
2 — неаллергический		2 — женщины			

Примечание. БА — бронхиальная астма, ИКС — ингаляционные глюкокортикостероиды.

са апноэ/гипопноэ связан с низким уровнем лептина в плазме крови.

При этом такая важная характеристика ОАС, как индекс апноэ/гипопноэ связана как с полом, так и с увеличением возраста.

Отметим, что компонента Фактора 1, отражающая тяжесть течения бронхиальной астмы, негативно связана с индексом апноэ/гипопноэ.

К аналогичному выводу пришли авторы исследования, в котором, во-первых, выявлено «парадоксальное» (авторские [7] кавычки) снижение циркулирующего уровня лептина в больных с тяжелой степенью ОАС, а, во-вторых, показано, что критерием тяжести ОАС является адипонектин [7].

В нашем исследовании (см. **табл. 2**) при факторном анализе (Фактор 1), действительно, компонента, отражающая уровень адипонектина, с положительным знаком связана с компонентой индекса апноэ/гипопноэ.

Фактор 2 (см. **табл. 2**) характеризует само заболевание — БА, причем компоненты, отражающие уровни адипокинов (лептина и адипонектина), позитивно связаны с характеристиками более тяжелого течения БА.

Фактор 3 (см. **табл. 2**) дополнительной существенной информации для решения поставленной нами цели не дает, указывая лишь на важность именно адипонектина и гендерных различий при характеристике бронхиальной астмы с учетом такого важного критерия ОАС, как индекс апноэ/гипопноэ.

В этой связи отметим, что в обследуемую нами группу больных вошли преимущественно больные женского пола. Также отметим, что уровень адипонектина в плазме крови у больных БА женского пола выше, чем у мужчин [3].

В наше исследование дополнительно вошли трое больных БА (все трое женского пола), одна из которых страдала аспириновым вариантом, а двое других — гормонозависимым вариантом заболевания.

Так, у больной с аспириновым вариантом БА, относящийся к наиболее тяжелым вариантам течения заболевания, обнаружен индекс апноэ/гипопноэ — 17,0 (средняя тяжесть ОАС), что выше среднего значения при аллергическом варианте почти в 2 раза. Уровень лептина при этом составил всего 8 нг/мл (в среднем при аллергическом варианте — 75, 4 нг/мл).

Вполне ожидаемыми у больной с гормонозависимым вариантом БА оказались высокие значения индекса апноэ/гипопноэ 14,3 и низкий уровень лептина 1,8 нг/мл. Отметим, что обе вышеупомянутые пациентки получали ингаляционную терапию ГКС.

С другой стороны, у второй больной с гормонозависимым вариантом БА, которая получала лечение пероральными системными ГКС, индекс

апноэ/гипопноэ составил всего 0,9, а уровень лептина был высоким — 126,5 нг/мл.

Приведенные данные интересны с точки зрения обсуждения участия ГКС как фактора риска для формирования ОАС. Во всяком случае, как показано, в Факторе 1 (см. **табл. 2**) длительность применения ингаляционных глюкокортикостероидов негативно связана с индексом апноэ/гипопноэ.

В заключение отметим, что нами в предварительном исследовании выявлено, что индекс апноэ/гипопноэ сна различается в зависимости от варианта бронхиальной астмы, причем только при аллергическом варианте выявлены существенные значения этого показателя, которые соответствуют легкой степени ОАС. Кроме этого, индекс десатурации также существенно выше при аллергическом варианте заболевания.

При проведении корреляционного анализа в группе больных БА с аллергическим и неаллергическим вариантами заболевания значений индекса апноэ/гипопноэ и уровней лептина выявлена достоверная обратная корреляция.

С другой стороны, в небольшой группе больных БА корреляционный анализ связи уровня лептина в мокроте (в органе-мишени — легких) и значениями индекса апноэ/гипопноэ неожиданно выявил положительную, хотя и незначимую корреляционную зависимость между этими показателями, что обращает внимание и требует дополнительных исследований.

При факторном анализе выявлено, что компонента, отражающая уровень лептина в плазме крови, негативно связана с уровнем индекса апноэ/гипопноэ и, наоборот, уровень адипонектина — с положительным знаком связан с компонентой индекса апноэ/гипопноэ. Данный вывод диктует необходимость отдельных исследований адипонектина как связующего звена ОАС и БА. Любопытно, еще один адипокин предъявлен в качестве возможного маркера для ОАС — грелин [8].

Таким образом, очевидна противоречивость данных литературы и наших собственных в отношении роли адипокинов в патогенезе обструктивного апноэ сна и тем более при сочетании обструктивного апноэ сна и бронхиальной астмы. Думается, что причина подобной противоречивости кроется в том, что каждый адипокин проявляет свой эффект на уровне организма в норме и в условиях патологии лишь в тесной (сбалансированной или несбалансированной) взаиморегуляции.

Так, нами ранее была сделана попытка изучить ассоциацию (микросеть) апелина-12, адипонектина, лептина и резистина при аллергической бронхиальной астме, что позволило выдвинуть представление об определенной специализации

эффектов адипокинов в регуляции патогенетических механизмов при бронхиальной астме [9].

Ограничениями нашего исследования являются сравнительно небольшое число обследованных больных, преимущественно женского пола (что характерно для бронхиальной астмы). В дальнейшем необходима рандомизация больных по полу, возрасту, сопутствующей патологии, влиянию различных вариантов терапии, прежде всего глюкокортикоидной.

Необходимы комплексные исследования патогенетической роли всего спектра адипокинов в одной и той же популяции больных.

Благодарность: благодарим студентов лечебного факультета Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова Бабинцеву А.Ю. и Кондратьеву Т.С. за помощь при создании базы данных больных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабак С.Л., Горбунова М.В., Малавин А.Г. Бронхиальная астма и обструктивное апноэ сна: аналитический обзор // Практическая пульмонология. 2018. № 1. С. 3–11.
2. Mineev V.N., Lalaeva T.M., Vasil'eva T.S., Kuz'mina A.A. Лептин и адипонектин при бронхиальной астме // Цитокины воспал. 2015. Т. 14. № 1. С. 68–75.
3. Mineev V.N., Lalaeva T.M., Vasil'eva T.S., Kuz'mina A.A. [Leptin and adiponectin in bronchial asthma] // Cytokines and Inflammation (St. Petersburg). 2015. Vol. 14. № 1. P. 68–75. Russian.
4. Mineev V.N., Lalaeva T.M., Vasil'eva T.S., Kuz'mina A.A. Мокрота как источник адипокинов при бронхиальной астме // Ученые записки Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета. 2014. № 3. С. 34–40.
5. Mineev V.N., Lalaeva T.M., Vasil'eva T.S., Kuz'mina A.A. [Sputum as a source of adipokines in bronchial asthma] // Uchenye Zapiski of the First St. Petersburg State Medical University. 2014. № 3. P. 34–40. Russian.
6. Mineev V.N., Lalaeva T.M., Kuz'mina A.A. Ассоциация апелина-12, адипонектина, лептина и резистина при аллергической бронхиальной астме — использование интегральных индексов // Иммунопатология, аллергология, инфектология // 2015. № 1. С. 30–34.
7. Mineev V.N., Lalaeva T.M., Kuz'mina A.A. [Association of apelin-12, adiponectin, leptin and resistin in allergic bronchial asthma evaluated with integral indices] // Immunopatologiya, Allergologiya, Infektologiya. 2015. № 1. P. 30–34. Russian.
8. Al Mutairi S., Mojiminiyi O.A., Al Alawi A., Al Rammah T., Abdella N. Study of leptin and adiponectin as disease markers in subjects with obstructive sleep apnea // Dis. Markers. 2014. Vol. 2014. P. 706314. doi: 10.1155/2014/706314.
9. Carpagnano G.E., Resta O., Pergola G.D., Sabato R., Foschino Barbaro M.P. The role of obstructive sleep apnea syndrome and obesity in determining leptin in the exhaled breath condensate // J. Breath. Res. 2010. Vol. 4. № 3. P. 036003. doi: 10.1088/1752-7155/4/3/036003.
10. Imayama I., Prasad B. Role of leptin in obstructive sleep apnea // Ann. Am. Thorac Soc. 2017. Vol. 14. № 11. P. 1607–1621. doi: 10.1513/AnnalsATS.201702-181FR.
11. Pan W., Kastin A.J. Leptin: a biomarker for sleep disorders? // Sleep Med. Rev. 2014. Vol. 18. № 3. P. 283–290. doi: 10.1016/j.smrv.2013.07.003.
12. Ursavas A., Ilcol Y.O., Nalci N., Karadag M., Ege E. Ghrelin, leptin, adiponectin, and resistin levels in sleep apnea syndrome: Role of obesity // Ann. Thorac. Med. 2010. Vol. 5. № 3. P. 161–165. doi: 10.4103/1817-1737.65050.

Leptin and apnea/hypopnea index in patients with bronchial asthma (Preliminary study)

V.N. Mineev, T.M. Lalaeva, R.D. Skvortsova, A.N. Kulikov
Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg

The purpose of the study was to establish the possible pathogenetic role of leptin in obstructive sleep apnea in patients with bronchial asthma (BA). Materials and methods. 18 patients with BA were examined. Plasma leptin and adiponectin were determined by ELISA using "Leptin ELISA" reagent kits ("DRG Diagnostics", Germany) and "Adiponectin ELISA" ("DRG Diagnostics", Germany). Overnight respiratory monitoring was performed with a "Sinnolab 2 (Effort) Respiratory System" device (WM95115) on 07/2012 of the "Weinmann company" (Germany). The sleep apnea/hypopnea index was determined. Results. The sleep apnea/hypopnea index differs depending on the variant of BA, and only in the case of the allergic variant of the disease the values of this indicator correspond to a mild obstructive sleep apnea. A correlation analysis of the values of the apnea/hypopnea index and leptin levels in the group of patients with allergic and non-allergic variants of BA revealed a significant inverse correlation. Factor analysis revealed that the level of plasma leptin is negatively related to the level of the apnea/hypopnea index and, on the other hand, the level of plasma adiponectin is positively related to the level of the apnea/hypopnea index. Conclusion. The possible involvement of adipokines (leptin, adiponectin) in the regulation of episodes of apnea/hypopnea index in BA, especially in allergic variant of the disease, has been revealed. (Cytokines and Inflammation. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 66–70.)

Key words: leptin, adiponectin, obstructive sleep apnea, bronchial asthma.

Влияние семафорина 3А на адгезию тимоцитов к клеткам эпителия тимуса при опухолевом росте

К.В. Рутто¹, И.В. Кудрявцев¹, В.И. Людино¹, Е.П. Киселева^{1,2}

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

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Рост опухолей у человека и животных сопровождается развитием инволюции тимуса, которая приводит к снижению тимопоэза и выхода наивных Т-лимфоцитов на периферию. Адгезия тимоцитов к эпителиальным клеткам тимуса при опухолевом росте не изучалась. Одним из цитокинов, влияющих на адгезию тимоцитов в нормальных условиях, является нейрональный фактор семафорин 3А. Целью данной работы послужило изучение влияния семафорина 3А на адгезию тимоцитов, полученных от животных с перевиваемой опухолью гепатомой 22а, к эпителиальным клеткам тимуса мыши *in vitro*. В настоящей работе впервые была исследована адгезия тимоцитов к эпителиальным клеткам тимуса мыши при росте экспериментальной опухоли. Впервые показано, что семафорин 3А влиял на этот процесс противоположным образом: если в контроле адгезия тимоцитов в присутствии семафорина 3А снижалась, то адгезия тимоцитов, полученных от животных с гепатомой 22а, в присутствии этого фактора, наоборот, повышалась. Этот эффект не был связан с изменением экспрессии рецепторов Nrp-1 и PlexA1 в тимоцитах, что было показано как на уровне экспрессии мРНК, так и по мембранной экспрессии, которую оценивали с помощью проточной цитометрии. Полученные данные имеют существенное значение для лучшего понимания внутритимусных процессов межклеточного взаимодействия и их особенностей в условиях опухолевого роста. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 71–74.)

Ключевые слова: тимоциты, эпителиальные клетки, адгезия, семафорин 3А, нейропилин-1, плексин А1.

Рост опухолей у человека и животных сопровождается развитием инволюции тимуса, которая приводит к снижению тимопоэза и выхода наивных Т-лимфоцитов на периферию [10]. Несмотря на то, что поддержание пула периферических Т-лимфоцитов у взрослых происходит, в основном, благодаря гомеостатической пролиферации, выход вновь образованных Т-клеток из тимуса играет существенную роль в поддержании разнообразия Т-клеточных рецепторов (TCR) и развитии полноценного иммунного ответа на новые антигены [3]. На основании этого можно полагать,

что инволюция тимуса у взрослых (как связанная с возрастом, так и не связанная — наблюдаемая, например, при опухолевом росте) может приводить к развитию Т-клеточного иммунодефицита и вследствие этого к нарушению противoinфекционной защиты и иммунного ответа на опухолевые антигены [5].

Характер нарушений тимопоэза при росте экспериментальных опухолей изучен достаточно подробно [4]. Тем не менее, один из важных этапов взаимодействия тимоцитов и эпителиальных клеток тимуса, а именно процесс адгезии, при опухолевом росте не изучался. Клеточные контакты между тимоцитами и эпителиальными клетками необходимы для осуществления позитивной и

Киселева Екатерина Прохоровна, e-mail: ekissele@yandex.ru

негативной селекции, а также для передачи ростовых и дифференцировочных сигналов [2]. Несмотря на значимость этих процессов, механизмы адгезии тимоцитов к клеткам эпителия тимуса и их регуляция даже и при нормальных условиях изучены недостаточно. Одним из цитокинов, влияющих на адгезию тимоцитов, является нейрональный фактор семафорин 3А. Показано, что семафорин 3А подавляет адгезию тимоцитов к эпителиальным клеткам тимуса человека *in vitro* [9]. Влияние этого фактора на процесс адгезии тимоцитов к эпителиальным клеткам тимуса при росте опухоли не исследовано.

Целью данной работы послужило изучение влияния семафорина 3А на адгезию тимоцитов, полученных от животных с перевиваемой опухолью гепатомой 22а, к эпителиальным клеткам тимуса мыши *in vitro*.

Материалы и методы

Животные и опухолевые клетки. Клетки гепатомы 22а (из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН) культивировали в среде DMEM («Sigma», США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone», Великобритания). Для получения сингенных опухолей мышам линии СЗНА массой 16–18 г, полученным из питомника «Рапполово», Санкт-Петербург, вводили суспензию клеток гепатомы подкожно в область спины в количестве 2×10^5 на мышь; контрольные животные получали инъекцию физиологического раствора. Животных убивали путем цервикальной дислокации на 7-е и 21-е сутки опухолевого роста и исследовали тимоциты. Как показано было нами ранее, 7-е сутки соответствовали времени появления пальпируемого образования опухоли и неопластического роста, а 21-е сутки — начальному этапу развития инволюции тимуса, еще до появления выраженных признаков опустошения и изменения популяционно-го состава тимоцитов [8].

Адгезия тимоцитов к клеткам эпителия тимуса. В работе использовали клеточные линии эпителия тимуса мыши — кортикального tEC1-2 и медуллярного mTEC3-10, любезно предоставленные в наше распоряжение профессором М. Kasaи из Токийского университета [7]. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки до образования монослоя. Тимоциты получали от опухолевых и контрольных животных путем раздавливания тимусов и приготовления клеточной суспензии. Адгезию тимоцитов к клеткам эпителия проводили по методу Lepelletier Y. и др. с небольшими модификациями [9]. К монослою эпителиальных клеток, культивируемых в 24-луночных планшетах, добавляли $1,25 \times 10^6$ тимоцитов на лунку в среде DMEM с добавлением 1% фетальной сыворотки и инкубировали в объеме 500 мкл в течение 30 или 120 минут в CO₂-инкубаторе в присутствии или в отсутствие семафорина 3А. Соотношение тимоцитов и клеток эпителия составляло 3:1. После инкубации монослой отмывали от неприкрепившихся тимоцитов, а оставшиеся клетки отделяли от дна планшета с помощью 0,25% раствора трипсина. Клетки ресуспендировали

в среде DMEM, содержащей 20% фетальной сыворотки для инактивации трипсина, и подсчитывали в камере Горяева, где тимоциты значительно отличались от эпителиальных клеток по размеру и морфологии. Концентрация эпителиальных клеток была постоянной в пределах одного эксперимента. Индекс адгезии выражали в процентах как отношение числа прикрепившихся тимоцитов к числу внесенных тимоцитов.

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Для оценки уровня экспрессии мРНК рецепторов семафорина 3А, таких как плексин А1 (PlexA1) и нейропилин-1 (Nrp-1), в тимocyтах мышей использовали полуквантитативный метод обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Общую РНК выделяли одноступенчатым методом с помощью TRI реактива («Sigma», США). Для проведения ОТ использовали 2 мкг общей РНК на пробу в присутствии 0,5 мкг олиго(дТ)15 праймеров и обратной транскриптазы М-MLV («Promega», США) в соответствии с протоколом производителя. Полученные кДНК амплифицировали с помощью ПЦР, которую проводили с использованием специфических праймеров. Их подбирали индивидуально таким образом, чтобы длина продукта при прохождении реакции на кДНК и ядерной ДНК была различной. Использовали следующие праймеры: для PlexA1: прямой 5'-actgcccagctgactcaccagc-3' и обратный 5'-gggctgcaaagcaccttgccca-3' (размер продукта 202 пары нуклеотидов, 32 цикла); для Nrp-1: прямой 5'-tggtctggatggtgttgggc-3' и обратный 5'-aagagaggaagggggct-3' (размер продукта 865 пар нуклеотидов, 30 циклов). В качестве гена сравнения использовали β-актин; праймеры для β-актина: прямой 5'-atggatgacgatatcgct-3' и обратный 5'-atgaggtagtctgtcaggt-3' (размер продукта 568 пар нуклеотидов, 22 цикла). Визуализацию ПЦР-продуктов осуществляли в 1% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, с последующим фотографированием полос в геле и их денситометрией с помощью программы «ScionImage».

Выявление поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии. Мембранную экспрессию Nrp-1 и PlexA1 на тимocyтах определяли на проточном цитофлуориметре «Navios» («Beckman Coulter», США) с помощью козьих антител против NRP-1 мыши, меченных карбоксифлуоресцеином CFS (FAB566F, «R&D Systems», США), а также моноклональных крысиных антител против PlexA1 мыши, меченных аллофикоцианином APC (FAB4309A, «R&D Systems», США), и соответствующих изотипических антител. Кроме того, исследовали популяционный состав тимоцитов с использованием моноклональных антител против CD4 мыши, меченных фикоэритрином PE («BD Pharmingen», США) и CD8 PE-Cy7 («BD Pharmingen», США). Для каждого из образцов было проанализировано не менее 25 000 одиночных клеток. Обработку данных проводили при помощи программы «Kaluza™ v.1.3» («Beckman Coulter», США).

Статистическая обработка. Данные обрабатывали статистически с помощью t-теста (критерий Стьюдента).

Результаты и обсуждение

При исследовании адгезии тимоцитов, полученных от мышей-опухоленосителей и конт-

рольных животных, индексы адгезии тимоцитов к клеткам эпителия обеих линий не различались и составляли 28–36%, что свидетельствовало об отсутствии нарушений адгезии при росте гепатомы. Однако при исследовании адгезии тимоцитов у животных с опухолями в присутствии семафорина 3А наблюдали изменения. Если в контроле адгезия тимоцитов в присутствии 100 и 200 нг/мл семафорина 3А снижалась, то адгезия тимоцитов, полученных от животных на 7-е и 21-е сутки опухолевого роста, в присутствии семафорина 3А, наоборот, повышалась (таблица). Эффект, который наблюдали при исследовании адгезии тимоцитов опухоленосителей к клеткам эпителия линии сТЕС1-2, был также получен и при использовании другой клеточной линии — mТЕС3-10. Таким образом, было показано, что семафорин 3А влияет на адгезию тимоцитов мышей с опухолями противоположным образом по сравнению с тимоцитами от контрольных животных.

Чтобы ответить на вопрос, не связан ли этот эффект с изменением экспрессии рецепторов семафорина 3А, а именно Nrp-1 и PlexA1, ее исследовали с помощью двух методов — ОТ-ПЦР и проточной цитофлуориметрии.

С помощью ОТ-ПЦР было выявлено отсутствие изменений экспрессии мРНК PlexA1 в тимоцитах животных с гепатомой на 7-е и 21-е сутки опухолевого роста, что было также подтверждено при проведении проточной цитофлуориметрии. Так, на 7-е сутки опухолевого роста процент содержания PlexA1⁺ тимоцитов составил 31,8±12,7 в контроле и 24,0±0,9 у животных с опухолью (n=4); на 21-е сутки — 23,73±4,74 в контроле и 20,23±5,62 у животных с гепатомой (n=6).

При исследовании другого рецептора с помощью ОТ-ПЦР было показано усиление экспрессии мРНК Nrp-1 в тимоцитах на 7-е и 28-е сутки

опухолевого роста. Так, этот показатель на 7-е сутки опухолевого роста составил в контроле 1,72±0,13 у. е. (n=9) и 3,86±0,88 у. е. (n=11) у животных с гепатомой (p<0,05); а на 21-е сутки — 1,66±0,16 у. е. (n=12) в контроле и 2,82±0,29 (n=12) у животных с гепатомой (p<0,01). Однако при исследовании Nrp-1 на мембране тимоцитов с помощью проточной цитофлуориметрии у животных с гепатомой отличий от контроля не было обнаружено. Процент содержания Nrp-1⁺ клеток среди тимоцитов не изменялся как на 7-е сутки опухолевого роста (44,06±2,99 — в контроле; 48,87±3,28 — у мышей с гепатомой 22а, n=10), так и на 21-е сутки опухолевого роста (59,45±1,77 — в контроле; 55,24±3,08 — у животных с гепатомой 22а, n=7).

Существенных изменений экспрессии Nrp-1 по основным субпопуляциям тимоцитов среди CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻, CD4⁺ и CD8⁺ клеток также не выявлено. Так, на 21-е сутки роста гепатомы содержание Nrp-1⁺ тимоцитов среди CD4⁺CD8⁺ клеток составило 42,9±4,7% в контрольной группе и 46,8±3,9% у опухоленосителей; среди CD4⁺CD8⁻ клеток — 24,5±6,7% в контроле и 29,5±5,8% при росте гепатомы; среди CD4⁺CD8⁻ клеток — 15,5±2,7 в контроле и 16,8±2,5 у животных с опухолями; среди CD8⁺CD4⁻ клеток — 18,2±2,3 в контроле и 16,3±0,9 у опухоленосителей.

Полученные данные не подтвердили результаты, полученные с помощью ОТ-ПЦР, и не позволяют сделать вывод об изменении мембранной экспрессии данного рецептора на тимоцитах у животных с гепатомой. Возможно, несмотря на усиление экспрессии данного рецептора на уровне мРНК, его мембранная экспрессия по каким-то причинам не изменяется.

Семафорин 3А известен как фактор, регулирующий направление роста аксонов. Однако в последнее время он также привлек к себе внимание

Таблица

Влияние семафорина 3А на адгезию тимоцитов, полученных от контрольных мышей и опухоленосителей, при постановке экспериментов с клетками эпителия тимуса линии сТЕС1-2

Время после инокуляции опухоли, сут	Концентрация семафорина 3А, нг/мл	Индексы адгезии тимоцитов, полученных от мышей	
		интактных	с гепатомой 22а
7	0	38,87±0,89	36,26±0,5
	10	41,34±2,42	39,67±0,56
	100	35,57±4,17	37,45±0,87
	200	31,61±1,28*	42,25±1,45*
21	0	34,76±1,07	33,82±0,16
	10	32,18±2,08	33,07±1,37
	100	28,52±1,54**	42,84±0,17***
	200	26,85±1,31**	42,94±2,62**

Примечание. В таблице указаны индексы адгезии, %, М±m, n=4–6. Приведена достоверность различий между индексом адгезии в присутствии семафорина 3А по сравнению с группой без семафорина у тех же мышей при: * — p<0,05, ** — p<0,01, *** — p<0,001.

иммунологов и рассматривается в основном как ингибитор ряда иммунологических функций, связанных с активностью периферических Т-лимфоцитов и клеток тимуса [11]. В частности, показано, что семафорин 3А оказывает хеморепеллентный эффект и ингибирует хемокин-индуцированную миграцию тимоцитов человека, а также оказывает подавляющее действие на адгезию тимоцитов человека к эпителиальным клеткам тимуса *in vitro* [6, 9]. Поскольку этот фактор синтезируется локально в тимусе стромальными клетками и тимоцитами, предполагают, что он может играть существенную роль в регуляции миграции и адгезии тимоцитов и тем самым оказывать влияние на взаимодействие тимоцитов с эпителиальными клетками тимуса также и в организме [9].

В настоящей работе впервые была исследована адгезия тимоцитов к эпителиальным клеткам тимуса мыши при росте экспериментальной опухоли

и впервые показано, что семафорин 3А влиял на этот процесс противоположным образом по сравнению с контрольными животными. Этот эффект не был связан с изменением экспрессии рецепторов Nrp-1 и PlexA1 в тимоцитах. Как было показано нами ранее, в тимусе также не происходили какие-либо количественные изменения содержания самого семафорина 3А при росте гепатомы 22а [1]. Можно предположить, что инверсия ответа тимоцитов на семафорин 3А у животных с опухолями связана с нарушениями внутриклеточной передачи сигнала, что, однако, требует специального исследования.

Полученные данные имеют существенное значение для лучшего понимания внутритимусных процессов межклеточного взаимодействия и их особенностей в условиях опухолевого роста.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-06150).

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселева Е.П., Лямина И.В., Цвиркун С.А., Рутто К.В., Кудрявцев И.В., Людино В.И. Изучение роли семафорина 3А в тимусе в норме и при опухолевом росте // Мед. акад. ж. 2013. Т. 13. № 4. С. 42–48.
2. Kisseleva E.P., Lyamina I.V., Tsvirkun S.A., Rutto K.V., Kudryavtsev I.V., Liudyno V.I. [Investigation of the role of semaphorin 3A in the thymus at normal conditions and tumor growth] // Med. Acad. Zh. 2013. Vol. 13. № 4. P. 42–48. Russian.
3. Abramson J., Anderson G. Thymic epithelial cells // Annu. Rev. Immunol. 2017. Vol. 35. P. 85–118.
4. Aw D., Palmer D.B. The origin and implication of thymic involution // Aging Dis. 2011. Vol. 2. № 5. P. 437–443.
5. Carrio R., Lopez D.M. Insights into thymic involution in tumor-bearing mice // Immunol. Res. 2013. Vol. 57. № 1–3. P. 106–114.
6. Dowling M.R., Hodgkin P.D. Why does the thymus involute? A selection-based hypothesis // Trends Immunol. 2009. Vol. 30. № 7. P. 295–300.
7. Garcia F., Lepelletier Y., Smaniotto S., Hedj-Slimane R., Dardenne M., Hermine O., Savino W. Inhibitory effect of semaphorin-3A, a known axon guidance molecule, in the human thymocyte migration induced by CXCL12 // J. Leukoc. Biol. 2012. Vol. 91. № 1. P. 7–13.
8. Kasai M., Mizuochi T. Culture and characterization of thymic epithelial cell lines // Methods Mol. Biol. 2007. Vol. 380. P. 107–123.
9. Kisseleva E.P., Krylov A.V., Stepanova O.I., Liudyno V.I. Transplantable subcutaneous hepatoma 22a affects functional activity of resident tissue macrophages in periphery // Int. J. Cell. Biol. 2011. Vol. 2011. P. 793034. doi: 10.1155/2011/793034.
10. Lepelletier Y., Smaniotto S., Hadj-Slimane R., Villa-Verde D.M., Nogueira A.C., Dardenne M., Hermine O., Savino W. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104. № 13. P. 5545–5550.
11. Song Y., Yu R., Wang C., Chi F., Guo Z., Zhu X. Disruption of the thymic microenvironment is associated with thymic involution of transitional cell cancer // Urol. Int. 2014. Vol. 92. № 1. P. 104–115.
12. Takamatsu H., Kumanogoh A. Diverse role for semaphorin-plexin signaling in the immune system // Trends Immunol. 2012. Vol. 33. № 3. P. 127–135.

The influence of semaphorin 3A on thymocyte adhesion to thymic epithelial cells during tumor growth

K.V. Rutto¹, I.V. Kudryavtsev¹, V.I. Liudyno¹, E.P. Kisseleva^{1,2}

¹Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg;

²I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg

Tumor growth in humans and animals is accompanied by thymic involution which leads to down-regulation of thymopoiesis and decrease of naive T lymphocyte output to periphery. Adhesion of thymocytes to thymic epithelial cells during tumor growth was not studied. Neuronal factor semaphorin 3A is one of the cytokines that influence thymocyte adhesion in normal conditions. The aim of the study was to evaluate the influence of semaphorin 3A on thymocyte adhesion to thymic epithelial cells *in vitro* when thymocytes were obtained from mice bearing hepatoma 22a. Adhesion of thymocytes to murine thymic epithelial cells was studied here for the first time. It was shown for the first time that semaphorin 3A influenced this process oppositely: while semaphorin 3A down-regulated adhesion of control thymocytes, adhesion of thymocytes obtained from hepatoma 22a bearing mice was inversely up-regulated. This effect was not associated with changes in the expression of thymocyte receptors –Nrp-1 and PlexA1 at mRNA level as well as at the level of membrane expression evaluated with flow cytometry. The data obtained are important for better understanding of cell-cell interactions inside the thymus and their special features at tumor growth. (Cytokines and Inflammation. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 71–74.)

Key words: thymocytes, epithelial cells, adhesion, semaphorin 3A, neuropilins-1, plexin A1.

Бактериальная аргининдеиминаза нарушает структуру актинового цитоскелета эндотелиальных клеток

Дж.Т. Маммедова^{1, 2}, Э.А. Старикова¹, Л.А. Бурова¹,
А.Б. Малашичева^{3, 4}, Д.С. Семёнова^{3, 4}, И.С. Фрейдлин^{1, 5}

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

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт
(Технический университет)»;

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр
имени В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

⁴ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»;

⁵ ФГОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Бактериальный фермент аргининдеиминаза осуществляет гидролиз аргинина, что приводит к дефициту этой аминокислоты в микроокружении клеток организма-хозяина. Снижение биодоступности аргинина при бактериальной инфекции может быть одной из причин эндотелиальной дисфункции. В настоящей работе проанализированы изменения структурной организации актинового цитоскелета эндотелиальных клеток пуповинной вены человека (HUVEC) под влиянием супернатантов разрушенных *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с инактивированным геном аргининдеиминазы *ArcA* (M49-16del*ArcA*). Окрашивание актинового цитоскелета HUVEC производили раствором родамин-фаллоидина. Показано, что при культивировании клеток с супернатантом разрушенных *S. pyogenes* M49-16del*ArcA* морфология и структура актинового цитоскелета не изменялась. В присутствии супернатантов разрушенных *S. pyogenes* M49-16 морфология клеток изменялась, нарушалось формирование ведущей ламеллы и снижалось количество стресс-фибрилл. Внесение избытка аргинина в культуральную среду приводило к восстановлению морфологии клеток и структуры актинового цитоскелета. Полученные данные позволяют предположить, что аргининдеиминаза может быть одним из факторов, вызывающих эндотелиальную дисфункцию за счет нарушения микроархитектоники актинового цитоскелета. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 75–79.)

Ключевые слова: *S. pyogenes*, аргининдеиминаза, HUVEC, актиновый цитоскелет.

Аргинин — условно заменимая аминокислота, которая является предшественником для синтеза оксида азота и полиаминов, играющих важную роль в поддержании гомеостаза сосудов [8].

Многие патогенные микроорганизмы вмешиваются в метаболизм аргинина организма-хозяина [17]. Аргининдеиминаза (АД) — фермент, гидро-

лизующий аргинин до цитруллина и аммиака, что позволяет бактериям противостоять влиянию ряда абиотических факторов и выживать в условиях низкой кислотности и гипоксии [10, 11]. В то же время активность фермента приводит к дефициту аргинина в микроокружении клеток организма-хозяина [15, 23, 28].

Ранее было показано, что АД, выделенная из *Mycoplasma spp.*, подавляет пролиферацию эн-

Маммедова Дженнет Тумаровна, e-mail: jennet_m@mail.ru

дотелиальных клеток вены пупочного канатика человека, их миграцию в модели «раны», формирование капилляроподобных структур на матриксе *in vitro*, а также в модели хориоаллантоической мембраны куриных эмбрионов и мышинной модели с матриксом *in vivo* [6, 23]. Эти результаты были подтверждены для АД, выделенной из *S. pyogenes*, на эндотелиальных клетках линии EA.hy926 и эндотелиальных клетках вены пупочного канатика HUVEC [1, 3].

Патогенные бактерии вырабатывают различные биологически активные субстанции, позволяющие им диссеминировать из первичного очага в другие ткани и органы, за счет усиления проницаемости эндотелия [17, 20, 21]. Поэтому белки цитоскелета, которые обеспечивают барьерную функцию, целостность эндотелиального монослоя и регулируют его проницаемость, часто становятся мишенями бактериальных факторов патогенности [27].

Цель данного исследования состояла в изучении влияния стрептококковой АД на структуру актинового цитоскелета эндотелиальных клеток вены пупочного канатика человека. Для этого проводили сравнение эффектов супернатанта разрушенных ультразвуком бактерий исходного штамма *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с инактивированным геном АД *S. pyogenes* M49-16 delArcA.

Материалы и методы

Все работы с клетками человека соответствовали Хельсинкской декларации. Эндотелиальные клетки были получены из вены пупочного канатика человека по адаптированной стандартной методике [5]. Пуповины получали из перинатального центра ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова». Все пациенты подписывали информированное согласие. С момента родов до выделения клеток проходило не более 48 часов. Вены канюлировали и инкубировали с коллагеназой второго типа («Worthington»), 140 ЕД/мл в DMEM (ООО «БиолоТ»), в течение 10 минут на водяной бане при 37 °С. Полученную суспензию клеток осаждали центрифугированием при 300 g в течение 5 мин, далее клетки ресуспендировали в полной культуральной среде ECM («ScienCell») и высевали в культуральные флаконы («Sarstedt»), покрытые 0,2% раствором желатина («Sigma»). Пересев производили дважды в неделю. Дезинтеграцию монослоя вызывали инкубацией в растворе трипсина-версена («Sigma Aldrich») при 37 °С. В экспериментах использовали клетки 3–5 пассажа.

В работе использовали штаммы *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с инактивированным геном АД ArcA, утратившего способность синтезировать АД, *S. pyogenes* M49-16 delArcA, полученные и любезно предоставленные зав. отд. молекулярной микробиологии, проф. А.Н. Суворовым (ФГБНУ «ИЭМ», отдел молекулярной микробиологии, Санкт-Петербург). Супернатанты разрушенных ультразвуком стрептокок-

ков (CPC) оригинального штамма (*S. pyogenes* M49-16) и его изогенного мутанта с инактивированным геном АД (*S. pyogenes* M49-16 delArcA), содержащие биологически активные внутриклеточные компоненты, были приготовлены как описано нами ранее [2]. CPC вносили в культуры в нетоксичном для клеток диапазоне концентраций.

Для анализа структуры актинового цитоскелета суспензию эндотелиальных клеток вносили в 12-луночные плоскодонные планшеты («Nunc») в концентрации 100 тысяч клеток в 500 мкл питательной среды (ECM), на дно которых предварительно были помещены обезжиренные покровные стекла («Thermo Scientific»). Одновременно в лунки вносили исследуемые вещества и инкубировали 72 часа при температуре 37 °С, во влажной атмосфере с 5% CO₂. После чего клетки фиксировали в 50 мкл 4% формальдегида («Sigma») 10 мин при 25 °С, пермеабелизовали 0,01% раствором Тритона X-100 («Sigma») 5 мин при 25 °С и окрашивали 0,22 мкМ раствора родамин-фаллоидина («Invitrogen») на 3,3% метаноле (АО «Вектон», Санкт-Петербург). Окрашивание ядер производили красителем DAPI («Invitrogen»). Стекла инкубировали в термостате 10 мин при температуре 37 °С, высушивали и наносили среду для заключения («Invitrogen»). Препараты анализировали с помощью микроскопа AxioObserver. D1 («Zeiss») и программы «AxioVisionRel 4.7» («Zeiss»).

Результаты и обсуждение

Анализ микрофотографий показал, что эндотелиальные клетки, культивируемые в стандартных условиях (контроль), имели овоидную или полигональную форму и, характерную для данного типа клеток, пространственную организацию актиновых микрофиламентов (рис. 1, а). Все клетки обладали хорошо организованными ламеллиподиями с выраженными стресс-фибриллами, формировали микроспайки и филоподии.

Культивирование в присутствии CPC *S. pyogenes* M49-16 delArcA с инактивированным геном АД (рис. 1, в) не изменяло структурную организацию актинового цитоскелета и морфологию клеток. Однако в присутствии CPC *S. pyogenes* M49-16 (рис. 1, б) форма клеток становилась фибробластоподобной, происходило уменьшение количества актиновых фибрилл, что указывало на деполимеризации актина. В клетках формировались единичные, утолщенные стресс-фибриллы, отчетливо выявлялись отдельные конгломераты актина. Происходило перераспределение актина от центра к периферии клетки. Значительно снижалось количество клеток с ламеллиподиями, ведущий край ламеллы был плохо сформирован, площадь ламеллиподий сокращалась. Интенсивность флуоресценции окрашенных клеток была ниже по сравнению с тем же показателем в контроле.

Полученные результаты подтверждают данные исследований на эндотелиальных клетках

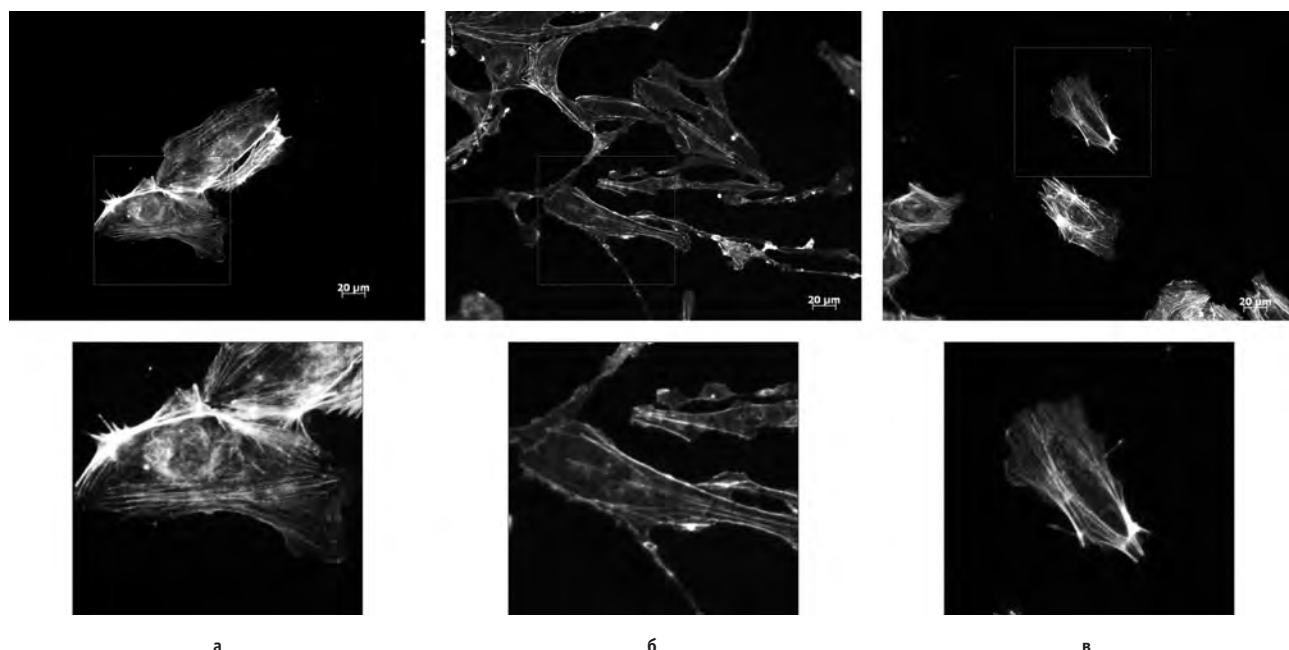


Рис. 1. Влияние супернатантов разрушенных ультразвуком стрептококков на морфологию и структуру актинового цитоскелета эндотелиальных клеток вены пупочного канатика человека HUVEC

Окраска: DAPI (ДНК) и родамин-фаллоидин (F-актин); увеличение $\times 200$. а — культуральная среда (контроль); б — супернатанты разрушенных ультразвуком стрептококков *S. pyogenes* M49-16; в — супернатанты разрушенных ультразвуком стрептококков *S. pyogenes* M49-16delArcA.

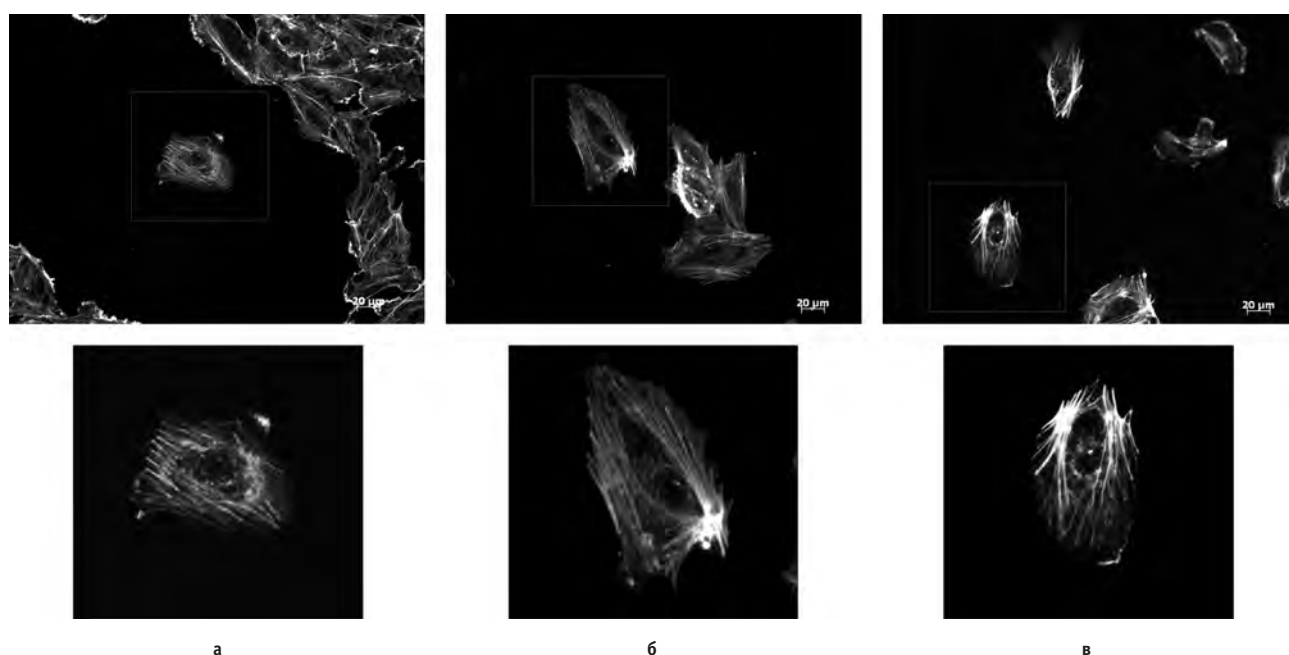


Рис. 2. Влияние избытка аргинина на морфологию и структуру актинового цитоскелета HUVEC

Окраска: DAPI (ДНК) и родамин-фаллоидин (F-актин); увеличение $\times 200$. а — культуральная среда с добавлением 2 мМ аргинина; б — супернатанты разрушенных ультразвуком стрептококков *S. pyogenes* M49-16 с добавлением 2 мМ аргинина; в — супернатанты разрушенных ультразвуком стрептококков *S. pyogenes* M49-16delArcA с добавлением 2 мМ аргинина.

микрососудов человека НМЕС, в которых было установлено, что подавление направленной миграции tip-cells (специфических миграторных эндотелиальных клеток) в присутствии АД, выделенной из *Mycoplasma* spp., обусловлено изменением структуры и распределения F-актина [30].

Актин является основным компонентом цитоскелета, с помощью которого осуществляется функциональная активность клеток. Актиновые филаменты контролируют форму, полярность, адгезию к субстрату, миграцию и пролиферацию клеток [27]. В серии экспериментов на клетках глиобластомы человека и глиальных клетках кры-

сы была показана взаимосвязь между организацией актинового цитоскелета и биодоступностью аргинина. Было установлено, что в условиях дефицита аргинина клетки приобретали вытянутую форму, нарушалась структура ламеллиподий движущего края, снижалось количество актиновых стресс-фибрилл и кортикального актина в сравнении с контрольными клетками. Описанные эффекты носили обратимый характер, так как добавление аргинина приводило к быстрому восстановлению морфологии и структуры цитоскелета [24].

Для проверки предположения о зависимости обнаруженных изменений структуры актинового цитоскелета эндотелиальных клеток от дефицита аргинина в данной работе в культуральную среду одновременно с СРС вносили аргинин в концентрации 2 мМ. При добавлении экзогенного аргинина к клеткам, культивируемым в стандартных условиях (рис. 2, а), а также СРС *S. pyogenes* M49-16delArcA (рис. 2, в) изменений структуры актинового цитоскелета не было выявлено. В том случае, когда аргинин вносили к клеткам, которые культивировали в присутствии СРС исходного штамма *S. pyogenes* M49-16 (рис. 2, б), происходило полное восстановление микроархитектоники актинового цитоскелета, и клетки приобретали такой же фенотип, как в контроле.

Аргинин является единственным субстратом eNOS — фермента, ответственного за синтез NO в клетках сосудистого эндотелия. NO играет важную роль в регуляции сосудистого тонуса, процессов воспаления, коагуляции и ангиогенеза [4, 7, 8, 16, 25]. Однако данные о влиянии NO на организацию белков цитоскелета эндотелиальных клеток в литературе отсутствуют. Показано, что в условиях дефицита аргинина eNOS переносит свободные электроны на кислород, что приводит к генерации активных форм кислорода [18, 30]. Можно предположить, что дефицит аргинина может приводить к дезорганизации актинового цитоскелета опосредованно, через продукцию eNOS активных форм кислорода [9, 29]. С другой стороны, установлено, что eNOS имеет очень низкую

аффинность к субстрату (2–3 мкМ) при концентрации аргинина в клетках 840 мкМ, чем ставится под сомнение роль дефицита аминокислоты в дисфункции фермента [8].

Метаболитами аргинина в эндотелиальных клетках также являются полиамины — спермин и спермидин. Показано, что снижение уровня синтеза полиаминов приводит к нарушению формирования ламеллиподий и стресс-волокон в мигрирующих клетках [19].

На культуре клеток фибробластов мыши было установлено, что посттрансляционное аргинилирование актина является одним из механизмов регуляции миграции клеток, а также обеспечивает сохранение их нормальной морфологии [13]. Отсутствие N-концевого аргинина вызывает нарушение полимеризации актина, индуцирует агрегацию актиновых нитей и перераспределение β -актина. Это приводит к коллапсу ламеллы ведущего края, дефектам актиновой сети и накоплению агрегатов актина в цитоплазме [12, 26]. Несмотря на ключевую роль аргинина и его метаболитов в регуляции функциональной активности эндотелия сосудов, взаимосвязь метаболизма этой аминокислоты со структурой белков цитоскелета эндотелиальных клеток остается слабо изученной [8, 14].

Сосудистый эндотелий регулирует поступление жидкости, газов, биологически активных субстанций и клеточных элементов из кровеносного русла в ткани. Нарушение проницаемости эндотелия является одним из ведущих патогенетических факторов при разных патологических состояниях, в том числе, инфекционной природы [22]. Проведенные исследования позволяют предположить, что стрептококковая аргининдеиминаза может быть одним из факторов, повреждающих эндотелиальный барьер за счет нарушения структуры актинового цитоскелета, что позволяет рассматривать данный фермент в качестве одного из факторов микробной патогенности.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-00150.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маммедова Дж.Т., Старикова Э.А., Бурова Л.А., Малашичева А.Б., Семёнова Д.С., Фрейдлин И.С. Влияние аргининдеиминазы *S. pyogenes* на пролиферативную и миграционную активность эндотелиальных клеток вены пупочного канатика человека // Цитокины и воспаление. 2017. Т. 16. № 3. С. 48–51. Mammedova J.T., Starikova E.A., Burova L.A., Malashicheva A.B., Semenova D.S., Freidlin I.S. [The effect of arginine deiminase from *S. pyogenes* on the proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells] // Cytokines and Inflammation (St. Petersburg). 2017. Vol. 16. № 3. P. 48–51. Russian.
2. Старикова Э.А., Карасева А.Б., Бурова Л.А., Суворов А.Н., Соколов А.В., Васильев В.Б., Фрейдлин И.С. Роль аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* M49-16 в ингибции пролиферации эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 // Мед. иммунол. 2016. Т. 18. № 6. С. 555–562. Starikova E.A., Karaseva A.B., Burova L.A., Suvorov A.N., Sokolov A.V., Vasilyev V.B., Freidlin I.S. [A role of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* m49-16 in promoting infection and inhibition of line EA.hy926 endothelial cell proliferation] // Med. Immunol. 2016. Vol. 18. № 6. P. 555–562. Russian.
3. Старикова Э.А., Фрейдлин И.С., Маммедова Дж.Т., Бурова Л.А., Соколов А.В., Васильев В.Б. Влияние аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* на миграционную активность и структуру цитоскелета эндотелиальных клеток человека // Мед. иммунол. 2017. Т. 19. № 5. С. 521–528. Starikova E.A., Freidlin I.S., Mammedova J.T., Burova L.A., Sokolov A.V., Vasilyev V.B. [Effect of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* on cytoskeleton structure and migration activity of human endothelial cells] // Med. Immunol. 2017. Vol. 19. № 5. P. 521–528. Russian.
4. Albrecht E.W., Stegeman C.A., Heeringa P., Henning R.H., van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase // J. Pathol. 2003. Vol. 199. № 1. P. 8–17.

5. Baudin B., Bruneel A., Bosselut N., Vaubourdel M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells // Nat. Protoc. 2007. Vol. 2. № 3. P. 481–485.
6. Beloussow K., Wang L., Wu J., Ann D., Shen W.C. Recombinant arginine deiminase as a potential antiangiogenic agent // Cancer. Lett. 2002. Vol. 183. № 2. P. 155–162.
7. Bierhansl L., Conradi L.C., Treps L., Dewerchin M., Carmeliet P. Central role of metabolism in endothelial cell function and vascular disease // Physiology (Bethesda). 2017. Vol. 32. № 2. P. 126–140.
8. Chen F., Lucas R., Fulton D. The subcellular compartmentalization of arginine metabolizing enzymes and their role in endothelial dysfunction // Front. Immunol. 2013. Vol. 4. P. 184.
9. Choy J.S., Lu X., Yang J., Zhang Z.D., Kassab G.S. Endothelial actin depolymerization mediates NADPH oxidase-superoxide production during flow reversal // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2014. Vol. 306. № 1. P. H69–77.
10. Cusumano Z.T., Caparon M. Citrulline protects *Streptococcus pyogenes* from acid stress using the arginine deiminase pathway and the F1Fo-ATPase // J. Bacteriol. 2015. Vol. 197. № 7. P. 1288–1296.
11. Gallego P., Planell R., Benach J., Querol E., Perez-Pons J.A., Reverter D. Structural characterization of the enzymes composing the arginine deiminase pathway in *Mycoplasma penetrans* // PLoS One. 2012. Vol. 7. № 10. P. e47886.
12. Karakozova M., Kozak M., Wong C.C., Bailey A.O., Yates J.R. 3rd, Mogilner A., Zebroski H., Kashina A. Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility // Science. 2006. Vol. 313. № 5784. P. 192–196.
13. Kashina A. Protein arginylation, a global biological regulator that targets actin cytoskeleton and the muscle // Anat. Rec. (Hoboken). 2014. Vol. 297. № 9. P. 1630–1636.
14. Lei X., Feng C., Liu C., Wu G., Meininger C.J., Wang F., Li D., Wang J. Regulation of protein expression by L-arginine in endothelial cells // Front. Biosci. (Schol. Ed.). 2011. Vol. 3. P. 655–661.
15. Lin S.E., Wu F.L., Wei M.F., Shen L.J. Depletion of arginine by recombinant arginine deiminase induces nNOS-activated neurotoxicity in neuroblastoma cells // Biomed. Res. Int. 2014. Vol. 2014. P. 589424.
16. Lu A., Wang L., Qian L. The role of eNOS in the migration and proliferation of bone-marrow derived endothelial progenitor cells and in vitro angiogenesis // Cell Biol. Int. 2015. Vol. 39. № 4. P. 484–490.
17. Lubkin A., Torres V.J. Bacteria and endothelial cells: a toxic relationship // Curr. Opin. Microbiol. 2017. Vol. 35. P. 58–63.
18. Morris C.R., Hamilton-Reeves J., Martindale R.G., Sarav M., Ochoa Gautier J.B. Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine // Nutr. Clin. Pract. 2017. Vol. 32 (1 suppl.). P. 30S–47S.
19. Morrison R.F., Seidel E.R. Vascular endothelial cell proliferation: regulation of cellular polyamines // Cardiovasc. Res. 1995. Vol. 29. № 6. P. 841–847.
20. Nerlich A., Rohde M., Talay S.R., Genth H., Just I., Chhatwal G.S. Invasion of endothelial cells by tissue-invasive M3 type group A streptococci requires Src kinase and activation of Rac1 by a phosphatidylinositol 3-kinase-independent mechanism // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284. № 30. P. 20319–20328.
21. Ochel A., Rohde M., Chhatwal G.S., Talay S.R. The M1 protein of *Streptococcus pyogenes* triggers an innate uptake mechanism into polarized human endothelial cells // J. Innate Immun. 2014. Vol. 6. № 5. P. 585–596.
22. Opal S.M., van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock // J. Intern. Med. 2015. Vol. 277. № 3. P. 277–293.
23. Park I.S., Kang S.W., Shin Y.J., Chae K.Y., Park M.O., Kim M.Y., Wheatley D.N., Min B.H. Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth // Br. J. Cancer. 2003. Vol. 89. № 5. P. 907–914.
24. Pavlyk I., Rzhetsky Y., Jagielski A.K., Drozak J., Wasik A., Pereverzieva G., Olchowik M., Kunz-Schugart L.A., Stasyk O., Redowicz M.J. Arginine deprivation affects glioblastoma cell adhesion, invasiveness and actin cytoskeleton organization by impairment of β -actin arginylation // Amino Acids. 2015. Vol. 47. № 1. P. 199–212.
25. Rafii S., Butler J.M., Ding B.S. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells // Nature. 2016. Vol. 529. № 7586. P. 316–325.
26. Saha S., Mundia M.M., Zhang F., Demers R.W., Korobova F., Svitkina T., Perieteanu A.A., Dawson J.F., Kashina A. Arginylation regulates intracellular actin polymer level by modulating actin properties and binding of capping and severing proteins // Mol. Biol. Cell. 2010. Vol. 21. № 8. P. 1350–1361.
27. Schnittler H., Taha M., Schnittler M.O., Taha A.A., Lindemann N., Seebach J. Actin filament dynamics and endothelial cell junctions: the Ying and Yang between stabilization and motion // Cell Tissue Res. 2014. Vol. 355. № 3. P. 529–543.
28. Shen L.J., Lin W.C., Beloussow K., Hosoya K., Terasaki T., Ann D.K., Shen W.C. Recombinant arginine deiminase as a differential modulator of inducible (iNOS) and endothelial (eNOS) nitric oxide synthetase activity in cultured endothelial cells // Biochem. Pharmacol. 2003. Vol. 66. № 10. P. 1945–1952.
29. Shi D., Li X., Chen H., Che N., Zhou S., Lu Z., Shi S., Sun L. High level of reactive oxygen species impaired mesenchymal stem cell migration via over polymerization of F-actin cytoskeleton in systemic lupus erythematosus // Pathol. Biol. (Paris). 2014. Vol. 62. № 6. P. 382–390.
30. Zhuo W., Song X., Zhou H., Luo Y. Arginine deiminase modulates endothelial tip cells via excessive synthesis of reactive oxygen species // Biochem. Soc. Trans. 2011. Vol. 39. № 5. P. 143–147.

Bacterial arginine deiminase disrupts the endothelial cells actin cytoskeleton

J.T. Mammedova^{1,2}, E.A. Starikova¹, L.A. Burova¹,
A.B. Malashicheva^{3,4}, D.S. Semenova^{3,4}, I.S. Freidlin^{1,5}

¹Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg;

²St. Petersburg State Technological University (Technical University), St. Petersburg;

³FSBSI "V.A. Almazov National Medical Research Centre", St. Petersburg;

⁴St. Petersburg State University;

⁵Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg

Arginine deiminase is an enzyme that hydrolyses arginine irreversibly and causes the amino acid deficiency in host-cells microenvironment. Decreasing bioavailability of arginine during bacterial infection contributes to endothelial dysfunction. We examined the effect of *S. pyogenes* M49-16 and its isogenic mutant with an inactivated arginine deiminase gene *arcA* (*S. pyogenes* M49-16delArcA) on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) actin cytoskeleton. Actin was stained using rhodamine-phalloidin fluorescent dye. It was shown that incubation with the supernatant of destroyed *S. pyogenes* M49-16ArcA did not change cell morphology and actin cytoskeleton structure. However, while culturing cells with the supernatant of destroyed *S. pyogenes* M49-16 their morphology varied, leading edge formation disrupted, and amount of stress-fibers decreased. Addition of excess arginine to the culture medium led to reconstruction in cell morphology and actin cytoskeleton structure. These findings suggest that arginine deiminase is likely to be one of the factors that cause endothelial dysfunction through reshaping the micro architectonics of actin cytoskeleton. (Cytokines and Inflammation. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 75–79.)

Key words: *S. pyogenes*, arginine deiminase, HUVEC, actin cytoskeleton.

Получение и исследование физико-химических и биологических свойств интраназальных форм аналога интерферона гамма человека

*О.С. Иванова², Г.М. Левагина², А.В. Батенева²,
С.Г. Гамалей², М.П. Богрянцева¹, Е.Д. Даниленко²*

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область;

²Институт медицинской биотехнологии — филиал ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск Новосибирской области

Получены экспериментальные образцы жидкой и лиофильно высушенной интраназальных форм аналога интерферона гамма (IFN γ) человека Дельтаферона на основе субстанции и Дельтаферона в составе молекулярной конструкции. Выбран состав вспомогательных компонентов, показана сохранность структуры и противовирусной активности белка при хранении в течение года при +6 °С. Продemonстрировано повышение протеолитической устойчивости интраназальной формы Дельтаферона в молекулярной конструкции, по меньшей мере, в 10 раз по сравнению с исходным белком. Показано, что интраназальная форма Дельтаферона в дозе 5×10^4 МЕ обладала способностью повышать уровень IFN γ в ткани носоглотки, Дельтаферона в составе молекулярной конструкции (10^3 – 10^5 МЕ/мышь) — титры интерферона в тканях дыхательных путей и крови мышей, что может быть важно для реализации противовирусной активности Дельтаферона. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 80–84.)

Ключевые слова: аналог интерферона гамма человека, интраназальная форма, температурная и ферментативная устойчивость, противовирусная активность, иммуномодулирующие свойства.

Как известно, многие вирусы, в частности, вирусы гриппа, способны подавлять в организме синтез интерферона (IFN), что может приводить к быстрому развитию заболевания и даже летальному исходу [3]. Применение препаратов интерферонов обеспечивает запуск механизмов противовирусной защиты и препятствует размножению вируса. Так, показано, что интерферон гамма (IFN γ) обладает способностью подавлять проникновение вируса в клетку, ингибировать синтез мРНК и трансляцию вирусных белков, блокировать процессы сборки вирусных частиц и их вы-

ход из инфицированной клетки [7]. Помимо этого, IFN γ отличается мощным иммуностимулирующим действием: повышает активность цитотоксических Т-лимфоцитов, естественных киллеров и макрофагов, усиливает антителозависимую клеточную цитотоксичность гранулоцитов, повышает фагоцитарную активность тканевых макрофагов и моноцитов крови [4]. В связи с этим, использование препаратов IFN γ наряду с химиопрепаратами и иммуномодуляторами в борьбе с вирусной инфекцией представляется весьма перспективным.

Надо сказать, общим недостатком препаратов IFN γ является протеолитическая нестабильность.

Левагина Галина Михайловна, e-mail: levagina_gm@vector.nsc.ru

Белок легко подвергается деградации в крови, что приводит к снижению его противовирусной активности. Для решения этой проблемы в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора была разработана технология получения Дельтаферона, аналога рекомбинантного IFN γ человека, имеющего делецию 10 аминокислот на С-конце молекулы и аминокислотные замены в сайтах протеолиза (положения 129, 130 и 131), что обеспечило его более длительную циркуляцию в организме [8].

Другим методическим приемом, использованным для повышения стабильности белка, являлось включение Дельтаферона в наноразмерные средства доставки: двухслойные молекулярные конструкции (МК), содержащие в центральной части нуклеотидный материал (дрожжевые двухспиральные РНК), покрытый оболочкой из спермидин-полиглюкина [5].

Как известно, основным путем введения существующих в настоящее время лекарственных препаратов IFN γ является системный путь введения. Учитывая, что первым местом контакта вируса гриппа с организмом хозяина и главным объектом инфекции является эпителий слизистой оболочки дыхательных путей, можно предположить, что Дельтаферон может быть эффективен и при интраназальном применении.

В связи с этим, целью нашего исследования являлось создание интраназальных форм Дельтаферона разного состава, исследование их физико-химических и биологических свойств.

Материалы и методы

В ходе работы были использованы препарат Дельтаферон — субстанция, со специфической противовирусной активностью $3,8 \times 10^5$ МЕ/мг, производства ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (г. Бердск Новосибирской обл.); молекулярная конструкция, содержащая Дельтаферон (МК-Д), полученная в соответствии с [5]; поливинилпирролидон (40 000 Да), «Sigma»; Трилон Б, «Sigma».

Растворы интраназальных форм Дельтаферона получали путем смешения вспомогательных компонентов с субстанцией Дельтаферона или МК-Д из расчета 50 000 МЕ или 100 000 МЕ белка в 1 мл раствора препарата. Лиофилизацию препаратов осуществляли в камере лиофильной сушки «FreeZone» в автоматическом режиме с опцией пневматической укупорки с соблюдением правил асептики.

Определение концентрации белка проводили по методу Лоури [13]. Стабильность Дельтаферона в составе интраназальных форм при хранении в различных температурных режимах, а также ферментативную устойчивость белка после инкубации с трипсином оценивали электрофорезом в 12 % ПААГ в денатурирующих условиях, как описано в [12].

Специфическую противовирусную активность препаратов Дельтаферона определяли микрометодом по подавлению цитопатического действия тест-вируса в культуре клеток L-68.

В качестве тест-вируса использовали вирус энцефаломиокардита (ЕМС), штамм Колумбия [14].

Изучение иммуномодулирующих свойств препаратов проводили на самцах белых аутбредных мышей ICR массой 19–23 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. В первой экспериментальной серии мышам опытной группы вводили однократно интраназальную форму Дельтаферона в дозе 5×10^4 МЕ на мышь, контрольным животным — физиологический раствор. Через 3 и 24 ч после введения препаратов мышам подвергали эвтаназии двуокисью углерода, забирали на анализ образцы сыворотки крови, ткани носоглотки и легких. Концентрацию IFN γ определяли в 20 % гомогенатах тканей дыхательных путей и сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с помощью набора реактивов «Mouse IFN γ Immunoassay» («R&D Systems»).

Во втором эксперименте мышам опытных групп вводили интраназальную форму Дельтаферона в составе молекулярной конструкции в дозе 10^3 МЕ или 10^5 МЕ/мышь, животным контрольной группы — физиологический раствор. Титры интерферона в сыворотке крови, супернатантах гомогенатов тканей носоглотки и легких мышей, взятых через 3 ч после введения, определяли на культуре клеток L-68, инфицированной вирусом ЕМС [14]. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Statgraphics», V. 5.0 («Statistical Graphics Corp.», USA) с использованием t-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (p) принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

В современной клинической практике широко используются разные виды неинъекционных форм интерферонов (капли, мази, гели, ингаляционные и суппозиторные формы), но это, как правило, препараты интерферона альфа [9]. Сведений о препаратах IFN γ для непарентерального применения в доступной литературе немного [11].

Надо сказать, что подбор ингредиентов при создании интраназальных форм осуществляется, как правило, с сохранением комбинации трех различных по механизму действия компонентов: буфер, хелатообразователь, стабилизатор [2]. На основании анализа литературных данных для интраназальной формы Дельтаферона нами были выбраны следующие вспомогательные компоненты [1]:

- стабилизатор поливинилпирролидон (40 000 Да) — биологически совместимый полимер, улучшает растворимость лекарственных веществ, пролонгирует их действие при высвобождении из лекарственной формы [10];
- хелатообразователь трилон Б — антиоксидант, связывает следовые количества ионов двухвалентных металлов, в присутствии которых ускоряются процессы окисления [6];

• фосфатно-солевая буферная смесь, pH 7,2, содержащая 0,9% NaCl, для предотвращения нарушения физиологического водно-солевого гомеостаза крови.

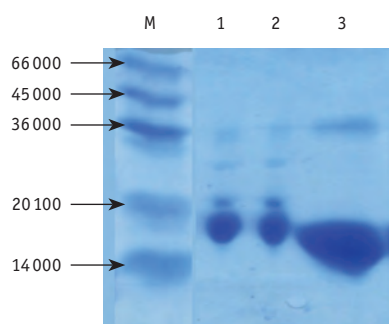


Рис. 1. Электрофореграмма образцов жидкой и лиофилизированной интраназальных форм Дельтаферона после хранения при температуре +6 °С в течение года

Электрофорез в 12% ПААГ, окрашивание Кумасси G-25. Дорожки: М — маркер молекулярных масс (14 000–66 000 Да); 1 — жидкая форма Дельтаферона; 2 — лиофилизированная форма Дельтаферона; 3 — Дельтаферон (свежеприготовленный образец).

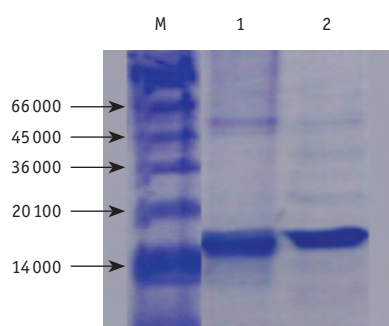


Рис. 2. Электрофореграмма интраназальной формы Дельтаферона в составе молекулярной конструкции после хранения при +6 °С в течение 6 месяцев

Электрофорез в 12% ПААГ, окрашивание Кумасси G-25. Дорожки: М — маркеры молекулярных масс (14 400–66 000 Да); 1 — Дельтаферон в составе молекулярной конструкции; 2 — Дельтаферон.

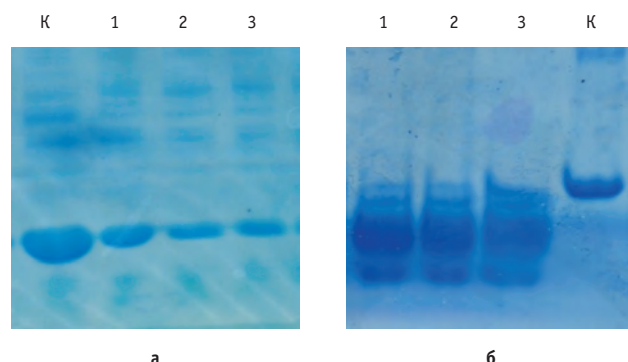


Рис. 3. Электрофоретический анализ протеолитической устойчивости Дельтаферона в составе молекулярной конструкции (а) в сравнении с Дельтафероном (б) после 5-минутной инкубации с трипсином

Концентрации трипсина: 1 — $2,6 \times 10^{-6}$ ед. акт.; 2 — $1,3 \times 10^{-6}$ ед. акт.; 3 — $2,6 \times 10^{-5}$ ед. акт.; К — без добавления трипсина (контроль). Электрофорез в 12% ПААГ, окрашивание Кумасси G-250.

В качестве активного компонента в состав препаратов вводили субстанцию Дельтаферона или МК-Д.

В первой серии экспериментов были получены два образца интраназальной формы Дельтаферона, в виде раствора либо лиофилизата для приготовления раствора для интраназального введения.

По уровню специфической противовирусной активности образцы существенно не отличались от активности исходного белка: показатели активности Дельтаферона в жидкой и лиофилизированной форме составляли $0,9 \times 10^5$ и $1,5 \times 10^5$ МЕ/мг, соответственно, субстанции — $3,8 \times 10^5$ МЕ/мг. Эти данные свидетельствуют о сохранности противовирусных свойств Дельтаферона в составе интраназальных форм в момент их получения.

Структурные характеристики белка и его противовирусные свойства не менялись и при хранении интраназальных форм в широком диапазоне температур (+20 °С, +6 °С, -4 °С) в течение года (рис. 1). При этом субстанция Дельтаферона была стабильна лишь в ограниченных условиях хранения (+6 °С) в течение 6 месяцев.

Важной характеристикой препарата является ферментативная устойчивость его активных компонентов, от уровня которой зависит длительность их циркуляции в биологически активной форме при введении в организм. Анализ показал, что оба образца интраназального Дельтаферона по уровню протеолитической устойчивости не отличались от Дельтаферона: все исследованные препараты подвергались деградации при инкубации с трипсином (0,0025 и 0,05 мкг фермента на 30 мкг белка, 5 минут).

Полученная во второй серии экспериментов интраназальная форма Дельтаферона в составе МК, как и исходный белок, сохраняла свои структурные характеристики в момент получения и после хранения в течение 6 месяцев при +6 °С (рис. 2).

При этом Дельтаферон в молекулярной конструкции был более устойчив к ферментативному воздействию. Если исходный белок подвергался деградации после пятиминутной инкубации с трипсином в количестве $2,6 \times 10^{-6}$ ед. акт., то структура Дельтаферона в составе конструкции оставалась неизменной и при 10-кратном увеличении концентрации фермента в инкубационной среде (рис. 3). Аналогичные закономерности наблюдались в ходе исследования протеолитической устойчивости образцов конструкции, хранившейся в течение 6 месяцев при +6 °С.

Противовирусная активность интраназальной формы Дельтаферона в составе МК после 20 месяцев хранения составляла $2,0 \times 10^6$ МЕ/мл и не отличалась от показателя активности свежеприготовленного препарата ($1,25 \times 10^6$ МЕ/мл). Таким

Таблица

Титры интерферона в сыворотке крови, супернатантах гомогенатов легких и носоглотки мышей, взятых через 3 часа после интраназального введения Дельтаферона в составе молекулярной конструкции

Группа	Титры интерферона		
	Сыворотка крови	Легкие	Носоглотка
Физиологический раствор	1:16	1:16	1:16
Интраназальная форма Дельтаферона, 10 ³ МЕ	1:179	1:307	1:410
Интраназальная форма Дельтаферона, 10 ⁵ МЕ	1:717	1:973	1:717
Интактные мыши	1:16		

Примечание. Количество животных в каждой группе — 5.

образом, включение Дельтаферона в состав МК способствовало повышению ферментативной стабильности его интраназальной формы.

Иммуномодулирующую активность интраназальных форм Дельтаферона оценивали на мышцах по влиянию на продукцию интерферона, как локальную, в тканях верхних дыхательных путей и легких, так и системную, о которой судили по уровню интерферона в сыворотке крови.

Было показано, что интраназальная форма Дельтаферона в дозе 5×10⁴ МЕ не оказывала влияния на содержание IFNγ в крови мышей и ткани легких через 3 и 24 ч после введения. Однако препарат вызывал достоверное повышение концентрации IFNγ в ткани носоглотки мышей (17,6±1,1 пг/г — в опыте, 12,7±1,7 пг/г — в контроле, на 39%) через 3 ч после введения, причем тенденция к сохранению повышенного уровня показателя наблюдалась и через сутки после введения.

Интраназальное введение мышам Дельтаферона в составе МК приводило к значительному повышению титров IFN в крови и тканях дыхательных путей по сравнению с контролем (таблица). Уровень IFN в крови мышей повышался через 3 ч после введения препарата в дозах 10³ МЕ и 10⁵ МЕ в 11 и 45 раз, соответственно. Титры IFN в легких после введения препарата в меньшей дозе

в этот же срок превышали контрольный уровень в 19 раз, в высокой — в 61 раз; в ткани носоглотки значения показателя увеличивались в 20 и 45 раз, соответственно.

Таким образом, исследование новых интраназальных форм аналога интерферона гамма человека Дельтаферона показало, что белок в составе жидкой и лиофилизированной лекарственных форм приобретал повышенную устойчивость к температурным воздействиям и стабильность при хранении, в составе молекулярной конструкции — ферментативную устойчивость. В экспериментах на мышцах подтверждена способность интраназальных форм Дельтаферона разного состава повышать уровень интерферона в тканях дыхательных путей, более выраженная в случае Дельтаферона в молекулярной конструкции, что может быть важно для реализации его противовирусной активности. Полученные данные представляют интерес с точки зрения разработки новых лечебно-профилактических средств на основе аналога природного интерферона гамма человека для комплексной терапии и профилактики вирусных инфекций.

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гапонюк П.Я., Маркова Е.А., Марков И.А. Патент RU № 2140285 С1. Противовирусное средство — капли в нос «ГРИППФЕРОН». Заявка 99100666/14 от 25.01.1999. Дата публикации 27.10.1999.
Gaponiuk P.Ia., Markova E.A., Markov I.A. Patent RU 2140285(C1) [Antiviral agent – nasal drops "GRIPPFERON"]. Application No. 99100666/14. Priority from 25.01.1999. Date of publ. 27.10.1999. Russian.

2. Гуревич К.Г. Разработка систем интраназальной доставки лекарственных средств // Качеств. клинич. практика. 2002. № 1. С. 2–5.
Gurevich K.G. [Development of intranasal drug delivery systems] // Kachestvennaja Klinicheskaia Praktika. 2002. № 1. P. 2–5. Russian.

3. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). Росс. акад. мед. наук. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. 368 с.
Ershov F.I., Kiselev O.I. [Interferons and their inductors (from molecules to drugs)]. Ross. Acad. Med. Sci. Moscow: GEOTAR-Media, 2005. 368 p. Russian.

4. Киселев О.И., Ершов Ф.И., Деева Э.Г. Интерферон-гамма: новый цитокин в клинической практике «Ингарон». Росс. акад. мед. наук, Ин-т гриппа РАМН, Ин-т эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи РАМН, 000 НПП «Фармаклон». М.–Санкт-Петербург: Димитрейд График Групп, 2007. 348 с.
Kiselev O.I., Ershov F.I., Deeva E.G. [Interferon-gamma: a new cytokine "Ingaron" in clinical practice. Ross. Acad. Med. Scie., Research Institute of Influenza RAMS, N.F. Gamaleia Institute of Epidemiology and Microbiology RAMS, "Farmaklon"]. Moscow–St. Petersburg: Dimitreyd Grafik Grupp, 2007. 348 p. Russian.

5. Масычева В.И., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М., Гамалей С.Г. Патент RU № 2386447 С1. Противоопухолевое средство на основе наночастиц, несущих рекомбинантный фактор некроза опухолей альфа. Заявка 2008140246/15 от 13.10.2008. Дата публикации 20.04.2010.
Masycheva V.I., Lebedev L.R., Danilenko E.D., Sysoeva G.M., Gamaley S.G. Patent RU № 2386447 C1. [Anticancer drug based on nanoparticles bearing recombinant human tumor necrosis factor alpha]. Application No. 2008140246/15. Priority from 13.10.2008. Date of publ. 20.04.2010. Russian.

6. Семкина О.А., Джавахян М.А., Левчук Т.А., Гагулашвили Л.И., Охотникова В.Ф. Вспомогательные вещества, используемые в технологии мягких лекарст-

- венных форм (мазей, гелей, линиментов, кремов) (Обзор) // Хим.-фармацевт. ж. 2005. Т. 39. № 9. С. 45–48.
- Semkina O.A., Dzhavakhyan M.A., Levchuk T.A., Gagulashvili L.I., Okhotnikova V.F. [Auxiliary substances used in technology of soft medicinal forms: ointments, gels, liniments, and creams (a review)] // Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal. 2005. Vol. 39. № 9. P. 45–48. Russian.
7. Сологуб Т.В., Эсауленко Е.В., Деева Э.Г., Йолла И. Гамма-интерферон: обоснование и перспективы применения в инфекционной практике // МЕДЛАЙН-ЭКСПРЕСС. 2006. № 2–3 (186). С. 21–23.
- Sologub T.V., Esaulenko Ye.V., Deeva E.G., Yolla I. [Interferon-gamma: rationale and prospects for use in infectious practice] // MEDLINE-EXPRESS. 2006. № 2–3 (186). P. 21–23. Russian.
8. Татьков С.И., Смирнова О.Ю., Цивковский Р.Ю., Кочнева Г.В., Кузьмичева Г.А., Христофоров В.С., Косарев И.С., Черных Е.Р., Хонина Н.А., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д., Факина В.А., Пустошилова Н.М., Масычева В.И., Сандахчиев Л.С. Мутантный γ -интерферон человека с укороченным С-концом и его свойства // Доклады академии наук / Росс. Акад. Наук. 2000. Т. 372. № 6. С. 833–835.
- Tat'kov S.I., Smirnova O.Yu., Tsivkovskii R.Yu., Kochneva G.V., Kuz'micheva G.A., Khristoforov V.S., Kosarev I.S., Chernykh E.R., Khonina N.A., Lebedev L.R., Danilenko E.D., Fadina V.A., Pustoshilova N.M., Masycheva V.I., Sandakhchiev L.S. [Mutant human gamma-interferon with a truncated C-terminus and its properties] // Doklady Akademii Nauk. 2000. Vol. 372. № 6. P. 833–835. Russian.
9. Шумилов В.И., Шевцов В.А., Лобов С.П. Грипп и ОРВИ: неспецифическая профилактика с использованием генноинженерного α -2-интерферона и его новых форм // Лечащий врач. 2000. № 9. С. 60–61.
- Shumilov V.I., Shevtsov V.A., Lobov S.P. [Influenza and upper respiratory tract infections: non-specific prophylaxis with genetically engineered interferon- α -2 and its new forms] // Lechashchiy Vrach. 2000. № 9. P. 60–61. Russian.
10. URL: <http://www.chemitradition.ru>
11. URL: <http://www.ingaron.ru>
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. № 5259. P. 680–685.
13. Peterson G.L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall // Anal. Biochem. 1979. Vol. 100. № 2. P. 201–220.
14. Yousefi S., Escobar M.R., Gouldin C.W. A practical cytopathic effect/dye-uptake interferon assay for routine use in the clinical laboratory // Am. J. Clin. Pathol. 1985. Vol. 83. № 6. P. 735–740.

Production and study on the physico-chemical and biological properties of human interferon gamma analogue intranasal forms

O.S. Ivanova², G.M. Levagina², A.V. Bateneva²,
S.G. Gamaley², M.P. Bogryantseva¹, E.D. Danilenko²

¹ FBRI «State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»,
Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region;

² Institute of Medical Biotechnology, the Branch of the FBRI «State Research Center
of Virology and Biotechnology «Vector», Berdsk, Novosibirsk Region

In this study, we obtained experimental samples of liquid and freeze-dried intranasal forms of human interferon gamma (IFN γ) analogue Deltaferon based on the substance and Deltaferon within the molecular construct. The composition of the auxiliary components was selected; the structure and antiviral activity of the protein was preserved after storage at +6 °C for a year. The proteolytic stability of the intranasal form of Deltaferon within the molecular construct was demonstrated to increase by at least 10 times as compared with initial protein. The intranasal form of Deltaferon was shown to be able to increase the level of IFN γ in the nasopharyngeal tissue when administered at a dose of 5×10^4 IU. The administration of the intranasal form of Deltaferon within the molecular construct (10^3 – 10^5 IU/mouse) caused increase of IFN titers in the tissues of the respiratory tract and blood of mice, which may be important for the realization of antiviral activity of Deltaferon. (Cytokines and Inflammation. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 80–84.)

Key words: human interferon gamma analogue, intranasal form, temperature and enzymatic resistance, antiviral activity, immunomodulating properties.

Цитокиновая сеть синовиальной жидкости и ее связь с активностью ревматоидного артрита

Л.А. Мороз¹, Т.М. Талако², М.П. Потаннев^{1,3,4}, Н.Ф. Сорока⁴

¹Республиканский научно-практический центр трансфузиологии
и медицинских биотехнологий, г. Минск, Республика Беларусь;

²Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск, Республика Беларусь;

³Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь;

⁴Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

Целью исследования было определение значения и взаимосвязи локально продуцируемых цитокинов синовиальной жидкости (СЖ) пораженного коленного сустава с другими значимыми биомаркерами локального и системного воспалительного процесса у 84 пациентов с ревматоидным артритом (РА). Результаты исследований было установлено, что с показателем активности заболевания DAS28 прямую корреляционную связь проявляли показатели скорости оседания эритроцитов (СОЭ), общего IgA, обратную — уровень гемоглобина в периферической крови (ПК); а также уровни IL-1 β , IL-8 в СЖ пораженного коленного сустава пациентов с РА. Проанализирована взаимосвязь наиболее значимых цитокинов СЖ с другими биомаркерами СЖ и ПК у пациентов с РА. Установлено, что цитокины воспаления IL-1 β , TNF α , IL-17A, а также IL-8 в СЖ проявляли значимую прямую корреляционную взаимосвязь с уровнями противовоспалительных цитокинов IL-10 в СЖ и TGF β 1, IL-10 (для IL-1 β , TNF α) и белков ревматоидного фактора (РФ), циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и CRP (для IL-17A) — в ПК пациентов с РА. Сделан вывод о том, что сеть цитокинов, включающая IL-1 β , TNF α , IL-17A и IL-8, ассоциирована с СЖ пораженных суставов. С ней ассоциирована другая сеть цитокинов, включающая TGF β 1 и IL-10, и связанных с воспалением белков РФ, ЦИК и CRP в ПК пациентов с РА. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 85–90.)

Ключевые слова: ревматоидный артрит, цитокины, синовиальная жидкость, периферическая кровь.

Ревматоидный артрит (РА) является аутоиммунным системным воспалительным заболеванием соединительной ткани, характеризующимся развитием хронического эрозивного артрита (синовита), прогрессирующим снижением подвижности суставов и системным воспалительным поражением внутренних органов, что приводит к значительному снижению качества жизни и инвалидизации пациентов [1, 11]. Внесуставные проявления РА разнообразны и включают разви-

тие васкулита, поражение сердечно-сосудистой системы, легких, почек, глаз, нервной системы и считаются факторами риска летального исхода, в первую очередь, от кардиоваскулярной патологии [11]. Этиология РА остается неясной, однако в то же время известно, что это аутоиммунное заболевание может быть вызвано действием множественных индукторов при наличии генетической предрасположенности [1]. Биомаркеры локальной воспалительной реакции в суставе и системной реакции организма пациентов с РА широко изучаются [1, 6, 10, 11]. В процессе изучения

Потаннев Михаил Петрович, e-mail: mpotapnev@yandex.by

находятся диагностическая и прогностическая значимость этих биомаркеров, их взаимосвязь при активном воспалительном процессе при РА [7, 8, 10]. Ранее нами и другими авторами было показано, что профиль цитокинов отличается при их определении в периферической крови (ПК) и синовиальной жидкости (СЖ) [1, 4, 7, 14]. Цель настоящей работы — определение значения и взаимосвязи локально продуцируемых цитокинов СЖ с другими значимыми биомаркерами локального и системного воспалительного процесса у пациентов с РА.

Материалы и методы

В исследование были включены 84 пациента с диагнозом РА (согласно критериям Американской коллегии ревматологов, 1987 года), поступившие для лечения в ревматологическое отделение учреждения здравоохранения «9 городская клиническая больница» (в настоящее время — государственное учреждение «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»). Информированное согласие на участие в исследовании были получено от всех пациентов. Большинство из них составили женщины в возрасте старше 40 лет с высокой (индекс DAS28 >5,1) или умеренной (>3,2 DAS28 ≤5,1) степенью активности заболевания с разными рентгенологическими стадиями РА (от II до IV). В ПК большинства пациентов с РА был выявлен ревматоидный фактор (РФ) (табл. 1). Всем участникам исследования проводили стандартное клиничко-лабораторное обследование и последующее лечение согласно Протоколам лечения

ревматических заболеваний, утвержденным Приложением к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10.05.2012 г. № 522: метотрексат — 7,5–12 мг/нед внутрь, при его непереносимости — лефлуномид 20 мг/сут внутрь, фолиевая кислота — 3 мг/сут внутрь в дни приема метотрексата; нестероидные противовоспалительные лекарственные средства мелоксикам — 15 мг/сутки или нимесулид — 100–200 мг/сутки.

Лабораторное обследование пациентов включало определение уровней РФ и С-реактивного белка (CRP) методом латекс-агглютинации, скорости оседания эритроцитов (СОЭ) по методу Вестергрена, уровня гемоглобина (Hb) и количества лимфоцитов на автоматическом гематологическом анализаторе «Cell Dyne 3700», циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) методом микропреципитации с полиэтиленгликолем 4000. В рамках проводимого исследования, одобренного Этическим комитетом Белорусского государственного медицинского университета, отбирали образцы сыворотки ПК и СЖ, полученной при пункции коленного сустава, стабилизированные К-ЭДТА. Образцы центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 мин для осаждения клеток и детрита, супернатант замораживали при температуре ниже –20°С до тестирования в течение 2–3 месяцев.

Профиль цитокинов оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов АО «Вектор-Бест» (Интерлейкин-1 бета-ИФА-БЕСТ, Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ, Интерлейкин-4-ИФА-БЕСТ, Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ, Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ, Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ, альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ, гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ), «Invitrogen» (IL-17A, TGFbeta-1), «DRG Diagnostics» (антинуклеарные антитела (АНА)). Уровни общих иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA) определяли методом ИФА с использованием коммерческих наборов АО «Вектор-Бест».

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью прикладного пакета программы «Statistica 8.0», включая общепринятые методы параметрического и непараметрического анализа с расчетом кривых распределения вариационных рядов: средних значений, ошибки средних значений, корреляционный анализ Спирмена. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Индекс DAS28 является общепринятым интегральным показателем активности заболевания у пациентов с РА. Поэтому сначала мы оценили его взаимосвязь с изменением показателей ПК у пациентов с РА. Как видно из табл. 2, показатель DAS28 имеет прямую сильную корреляционную связь с величиной СОЭ (входящей в перечень параметров, определяющих уровень DAS28). Прямая корреляционная взаимосвязь слабой силы прослеживалась между показателем DAS28 и уровнем общего IgA, отражающего состояние системного воспаления синовиальных оболочек и играющего противовоспалительную функцию, и обратная — с содержанием Hb в периферической

Таблица 1

Общая характеристика пациентов с ревматоидным артритом, включенных в исследование

Параметр		Значения
Возраст, лет		42,4 ± 12,7
Половая структура, n (%):	мужчины	9 (10,7 %)
	женщины	75 (89,3 %)
Продолжительность заболевания, лет, Me [25–75 %]		6,6 ± 6,1; 5 [2 ÷ 10]
Активность заболевания по DAS28, Me [25–75 %]		5,99 [5,28 ÷ 6,66]
Распределение по степени активности заболевания:	высокая (DAS28 > 5,1)	64 (76,2 %)
	средняя (DAS28 = 3,2–5,1)	19 (22,6 %)
	низкая (DAS28 < 2,6)	1 (1,2 %)
Рентгенологическая стадия заболевания по Штейнброкеру, n (%)	1	6 (7,1 %)
	2	37 (44 %)
	3	18 (21,4 %)
	4	18 (21,4 %)
Позитивность пациентов по РФ, n (%)		66 (78,5 %)

Примечание. РФ — ревматоидный фактор.

Таблица 2

Связь активности заболевания с лабораторными показателями периферической крови пациентов с ревматоидным артритом

Сравниваемые показатели	Количество исследованных образцов	Коэффициент корреляции, R	Уровень значимости, p
DAS28 и СОЭ	71	0,6192	<0,0001*
DAS28 и IgA	58	0,2952	0,02*
DAS28 и Hb	69	-0,2862	0,017*
DAS28 и лимфоциты	70	-0,2291	0,056
DAS28 и IL-6	70	0,1731	0,15
DAS28 и ЦИК	66	0,1670	0,18

Примечание к табл. 2, 3. * — значимая связь показателей. СОЭ — скорость оседания эритроцитов, Hb — гемоглобин, ЦИК — циркулирующие иммунные комплексы.

Таблица 3

Связь активности заболевания с лабораторными показателями суставной жидкости пораженного коленного сустава пациентов с ревматоидным артритом

Сравниваемые показатели	Количество исследованных образцов	Коэффициент корреляции, R	Уровень значимости, p
DAS28 и IL-1β	15	0,7142	0,002*
DAS28 и IL-8	15	0,5928	0,019*
DAS28 и TNFα	15	0,3927	0,15
DAS28 и IL-17A	15	0,3764	0,16
DAS28 и IL-10	24	0,2877	0,17

крови как проявлением «анемии хронического заболевания» [3]. Согласно полученным данным, уровни исследованных цитокинов (IL-6, TGFβ1, IL-10, TNFα, IL-1β, IL-8, IL-4, IFNγ, IL-17A, IL-2), а также CRP и показателей гуморального иммунитета — ЦИК, АНА, РФ, IgG, IgM в ПК не имели значимой корреляционной связи с показателем DAS28 (данные не представлены).

Учитывая, что лабораторные показатели ПК не всегда могут прямо отражать патологический процесс, в том числе, процесс системного характера, мы проанализировали возможную взаимосвязь индекса DAS28 с биомаркерами СЖ пораженного коленного сустава пациентов [1, 3, 4, 14]. Как видно из табл. 3, перечень значимых показателей СЖ, проявлявших корреляционную взаимосвязь с величиной DAS28, значительно отличался от таковых в ПК. В первую линию показателей вошли цитокины воспаления. Уровень локального IL-1β в наибольшей степени, по нашим данным, был ассоциирован с уровнем DAS28 пациентов, что подтверждает его патогенетическое и диагностическое значение для РА, особенно в комплексе с другими цитокинами [1, 11, 14]. Уровень IL-8, участвующего в ангиогенезе и хемотаксисе нейтрофилов, проявлял статистически значимую прямую корреляционную взаимосвязь средней степени со значениями DAS28. Значительное повышение количества IL-8 в СЖ отмечали при высокой активности РА и другие авто-

ры [2]. Далее по значимости взаимосвязи с DAS28 выступали другие показатели острого воспаления (TNFα и IL-17A), а также иммуносупрессивный IL-10, хотя их взаимосвязь с показателем DAS28 не была статистически значимой. То есть не только цитокины «первой волны», определяющие острое воспаление (IL-1β, TNFα, IFNγ, IL-17A), но и цитокины «второй волны» (IL-8, IL-6, IL-10), снижающие остроту воспаления и определяющие его хроническое течение, определяют патогенез локальной воспалительной реакции [5].

Как известно, не отдельные цитокины, а их комбинации определяют реакции клеток и тканей. Поэтому мы оценили возможную взаимосвязь наиболее значимых для DAS28 цитокинов СЖ с другими исследованными иммунологическими показателями СЖ (табл. 4) и ПК (табл. 5). Как видно из табл. 4, уровень IL-1β в СЖ проявлял сильную прямую корреляционную взаимосвязь с локальным уровнем IL-10, обладающим иммунорегулирующей ограничительной ролью в отношении воспаления в суставе. Существует предположение о том, что повышенное содержание IL-10 в СЖ связано преимущественно с активностью Т-регуляторных клеток, уровень которых локально повышен, особенно при деструкции тканей суставов [6, 10]. IL-10 при этом проявляет хондропротективное действие [13].

В СЖ была выявлена сильная прямая корреляционная взаимосвязь содержания IL-1β с IL-8,

Таблица 4

Корреляционная взаимосвязь наиболее значимых биомаркеров синовиальной жидкости пораженного коленного сустава пациентов с ревматоидным артритом

Сравниваемые параметры синовиальной жидкости			Коэффициент корреляции, R	Уровень значимости, p
IL-1β	IL-10	n = 20	0,84	p < 0,001
	IL-8	n = 20	0,75	p < 0,001
	IFNγ	n = 19	0,58	p = 0,01
	TNFα	n = 18	0,57	p = 0,013
	ЦИК	n = 19	0,52	p = 0,024
	IgA	n = 20	0,44	p = 0,053
	IL-17	n = 18	0,44	p = 0,066
TNFα	IL-6	n = 19	0,41	p = 0,081
	IL-8	n = 18	0,66	p = 0,003
	IL-10	n = 21	0,57	p = 0,006
	IL-1β	n = 18	0,57	p = 0,013
IL-17A	IgG	n = 21	-0,5	p = 0,021
	CRP	n = 16	0,55	p = 0,027
	IL-10	n = 21	0,53	p = 0,014
IL-8	IL-1β	n = 20	0,75	p < 0,001
	TNFα	n = 18	0,66	p = 0,003
	IL-10	n = 20	0,64	p = 0,003
IL-10	IL-1β	n = 20	0,84	p < 0,001
	IL-8	n = 20	0,64	p = 0,003
	TNFα	n = 21	0,57	p = 0,006
	IL-17	n = 21	0,53	p = 0,014
	IL-6	n = 30	0,48	p = 0,007
	ЦИК	n = 30	0,38	p = 0,037

Примечание. ЦИК — циркулирующие иммунные комплексы, CRP — С-реактивный белок.

обладающим множеством биологических эффектов в отношении тканей пораженных суставов и, по данным ряда авторов, повышенным в наибольшей степени по сравнению с другими цитокинами в СЖ при активном РА [2]. Вполне логично смотрится выявленная прямая корреляционная связь количества IL-1β с количеством IFNγ и TNFα в СЖ, как цитокинов первой волны, обладающих различиями в клетках-продуцентах и биологической активности [5, 11]. При этом сочетание IL-1β и TNFα обладает мощным артропатогенным действием при РА [15]. Остается пока неясной взаимосвязь повышенного содержания IL-1β с локальным содержанием ЦИК, общего IgA и IL-17A, имеющих различное тканевое происхождение.

Содержание другого цитокина воспаления — TNFα — в СЖ проявляло прямую корреляционную взаимосвязь с количеством провоспалительного IL-1β и цитокинами второй волны — IL-8 и IL-10, что подчеркивает важность баланса цитокинов в патогенезе РА [11]. Выявленная обратная корреляционная связь уровней TNFα и общего IgG указывает на их разнонаправленную значи-

мость в иммунопатологических реакциях при РА [1, 9]. Провоспалительный цитокин IL-17A, с которым ассоциируют Th17-зависимое воспаление в пораженных суставах при РА, в наших исследованиях СЖ оказался корреляционно взаимосвязанным с противовоспалительными IL-10 и IL-6-зависимым острофазным белком CRP, также обладающим функцией сдерживания воспаления [11, 12]. Это вновь подчеркивает важность балансовых взаимоотношений цитокинов и индуцированных ими эффекторных белков в СЖ при РА. IL-8, являясь цитокином «второй волны», проявлял в СЖ при РА сильную прямую корреляционную взаимосвязь как с провоспалительными цитокинами IL-1β и TNFα, так и противовоспалительным IL-10, что вновь подчеркивает балансовые взаимоотношения физиологически разнонаправленных цитокинов в локальном патологическом процессе. Наконец, была установлена сильная прямая корреляционная взаимосвязь противовоспалительного IL-10 с провоспалительными цитокинами IL-1β и, в меньшей степени, с TNFα и IL-17A, а также с цитокинами второй волны IL-8 и, в мень-

Таблица 5

Корреляционная связь наиболее значимых параметров синовиальной жидкости пораженного коленного сустава с биомаркерами периферической крови пациентов с ревматоидным артритом

Сравниваемые параметры		Количество образцов	Коэффициент корреляции, R	Уровень значимости, p
синовиальной жидкости	периферической крови			
IL-1β	РФ	11	0,688	p=0,019
	IL-10	19	0,634	p=0,003
	TGFβ1	16	0,596	p=0,015
	IL-6	18	0,558	p=0,016
	СОЭ	15	0,517	p=0,048
	ЦИК	18	0,505	p=0,033
TNFα	IL-10	19	0,656	p=0,002
	TGFβ1	17	0,581	p=0,014
	ЦИК	19	0,526	p=0,02
IL-17	CRP	17	0,805	p<0,001
	РФ	12	0,607	p=0,036
IL-8	TGFβ1	16	0,619	p=0,01
	РФ	11	0,61	p=0,04
	ЦИК	18	0,420	p=0,082
IL-10	TGFβ1	22	0,465	p=0,029
	ЦИК	31	0,368	p=0,041
	IL-6	29	0,366	p=0,05

Примечание. РФ — ревматоидный фактор, СОЭ — скорость оседания эритроцитов, CRP — С-реактивный белок, ЦИК — циркулирующие иммунные комплексы.

шей степени, с IL-6. Выявленные закономерности и тенденции взаимоотношений цитокинов СЖ различного происхождения и с различной биологической активностью свидетельствуют о сложных балансовых отношениях участников локального воспаления в пораженных суставах при РА.

С учетом стандартно изучаемых показателей ПК человека мы оценили возможную связь основных цитокинов СЖ с лабораторными показателями ПК пациентов с РА. Как видно из **табл. 5**, с повышенным уровнем IL-1β в СЖ проявляли прямую сильную корреляционную взаимосвязь уровни РФ и IL-10, в меньшей степени — TGFβ1, IL-6, СОЭ и ЦИК, что свидетельствует о мощном противовоспалительном потенциале цитокинов и белков ПК в ответ на острое воспаление в пораженных суставах [4, 10, 14]. Аналогично, для цитокина воспаления TNFα в СЖ выявлена прямая корреляционная связь с IL-10 и TGFβ1 в ПК. Для IL-17A в СЖ установлена прямая корреляционная связь только с уровнем CRP и РФ в ПК. Уровни IL-8 и IL-10 в СЖ проявляли в первую очередь прямую корреляционную взаимосвязь с уровнем TGFβ1 в ПК и, в меньшей степени, с РФ и ЦИК.

Таким образом, у пациентов с ревматоидным артритом в синовиальной жидкости пораженных суставов, но не в периферической крови, выявлена прямая взаимосвязь уровней цитокинов IL-1β,

TNFα, IL-8, IL-17A с активностью заболевания при оценке по индексу DAS28. При этом цитокины воспаления IL-1β, TNFα, IL-17A, а также IL-8 в синовиальной жидкости проявляли статистически значимую прямую корреляционную взаимосвязь с уровнем противовоспалительного цитокина IL-10 в синовиальной жидкости и TGFβ1, IL-10 (для IL-1β, TNFα) и белков ревматоидного фактора, циркулирующих иммунных комплексов и С-реактивного белка (для IL-17A) — в периферической крови пациентов с ревматоидным артритом.

Следует заключить, что не ключевые цитокины, а баланс цитокинов (и белков, ассоциированных с иммунным воспалением) играют ведущую роль в патогенезе ревматоидного артрита. При этом баланс цитокинов и белков, ассоциированных с иммунным воспалением в синовиальной жидкости пораженных суставов и периферической крови пациентов с ревматоидным артритом, имеют различающийся профиль.

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения Республики Беларусь (НИР госрегистрации 20142699). Научный руководитель проекта — профессор Сорока Н.Ф.

Авторы не имеют конфликта интересов в связи с опубликованием данной статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Насонов Е.Л. Роль биомаркеров в диагностике и прогнозировании эффективности современной терапии ревматоидного артрита // Клиническая диагностика. 2013. № 8. Р. 3–13.
Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Nasonov E.L. [The role of biomarkers in diagnostics and forecasting of effectiveness of modern therapy of rheumatoid arthritis] // *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2013. № 8. Р. 3–13. Russian.
2. Безгин А.В., Князева Л.А. Изучение влияния терапии на показатели цитокинового статуса в синовиальной жидкости и клиническую симптоматику у больных ревматоидным артритом в зависимости от позитивности по ревматоидному фактору // Российский биотерапевтический журнал. 2011. Т. 10. № 3. С. 67–70.
Bezgin A.V., Knyazeva L.A. [The influence of treatment on the local immune status and clinical picture in different serological subtypes of rheumatoid arthritis] // *Russian Journal of Biotherapy*. 2011. Vol. 10. № 3. Р. 67–70. Russian.
3. Деркачев В.С., Алексеев С.А., Ибрагимова Ж.А., Потаннев М.П., Бордаков В.Н., Гончарик А.В., Семерихина С.Е., Картун Л.В. Иммунологические предикторы ранних послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений у пациентов с переломами длинных трубчатых костей // Новости хирургии. 2016. Т. 24. № 6. С. 561–567.
Derkachev V.S., Alekseev S.A., Ibragimova Z.A., Potapnev M.P., Bordakov V.N., Honcharik A.V., Semerichina S.E., Kartun L.V. [Immunological predictors of early postoperative pyo-inflammatory complications in patients with long bone fractures] // *Novosti Khirurgii*. 2016. Vol. 24. № 6. Р. 561–567. Russian.
4. Мороз Л.А., Талако Т.М., Потаннев М.П., Сорока Н.Ф. Дихотомия локального Th1- и системного Th2/Th3-зависимого типа иммунного ответа при ревматоидном артрите // Бюлл. эксп. биол. мед. 2019. Т. 167. № 1. Р. 76–80.
Moroz L.A., Talako T.M., Potapnev M.P., Soroka N.F. [Dichotomy of local Th1- and systemic Th2/Th3-dependent types of immune response in rheumatoid arthritis] // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019. Vol. 167. № 1. Р. 69–73. doi: 10.1007/s10517-019-04463-7.
5. Потаннев М.П. Значение иммунорегуляторных цитокинов в формировании реакций воспаления // Здоровье (Минск). 1996. № 11. Р. 50–54.
Potapnev M.P. [The role of immunoregulatory cytokines for induction of inflammatory reactions] // *Zdravookhranenie (Minsk)*. 1996. № 11. Р. 50–54. Russian.
6. Свиридова В.С., Кологривова Е.Н., Пронина Н.А., Елисева Л.В., Читалкина А.А., Кологривова И.В. Цитокиновая регуляция иммунных реакций при ревматоидном артрите // Цитокины и воспаление. 2010. Т. 9. № 2. Р. 3–6.
Sviridova V.S., Kologrivova E.N., Pronina N.A., Eliseeva L.V., Chitalkina A.A., Kologrivova I.V. [Cytokine regulation of immune responses in rheumatoid arthritis] // *Cytokines and Inflammation (St. Petersburg)*. 2010. Vol. 9. № 2. Р. 3–6. Russian.
7. Burska A., Boissinot M., Ponchel F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis // *Mediators Inflamm.* 2014. Vol. 2014. 545493. doi: 10.1155/2014/545493.
8. De Jager W., Hoppenreijds E.P., Wulffraat N.M., Wedderburn L.R., Kuis W., Prakken B.J. Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis: a cross-sectional study // *Ann. Rheum. Dis.* 2007. Vol. 66. № 5. Р. 589–598.
9. Firestein G., McInnes I.B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis // *Immunology*. 2017. Vol. 46. № 2. Р. 183–196. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.006.
10. Penatti A., Facciotti F., De Matteis R., Larghi P., Paroni M., Murgo A., De Lucia O., Pagani M., Pierannunzi L., Truzzi M., Ioan-Facsinay A., Abrignani J., Geginat J., Meroni P.L. Differences in serum and synovial CD4+ T cells and cytokine profiles to stratify patients with inflammatory osteoarthritis and rheumatoid arthritis // *Arthritis Res. Ther.* 2017. Vol. 19. № 1. Р. 103. doi: 10.1186/s13075-017-1305-1.
11. McInnes I.B., Buckley C.D., Isaacs J.D. Cytokines in rheumatoid arthritis – shaping the immunological landscape // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016. Vol. 12. № 1. Р. 63–68. doi: 10.1038/nrrheum.2015.171. Epub 2015.
12. Metawi S.A., Abbas D., Kamal M.M., Ibrahim M.K. Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA // *Clin. Rheumatol.* 2011. Vol. 30. № 9. Р. 1201–1207. doi: 10.1007/s10067-011-1737-y.
13. Schulze-Tanzil G., Zreigat H., Sabat R., Kohl B., Halder A., Muller R.D., John T. Interleukin-10 and articular cartilage: experimental therapeutical approaches in cartilage disorders // *Curr. Gene Ther.* 2009. Vol. 9. № 4. Р. 306–316.
14. Wright H.L., Bucknall R.C., Moots R.J., Edwards S.W. Analysis of SF and plasma cytokines provides insights into the mechanisms of inflammatory arthritis and may predict response to therapy // *Rheumatology (Oxford)*. 2012. Vol. 51. № 3. Р. 451–459. doi: 10.1093/rheumatology/ker338.
15. Yang X., Chang Y., Wei W. Endothelial dysfunction and inflammation: immunity in rheumatoid arthritis // *Mediators Inflamm.* 2016. Vol. 2016. 6813016. doi: 10.1155/2016/6813016.

Cytokine network of synovial fluid and its relationship with rheumatoid arthritis activity

L.A. Moroz¹, T.M. Talako², M.P. Potapnev^{1,3,4}, N.F. Soroka⁴¹Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Republic Belarus;²Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic Belarus;³International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic Belarus;⁴Belarusian State Medical University, Minsk, Republic Belarus

The goal of the research was to evaluate the significance and relation of cytokines in synovial fluid (SF) from damaged joints with other valuable biomarkers of local and systemic inflammation in patients with rheumatoid arthritis (RA). Data from 84 RA patients were collected. The obtained results demonstrated a weak direct correlation of disease activity index DAS28 with erythrocyte sedimentation rate, IgA content and inverse correlation — with hemoglobin content in peripheral blood (PB). At the same time, direct correlation of DAS28 was found with quantity of IL-1 β and IL-8 in SF of patients with RA. Correlation was found between the level of IL-1 β , IL-8, TNF α , IL-17A in SF and the level of IL-10 in SF and TGF β , IL-10 (for IL-1 β , TNF α) and serum proteins: rheumatoid factor, circulating immune complexes and C-reactive protein (for IL-17A) in PB of patients with RA. It was concluded that the network of cytokines in SF and cytokines and inflammation-related proteins in PB which are distinct from those in SF, is pathogenically valuable for RA activity. (*Cytokines and Inflammation*. 2019. Vol. 18. № 1–4. Р. 85–90.)

Key words: rheumatoid arthritis, cytokines, synovial fluid, peripheral blood.

Двухфазный характер действия гистамина на проницаемость монослоя эндотелиальных клеток линии EA.hy926 для белковых молекул *in vitro*

О.Н. Мальцева¹, П.Г. Назаров^{1,2}, Д.А. Танянский¹, А.Д. Денисенко¹

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

² ФГОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

С использованием двухкамерной культуральной системы с вставками с пористым дном (диаметр пор 1 мкм) исследовали влияние гистамина (10^{-6} М) на трансэндотелиальный транспорт (ТЭТ) человеческих альбумина, IgM, апо А1 и апо В через монослой клеток эндотелиальной линии EA.hy926 через 3, 5, 15, 45 и 60 мин, а также через 2, 4, 10 и 24 ч инкубации при 37 °С. Результаты впервые убедительно показали, что влияние гистамина на трансэндотелиальный транспорт веществ зависит от H1, но не от H2 гистаминовых рецепторов и носит двухфазный характер. Первая фаза характеризуется стимуляцией транспорта с максимумом около 60 мин, вторая — его снижением ниже контрольного уровня, продолжающимся в течение 24 ч (срок наблюдения). Как стимуляция ТЭТ в первой фазе, так и снижение во второй полностью отменялись H1 блокатором хлоропирамин. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 91–96.)

Ключевые слова: эндотелий, трансэндотелиальный транспорт, альбумин, апо А1, апо В, гистамин, H1 рецепторы.

Гистамин представляет собой низкомолекулярный амин, синтезируемый из l-гистидина гистидиндекарбоксилазой [13].

Гистамин хорошо известен своей ролью в регуляции вазодилатации и функций эндотелиальных клеток [15]. Существует прямая связь между гистамином и воспалением сосудов, что следует из увеличенных уровней гистамина в коронарных артериях пациентов с ишемической болезнью сердца и повышенных уровней гистамина в крови пациентов с вазоспастической стенокардией (стенокардией Принцметала) [9]. Гистамин индуцирует повышение уровня мРНК циклоок-

сигеназы-2 и продукцию IL-6 и других провоспалительных медиаторов [15].

Воспалительные реакции и реакции гиперчувствительности, вызванные гистамином, опосредуются через семейство из четырех различных рецепторов, связанных с G-белками, — H1R, H2R, H3R и H4R [15].

Показано, что гистамин взаимодействует также с различными субпопуляциями клеток, участвующими в иммунных и воспалительных реакциях, и модулирует их активность. Считается, что гистамин может влиять на разные этапы иммунного процесса в тех концентрациях, которые существуют *in vivo* в физиологических и патологических условиях. Поэтому его можно рассматри-

Мальцева Ольга Николаевна, e-mail: movolya@mail.ru

вать как значимый модулятор воспалительных и иммунных процессов. Антигистаминные препараты, блокирующие рецепторы гистамина на чувствительных клетках, эффективно снижают сосудистую проницаемость [5]. Хотя гистамин является мощным вазодилататором, точный механизм его действия в условиях *in vivo* остается неизвестным [1].

На эндотелиальные клетки гистамин действует синергично с другими воспалительными стимулами, что подразумевает их совместное участие в регуляции проницаемости сосудов в норме и при воспалении [6].

Гистамин выделяется главным образом из тучных клеток, которые являются его основными продуцентами. Изменения в проницаемости сосудов, вызванные гистамином, зависят от его концентрации и продолжительности действия. Умеренные, физиологические концентрации гистамина повышают проницаемость сосудов, тогда как высокие могут снижать [8, 10]. Согласно исследованиям, в которых использовали культивируемые эндотелиальные клетки, гистамин вызывает изменение формы клеток, усиливает мобильность, ускоряет рост и синтетические процессы [12].

Целью настоящего исследования было получение более полной характеристики действия гистамина на проницаемость эндотелиального монослоя *in vitro*, оценив его не только на коротком промежутке времени после добавления гистамина в систему, как делает большинство авторов, но и после более длительной инкубации.

Материалы и методы

Эндотелиальные клетки человека линии EA.hy926, полученные от Dr. Butterfield («Mayo Clinic», USA), высевали на пористые вставки («Transwell, BD», США) с размером пор 1 мкм, предварительно покрытые коллагеном 1-го типа (ООО «БиолоТ», Россия), и выращивали в среде DMEM («Thermo Scientific», США) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (ООО «БиолоТ», Россия) до образования конфлюентного монослоя. Оценку конфлюентности эндотелиального монослоя проводили при помощи FITC-декстрана (70 кДа, «Sigma-Aldrich», США) [11].

Далее культуральную среду во вставках заменяли на 200 мкл бесцветной среды DMEM («Sigma-Aldrich», США) с содержанием 5% сыворотки человека (донорская кровь здорового человека) в качестве источника альбумина и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), либо на 200 мкл бесцветной среды DMEM с добавлением выделенных ЛПНП (до конечной концентрации 200 мкг/мл, по белку) и человеческого сывороточного альбумина (ЧСА, «Sigma», США) в концентрации 200 мкг/мл; в нижнюю камеру вносили 700 мкл среды DMEM без сыворотки. ЛПНП предварительно были выделены из сыворотки крови человека методом ступенчатого ультрацентрифугирования в градиенте плотности NaBr ($d=1,025$ г/мл)

в течение 22 ч со скоростью 38000 об./мин на ультрацентрифуге Beckman Coulter Optima L90-K. Концентрацию ЛПНП определяли по белку Апо В с помощью БСА-реактива («Thermo Scientific Pierce», США).

Для оценки влияния гистамина на жизнеспособность эндотелия и трансэндотелиальный транспорт ЧСА, ЛПНП, апоА и IgM человека указанные вещества, а также гистамин и блокаторы гистаминовых рецепторов добавляли в верхние камеры лунок в начале инкубации. Из нижних камер на нужных сроках забирали среду для определения содержания в ней ЧСА, апо В (ЛПНП), апоА и IgM. Гистамин («Merk», Германия) добавляли до конечной концентрации 10^{-6} М. В качестве блокаторов H1 и H2 рецепторов использовали, соответственно, хлоропирамина гидрохлорид (супрастин для инъекций, в конечной концентрации 200 мкг/мл; «Egis», Венгрия) и фамотидин (квamatел лиофилизат для инъекций, в конечной концентрации 200 мкг/мл; «Гедеон Рихтер», Венгрия). Контролем служили вставки с эндотелием в DMEM, а также вставки, покрытые коллагеном без эндотелия (для контроля барьерных свойств монослоя эндотелия). Инкубации проводили в течение 3, 5, 15, 45 и 60 мин, а также 2, 4, 8, 12 и 24 ч с забором проб из нижней камеры. Степень проникновения веществ через эндотелий оценивали по их концентрации в нижней камере на сроках, указанных выше. Пробы анализировали с помощью биохимических методов и иммуноферментного анализа, разработанных в отделе биохимии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Жизнеспособность и уровень апоптоза эндотелиальных клеток оценивали с помощью двух методов на проточном цитофлуориметре Navios («Beckman Coulter», США). Эндотелиальные клетки непосредственно после проведения эксперимента снимали с пористой мембраны вставок с помощью инкубирования с раствором акутазы («Sigma», США) в течение 5–7 мин при 37 °С. Далее клетки отмывали раствором полной среды DMEM, инкубировали со смесью красителей в соответствии с методом 1 либо 2. Метод 1: смесь пропидиума йодида (PI, «Abcam», США), окрашивающего ДНК, и карбоцианина йодида (YO-PRO-1, «Thermo Fisher Scientific», США), проникающего только в клетки с нарушенной проницаемостью мембраны. Метод 2: смесь DRAQ7 («BioLegend», США), окрашивающего ДНК в неживых клетках, и TMRM (Tetramethylrhodamine, «Thermo Fisher Scientific», США), являющегося репортером потенциала внутренней мембраны митохондрий, окрашивающего только живые клетки. В качестве положительного контроля использовали вызывающее апоптоз вещество CAM (камптотецин, 10 мкМ; «Sigma-Aldrich», США), представляющее собой цитотоксический хинолиновый алкалоид, который ингибирует топоизомеразу I, ядерный фермент, участвующий в процессе репликации ДНК. Отрицательным контролем служили клетки, инкубированные со средой.

Результаты цитометрического учета анализировали при помощи пакета программ «Kaluza» («Beckman Coulter», США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы «Microsoft Excel». Данные оптической плотности, пересчитанные на количество белка в мкг, либо в процентах от добавленного в систему анализируемого вещества, на графиках отражены в виде средних арифметических с указанием стандартной ошибки среднего.

Т а б л и ц а

Оценка уровня апоптоза эндотелиальных клеток EA.hy926 под действием гистамина и блокатора H1

Воздействующие на эндотелиоциты вещества	Метод 1 (PI и YO-PRO-1)				Метод 2 (DRAQ7 и TMRM)			
	Живые клетки, %		Неживые клетки, %		Живые клетки, %		Неживые клетки, %	
	2 ч	24 ч	2 ч	24 ч	2 ч	24 ч	2 ч	24 ч
Среда DMEM (отрицательный контроль)	95,1	93,95	3,45	5,3	94,55	90,8	3,5	6,45
ЛПНП + ЧСА	93,15	92,75	4,95	5,85	93,65	90,95	3,25	7,05
ЛПНП + ЧСА + гистамин	94	95,9	4,6	3,4	93,2	93,8	4,6	4,8
ЛПНП + ЧСА + гистамин + H1-блокатор	93,4	93	4,4	5,6	95,4	85,4	3,1	7,1
САМ (положительный контроль)	93,4	67,91	5,2	21,49	93,2	61	3,3	28,3

Примечание. Реагенты и их финальные концентрации: ЛПНП (липопротеины низкой плотности) — 200 мкг/мл, ЧСА (человеческий сывороточный альбумин) — 200 мкг/мл, гистамин — 10⁻⁶ М, H1-блокатор (супрастин) — 200 мкг/мл, САМ (камптотецин) — 10 нМ.

Различия между группами оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента и считали различия достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

С целью исключения артефактов эксперимента был проведен анализ эндотелиальных клеток на апоптоз в присутствии добавленного в систему гистамина в разных концентрациях. Апоптоз оценивали с помощью двух независимых методов на проточном цитофлуориметре. Оба метода показали сходные результаты, которые представлены в **таблице**. По результатам оценки уровня апоптоза показано, что 2-часовая инкубация эндотелиальных клеток с гистамином и блокатором H1 рецептора не приводила к их гибели: уровень живых клеток был высоким и соответствовал контролю. Через 24 ч процент неживых клеток несущественно возрастал, но оставался в пределах нормы. САМ в нашей модели понижал процент живых клеток почти в два раза к 24 ч инкубации. Таким образом, присутствие в культуральной среде ЛПНП, ЧСА, гистамина и супрастина, порознь или вместе, не оказывало на клетки эндотелия цитотоксического действия.

Из приведенных данных следует, что в данной модели, при анализе трансэндотелиального транспорта белковых молекул, любые изменения проницаемости монослоя эндотелиальных клеток под влиянием гистамина и блокатора H1-рецепторов можно считать результатом изменения именно механизмов транспорта, а не снижения жизнеспособности эндотелиальных клеток.

Известно, что воспалительный ответ сопровождается повышением проницаемости сосудов артериального и венозного типа, и одним из воспалительных факторов, ответственных за это,

считается гистамин, оказывающий влияние на гладкомышечный слой в артериях и образование зазоров между эндотелиальными клетками в венах [17]. Однако каким именно образом гистамин индуцирует нарушение эндотелиального барьера, определено недостаточно четко [7]. Патогенетическая роль гистамина и гистаминовых рецепторов и атерогенные последствия повышения сосудистой проницаемости были показаны у мышей с экспериментальным атеросклерозом и дефицитом гистамина, вызванным нокаутом гена гистидиндекарбоксилазы — фермента, ответственного за образование гистамина. У животных с дефицитом гистамина атеросклеротические поражения сосудов были значительно менее выражены, чем у контрольных, несмотря даже на более высокие урони холестерина в плазме крови [16]. Т. о., повышая проницаемость сосудов, гистамин способствует проникновению и отложению атерогенных липопротеинов в интиме сосудов.

Вместе с тем, временная динамика реакции собственно эндотелия на действие гистамина и дру-

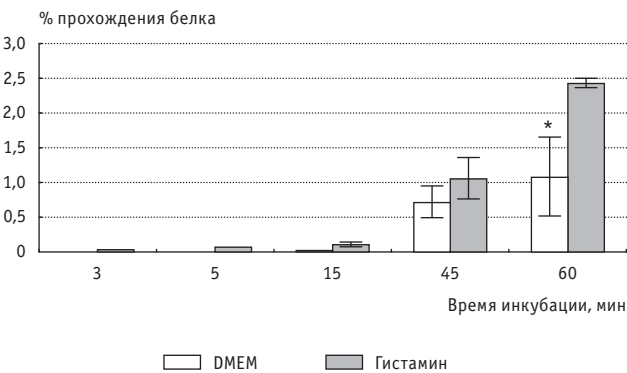


Рис. 1. Влияние гистамина на трансэндотелиальный транспорт человеческого сывороточного альбумина на ранних сроках инкубации

гих воспалительных факторов изучена недостаточно [14]. Для изучения этого вопроса мы использовали модель ответа на гистамин со стороны монослоя эндотелиальных клеток *in vitro*.

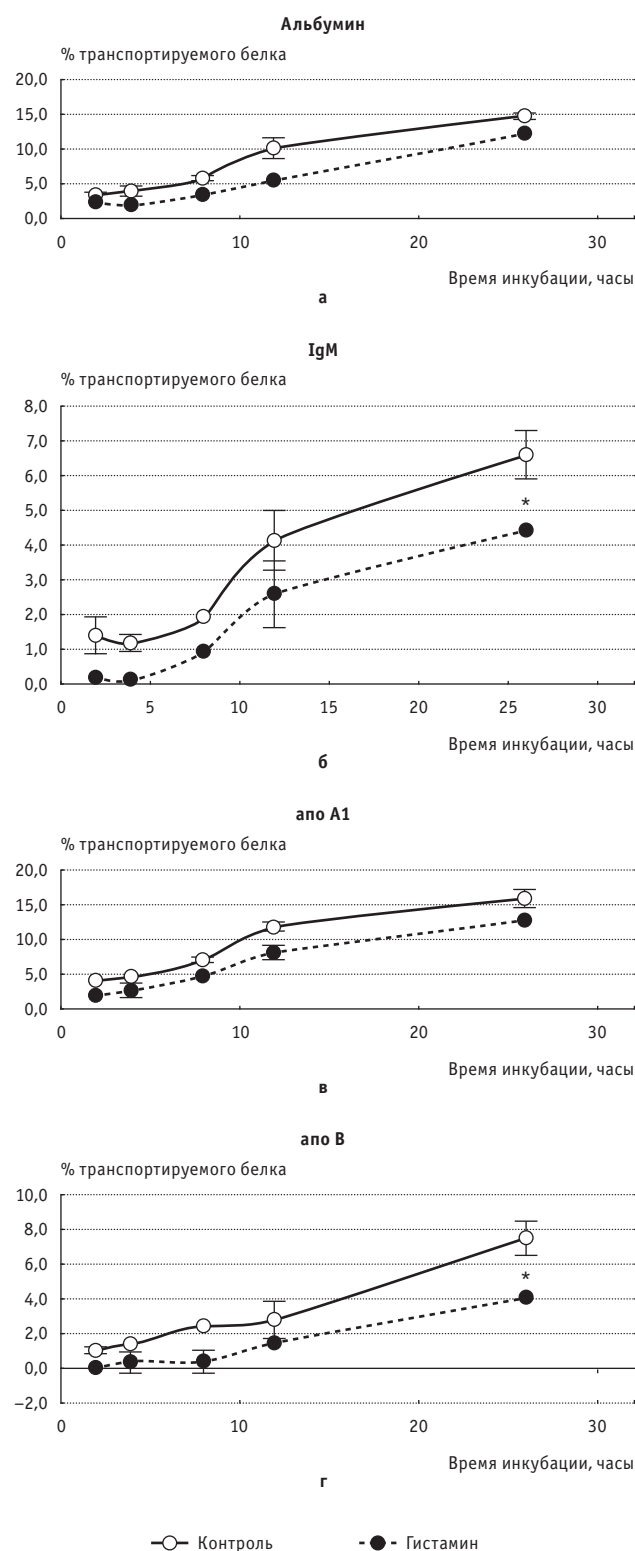


Рис. 2. Влияние гистамина на трансэндотелиальный транспорт веществ на поздних этапах инкубации

* — Различия между кривой влияния гистамина и контрольной кривой достоверны, $p < 0,05$.

Как показано на рис. 1, на коротких сроках инкубации эндотелия с гистамином, в пределах одного часа, мы, как и другие авторы, наблюдали повышение проницаемости эндотелиального монослоя.

Однако на более поздних этапах инкубации (начиная со 2 и 4 ч) наблюдалось понижение эндотелиальной проницаемости для всех белковых молекул, транспорт которых мы исследовали — для ЧСА, IgM, ApoA1, ApoB (рис. 2). На рис. 2 видно, что на сроках от 2 до 24 ч характер влияния гистамина на эндотелий для различных молекул был сходным: на всех временных точках проникновение белков через эндотелий из верхней камеры в нижнюю в присутствии гистамина было ниже, чем в контроле без гистамина. Различия с контролем на всех графиках очевидны (см. рис. 2).

Таким образом, как стимулятор трансэндотелиального транспорта гистамин скорее всего начинает действовать практически мгновенно, с первых минут повышая проницаемость эндотелия. Стимулирующий эффект гистамина на проницаемость быстро нарастает и наблюдается в течение часа. После этого начинается обратный процесс — снижение проницаемости, которое сохраняется по крайней мере в течение суток. Кратковременность повышения проницаемости эндотелия под действием гистамина согласуется с данными других авторов [17]. Таким образом, эффект гистамина реализуется довольно быстро, но так же быстро проходит. Если в течение первых минут гистамин повышает проницаемость для белков, то спустя часы происходит компенсаторное снижение проницаемости, что мы и наблюдали. Вероятно, вторая фаза отражает не прямой эффект гистамина, а вторичную реакцию эндотелия в ответ на исходное повышение проницаемости.

Влияние гистамина на трансэндотелиальный транспорт веществ при блокаде H1 и H2 гистаминовых рецепторов эндотелия

В клетках эндотелиальной линии EA.hy926 активация гистамином, по крайней мере, некоторых клеточных реакций (например, активации гена SERCA 3 — Ca^{2+} -АТФазы) опосредуются через гистаминовый рецептор H1 [4]. Через H1 рецептор гистамин действует и *in vivo*, вызывая у кролика контракцию вен [3]. Вместе с тем, по данным Takeda T. и др., гистамин действует на проницаемость монослоя эндотелиальных клеток пуповинной вены человека для альбумина не через H1, а через H2-рецептор, т. к. эффект гистамина отменялся фамотидином (квamatелом), блокаторм H2 гистаминовых рецепторов [12]. Кроме того, показано, что эндотелий вен разных анатомических областей (конечностей, грудной клетки) может существенно различаться по чувствительности к гистамину [3].

Учитывая противоречивость данных о рецепторах эндотелиальных клеток, опосредующих влияние на них гистамина, мы использовали два блокатора гистаминовых рецепторов — супрастин (блокатор H1) и квамател (блокатор H2) для идентификации рецептора — посредника эффекта гистамина на клетках EA.hy926.

Как показано на рис. 3, а, при добавлении в среду верхних камер с эндотелиальными клетками и гистамином ингибиторов гистаминовых рецепторов происходила отмена действия гистамина на проницаемость белковых молекул. Так, процент прохождения альбумина в присутствии одного гистамина к 24 ч инкубации был заметно ингибирован по сравнению с контролем и составлял всего около 1,2%. В присутствии же блокаторов гистаминовых рецепторов, особенно блокатора H1, транспорт альбумина вновь возрастал. Блокатор H1 был значительно активнее (в несколько раз), чем блокатор H2. Для ApoB наблюдались сходные результаты (рис. 3, б), причем преобладание H1 над H2 блокатором было еще более убедительным, эффект H2 блокатора в этом случае практически полностью отсутствовал.

Таким образом, на эндотелиальных клетках линии EA.hy926, происходящей, как известно, из эндотелия пуповинной вены человека, нами убедительно показано, что гистамин действует на эндотелий через H1 рецепторы. Рецепторы H2 типа практически не участвуют в регуляции действия гистамина на эндотелиальные клетки данной линии.

Кроме того, исходя из приведенных данных, можно сделать вывод, что эффект гистамина в отношении эндотелиальных клеток EA.hy926 имеет две фазы: раннюю короткую, продолжительностью около часа, в течение которой трансэндотелиальный транспорт белков возрастает, и отсроченную, длившуюся в наших опытах от часа до конца первых суток (на более поздних сроках регистрацию не проводили), когда скорость транспорта, наоборот, снижается и держится ниже

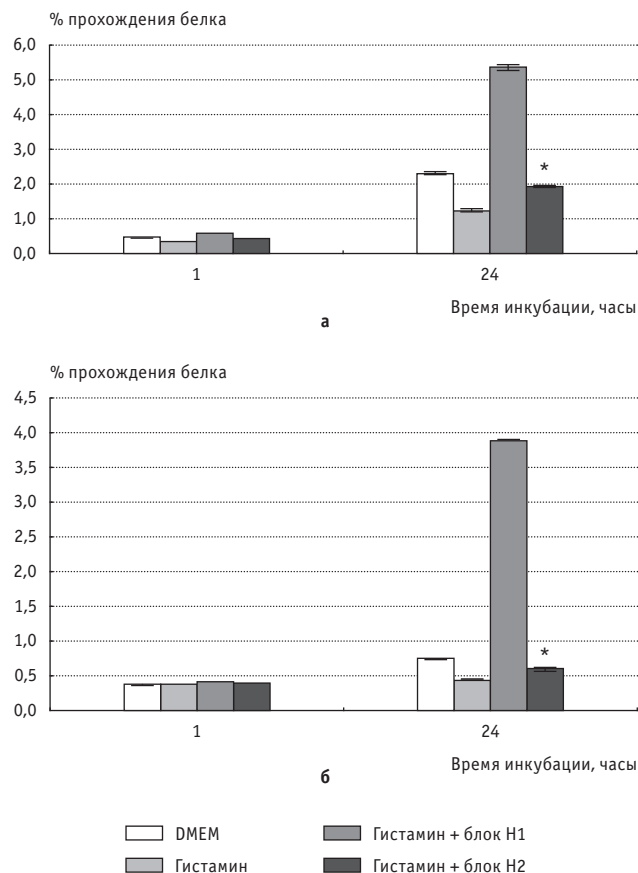


Рис. 3. Влияние гистамина на транспорт веществ при блокаде H1 и H2 гистаминовых рецепторов эндотелия

а — транспорт альбумина (ЧСА); б — транспорт Apo B. * — различия достоверны, $p < 0,05$.

контрольного уровня на всех сроках наблюдения (4 ч, 10 ч, 24 ч). По нашим данным, эндотелий отвечает на гистамин быстрым, но кратковременным повышением проницаемости для компонентов крови, вслед за чем наступает продолжительная фаза «закрытия» эндотелия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, грант № 15-04-08009.

ЛИТЕРАТУРА

- Ashina K., Tsubosaka Y., Nakamura T., Omori K., Kobayashi K., Hori M., Ozaki H., Murata T. Histamine induces vascular hyperpermeability by increasing blood flow and endothelial barrier disruption in vivo // PLoS One. 2015. Vol. 10. № 7. P. e0132367. doi: 10.1371/journal.pone.0132367.
- Beer D.J., Matloff S.M., Rocklin R.E. The influence of histamine on immune and inflammatory responses // Adv. Immunol. 1984. Vol. 35. P. 209–268.
- Galajda Z., Balla J., Szentmiklosi J.A., Biro T., Czifra G., Dobrosi N., Cseppento A., Patonay L., Roszer T., Balla G., Popescu L.M., Lekli I., Tosaki A. Histamine and H1-histamine receptors faster venous circulation // J. Cell. Mol. Med. 2011. Vol. 15. № 12. P. 2614–2623.
- Hadri L., Pavoine C., Lipskaia L., Yacoubi S., Lompre A.-M. Transcription of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase type 3 gene, ATP2A3, is regulated by the calcineurin/NFAT pathway in endothelial cells // Biochem. J. 2006 Feb 15; 394(Pt 1): 27–33. doi: 10.1042/BJ20051387.
- Kunder C.A., St John A.L., Abraham S.N. Mast cell modulation of the vascular and lymphatic endothelium // Blood. 2011. Vol. 118. № 20. P. 5383–5393. doi: 10.1182/blood-2011-07-358432.
- Li Y., Chi L., Stechschulte D.J., Dileepan K.N. Histamine-induced production of interleukin-6 and interleukin-8 by human coronary artery endothelial cells is enhanced by endotoxin and tumor necrosis factor- α // Microvasc. Res. 2001. Vol. 61. № 3. P. 253–262. doi: 10.1006/mvres.2001.2304.
- Mikelis C.M., Simaan M., Ando K., Fukuhara S., Sakurai A., Amornphimoltham P., Masedunskas A., Weigert R., Chavakis T., Adams R.H., Offermanns S., Mochizuki N., Zheng Y., Gutkind J.S. RhoA and ROCK mediate histamine-induced vascular leakage and anaphylactic shock // Nat. Commun. 2015. Vol. 6. P. 6725. doi: 10.1038/ncomms7725.
- Niimi N., Noso N., Yamamoto S. The effect of histamine on cultured endothelial cells. A study of the mechanism of increased vascular permeability // Eur. J. Pharmacol. 1992. Vol. 221. № 2–3. P. 325–331.
- Sakata Y., Komamura K., Hirayama A., Nanto S., Kitakaze M., Hori M., Kodama K. Elevation of the plasma histamine concentration in the coronary circulation in patients with variant angina // Am. J. Cardiol. 1996. Vol. 77. № 12. P. 1121–1126.

10. Sarker M.H., Easton A.S., Fraser P.A. Regulation of cerebral microvascular permeability by histamine in the anaesthetized rat // J. Physiol. 1998. Vol. 507. Pt. 3. P. 909–918.
11. Simoneau B., Houle F., Huot J. Regulation of endothelial permeability and trans-endothelial migration of cancer cells by tropomyosin-1 phosphorylation // Vasc. Cell. 2012. Vol. 4. № 1. P. 18. doi: 10.1186/2045-824X-4-18.
12. Takeda T., Yamashita Y., Shimazaki S., Mitsui Y. Histamine decreases the permeability of an endothelial cell monolayer by stimulating cyclic AMP production through the H2-receptor // J. Cell Sci. 1992. Vol. 101. Pt. 4. P. 745–750.
13. Tanimoto A., Sasaguri Y., Ohtsu H. Histamine network in atherosclerosis // Trends Cardiovasc. Med. 2006. Vol. 16. № 8. P. 280–284. doi: 10.1016/j.tcm.2006.06.001.
14. Thomas A., Wang S., Sohrabi S., Orr C., He R., Shi W., Liu Y. Characterization of vascular permeability using a biomimetic microfluidic blood vessel model // Biomicrofluidics. 2017. Vol. 11. № 2. P. 024102. doi: 10.1063/1.4977584.
15. Walia D.S., Sharma M., Raveendran V.V., Zhou J., Sharma R., Stechschulte D.J., Dileepan K.N. Human mast cells (HMC-1 5C6) enhance interleukin-6 production by quiescent and lipopolysaccharide-stimulated human coronary artery endothelial cells // Mediators Inflamm. 2012. Vol. 2012. P. 274347. doi: 10.1155/2012/274347.
16. Wang K.-Y., Tanimoto A., Guo X., Yamada S., Shimajiri S., Murata Y., Ding Y., Tsutsui M., Kato S., Watanabe T., Ohtsu H., Hirano K.-I., Kohno K., Sasaguri Y. Histamine deficiency decreases atherosclerosis and inflammatory response in apolipoprotein E knockout mice independently of serum cholesterol level // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2011. Vol. 31. № 4. P. 800–807. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.215228.
17. Wu N.Z., Baldwin A.L. Transient venular permeability increase and endothelial gap formation induced by histamine // Am. J. Physiol. 1992. Vol. 262. № 4. Pt. 2. P. H1238–47. doi: 10.1152/ajpheart.1992.262.4.H1238.

The biphasic nature of the histamine action on the permeability of EA.hy926 endothelial cell monolayer for protein molecules *in vitro*

O.N. Maltseva¹, P.G. Nazarov^{1, 2}, D.A. Tanyansky¹, A.D. Denisenko¹

¹Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg;

²Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg

Using a two-chamber transwell culture system with inserts with a porous bottom (pore diameter of 1 µm), the effect of histamine (10⁻⁶ M) on the trans-endothelial transport (TET) of human albumin, IgM, apo A1 and apo B through EA.hy926 endothelial cell line monolayer was investigated at 3, 5, 15, 45 and 60 minutes, and after 2, 4, 10 and 24 hours of incubation at 37 °C. The results clearly showed that, in our system, the effect of histamine on the TET depends on H1, but not the H2 histamine receptors and is biphasic in nature. The first phase is characterized by the stimulation of transport with a maximum at about 60 minutes, the second — by its decrease below the control level, which lasts for 24 hours (observation period). Both TET stimulation in the first phase and decrease in the second phase were completely canceled by the H1 blocker chloropyramine. (Cytokines and Inflammation. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 91–96.)

Key words: endothelium, transendothelial transport, albumin, apo A1, apo B, histamine, H1 receptors.

Применение рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ (Интерфераль) и γ -D-глутамил-L-триптофана (Бестим) для консервативного лечения хронического полипозного риносинусита

*Е.В. Безрукова¹, В.Г. Конусова²,
Е.В. Воробейчиков³, А.С. Симбирцев^{2, 4}*

¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет
имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург;

²ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург;

³ООО «Полифарм», Санкт-Петербург;

⁴ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Проведена оценка эффективности применения рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ (Интерфераль) и γ -D-глутамил-L-триптофана (Бестим) для консервативного лечения хронического полипозного риносинусита (ХПРС). В полипозную ткань в течение пяти дней вводили рекомбинантный интерферон $\alpha 2b$ в дозе 1 млн. ЕД и γ -D-глутамил-L-триптофана в дозе 0,1 мг. Для оценки результатов исследования использовали регрессионный анализ количественных изменений следующих клинических симптомов: размер полипозной ткани; отечность слизистой оболочки и интенсивность выделений из носа. Показано, что консервативная терапия ХПРС на основе введения в полипозную ткань рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ с γ -D-глутамил-L-триптофаном дает позитивный лечебный эффект, который сопровождается выраженным снижением размеров полипозной ткани, отечности слизистой оболочки и выделений из носа в течение года. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 97–102.)

Ключевые слова: хронический полипозный риносинусит, интерферон $\alpha 2b$,
 γ -D-глутамил-L-триптофан.

Для консервативного лечения хронического полипозного риносинусита (ХПРС) применяют аэрозольные и системные глюкокортикостероиды, антибактериальные препараты при гнойном обострении заболевания, а также промывание полости носа солевыми растворами [2, 9]. При неэффективности консервативной терапии проводят оперативное вмешательство в объеме эндоскопической полисинусотомии и назначением в

послеоперационном периоде указанных классов препаратов. Вместе с тем, гормональная терапия обеспечивает временный эффект, зависящий от дозы препаратов и продолжительности их применения, а при наличии у пациентов нейтрофильных полипов гормональная терапия вообще не оказывает воздействия на патологический процесс [3, 6, 11]. Применение антибактериальных препаратов, например, макролидов, увеличивает длительность ремиссии ХПРС, но их эффективность связывают с иммуносупрессивным действием этих

Безрукова Евгения Валерьевна, e-mail: ban_@mail.ru

лекарственных средств на полипозный процесс [7]. Хирургическое лечение также не снижает рецидивы данного заболевания.

Поэтому в последнее время разработки терапевтического лечения ХПРС проводят в области антицитокиновой и иммунокорригирующей или иммунозаместительной терапии [8]. Антицитокиновая терапия основывается на применении специальных антител, блокирующих определенные цитокины или иммуноглобулины, например, класса IgE [12]. Вместе с тем, в России практическое применение этого класса препаратов имеет ограничения юридического характера. Иммунозаместительное лечение базируется на использовании препаратов цитокинового ряда или иммуномодулирующих средств, направленных на коррекцию мукозального иммунитета. Однако их клиническая эффективность на фоне хронического полипозного процесса не изучена.

Целью исследования является оценка эффективности применения рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ (Интерфераль) и γ -D-глутамил-L-триптофана (Бестим) для консервативного лечения ХПРС.

Основанием применения рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ (Интерфераль) для терапии ХПРС является его известная антипролиферативная и иммуномодулирующая активность [4, 10]. Основанием применения γ -D-глутамил-L-триптофана (Бестим) для терапии ХПРС является его стимулирующая активность по отношению к реакциям клеточного и гуморального иммунитета, процессам регенерации и клеточного метаболизма, нормализации количества Т-хелперов, Т-супрессоров и их соотношений [5].

Материалы и методы

В исследование были включены 49 больных с ХПРС в возрасте от 35 до 60 лет, у которых отсутствовали гнойные воспалительные процессы в околоносовых пазухах и бронхиальная астма.

Распространенность полипозного процесса оценивали эндоскопическим методом исследования и выражали в баллах. Отсутствие полипов — 0 баллов. Наличие полипов в среднем носовом ходе — 1 балл. Полипы, выходящие за пределы среднего носового хода, но не блокирующие общий носовой ход — 2 балла. Полипы, полностью obturiruyushchie носовой ход — 3 балла. Кроме того, по балльной шкале определяли отечность слизистой оболочки полости носа и интенсивность выделений из носа. Отсутствие отека нижних и средних носовых раковин — 0 баллов. Закрытие 1/3 просвета общего носового хода — 1 балл. Закрытие половины просвета общего носового хода — 2 балла. Полное закрытие просвета общего носового хода — 3 балла. Отсутствие выделений из носа — 0 баллов. Незначительные выделения из среднего носового хода — 1 балл. Умеренные выделения из средне-

го и общего носовых ходов — 2 балла. Обильные выделения из среднего и общего носовых ходов — 3 балла. У всех пациентов исходная распространенность полипозного процесса состояла на уровне $2,2 \pm 0,2$ балла; отечность — на уровне $2,8 \pm 0,4$ балла; выделения из носа — на уровне $2,9 \pm 0,3$ балла.

Продолжительность курсового применения рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ (Интерфераль) и γ -D-глутамил-L-триптофана (Бестим) составляла 5 дней. Препараты, находящиеся в одном шприце, вводили в полипозную ткань в следующих дозах: рекомбинантный интерферон $\alpha 2b$ в дозе 1 млн. ЕД; γ -D-глутамил-L-триптофан в дозе 0,1 мг. Указанные лекарственные препараты изготовлены в ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России.

После применения препаратов состояние полипозной ткани определяли эндоскопически с использованием эндоскопа «Азимут» на 5-й, 14-й, 30-й, 180-й и 365-й день исследования. Для оценки количественных изменений полипозной ткани использовали регрессионный анализ [1].

Результаты и обсуждение

В результате расчетов были получены зависимости изменений размеров полипозной ткани (S), отечности слизистой оболочки нижних носовых раковин (P) и интенсивности выделений из носа (I) от времени наблюдений (t) на 5-й, 14-й, 30-й, 180-й и 365-й день после пятидневного применения указанных препаратов. Идентификацию параметров зависимостей проводили методом наименьших квадратов за счет минимизации суммы квадратов отклонений теоретических значений признаков (S), (P) и (I) от их эмпирических значений. В табл. 1, 2 и 3 представлены статистические параметры моделей для оценки количественных изменений указанных признаков.

Результаты в табл. 1, 2 и 3 демонстрируют статистическую достоверность ($p < 0,01$) значений коэффициентов (X_0 , X_1). Это означает, что полученные значения коэффициентов могут быть использованы для построения зависимости изменений признаков (S), (P) и (I) от времени наблюдений (t) в виде следующих регрессионных моделей:

$$S = 1,118 - 0,002t + 1,058 \times \exp(-t) + 0,000004t^2 \quad (1);$$

$$P = 2,075 + 0,009t - 0,226 \times \sqrt{t} + 0,817 \times \exp(-t) \quad (2);$$

$$I = 2,885 + 0,031t - 0,00002t^2 - 0,467 \times \sqrt{t} \quad (3),$$

где: t — время наблюдений, дни. Корреляция (r) между эмпирическими значениями признака (S) и расчетными значениями этого признака, полученными на основе выражения (1), составила $r = 0,987$, уровень значимости $p < 0,01$. Корреляция (r) между эмпирическими значениями признака (P) и расчетными значениями этого признака, полученными на основе выражения (2), составила $r = 0,971$, уровень значимости $p < 0,01$. Корреляция (r) между эмпирическими значениями признака (I) и расчетными значениями этого признака, по-

Таблица 1

Статистические характеристики параметров модели, описывающей количественные изменения размера полипа (S) у больных с хроническим полипозным риносинуситом после 5-дневного введения рекомбинантного интерферона (Интерфераль) в сочетании с γ-D-глутамил-L-триптофаном (Бестим)

Обозначения коэффициентов модели	Значения коэффициентов и их стандартная ошибка	t-критерий (Стьюдента)	F-критерий (Фишера)	Уровень значимости, p	Коэффициент детерминации, R ²
X ₀	1,118±0,024	46,35	283,45	<0,01	92,59
X ₁ t	-0,002±0,0005	-3,32			
X ₁ exp(-t)	1,058±0,043	24,77			
X ₁ t ²	0,000004±0,000001	3,04			

Примечание к табл. 1, 2 и 3. t — продолжительность наблюдений, дни; X₀, X₁ — коэффициенты модели.

Таблица 2

Статистические характеристики параметров модели, описывающей количественные изменения отечности слизистой оболочки носа (P) у больных с хроническим полипозным риносинуситом после 5-дневного введения рекомбинантного интерферона (Интерфераль) в сочетании с γ-D-глутамил-L-триптофаном (Бестим)

Обозначения коэффициентов модели	Значения коэффициентов и их стандартная ошибка	t-критерий (Стьюдента)	F-критерий (Фишера)	Уровень значимости, p	Коэффициент детерминации, R ²
X ₀	2,075±0,214	9,68	41,80	<0,01	89,95
X ₁ t	0,009±0,003	3,53			
X ₁ sqrt(t)	-0,226±0,058	-3,92			
X ₁ exp(-t)	0,817±0,26	3,12			

Таблица 3

Статистические характеристики параметров модели, описывающей количественные изменения выраженности симптома выделения из носа (I) у больных с хроническим полипозным риносинуситом после 5-дневного введения рекомбинантного интерферона (Интерфераль) в сочетании с γ-D-глутамил-L-триптофаном (Бестим)

Обозначения коэффициентов модели	Значения коэффициентов и их стандартная ошибка	t-критерий (Стьюдента)	F-критерий (Фишера)	Уровень значимости, p	Коэффициент детерминации, R ²
X ₀	2,885±0,115	25,07	39,32	<0,01	89,39
X ₁ t	0,031±0,005	6,31			
X ₁ t ²	-0,00002±0,000007	-3,41			
X ₁ sqrt(t)	-0,467±0,053	-8,83			

лученными на основе выражения (3), составила r=0,835, уровень значимости p<0,05. Указанные коэффициенты корреляции и их уровень значимости позволяют сделать заключение о том, что модели (1), (2) и (3) с достаточной точностью определяют количественные изменения значений признаков (S), (P) и (I) от времени (t), прошедшего после введения препаратов. Графическая интерпретация выражений (1), (2) и (3) представлена на рис. 1, 2 и 3.

На рис. 1, 2 и 3 результаты моделирования количественных изменений признаков (S), (P) и (I) от времени (t) показывают, что выражения (1), (2) и (3) информационно способны и статистически значимы. Так, для модели (1) значения критерия Фишера (F), уровень значимости (p) и коэффициент детерминации (R²) составили: 238,45; <0,01; 92,59, соответственно. Для модели (2) значения

критерия Фишера (F), уровень значимости (p) и коэффициент детерминации (R²) составили: 41,80; <0,01; 89,95, соответственно. Для модели (3) значения критерия Фишера (F), уровень значимости (p) и коэффициент детерминации (R²) составили: 39,32; <0,01; 89,39, соответственно.

Представленная на рис. 1, а зависимость изменений признака (S) от (t) демонстрирует, что на фоне 5-дневного введения препаратов отмечается достаточно быстрая динамика снижения значений признака, которая достигает уровня порядка 1 балла и, далее, сохраняется на этом уровне в течение 365 дней (рис. 1, б). Это означает, что при исходном значении размеров полипа 2,2±0,2 балла инъекционное введение рекомбинантного интерферона (Интерфераль) в сочетании с γ-D-глутамил-L-триптофаном (Бестим) в полипозную ткань обеспечивают стабильный уровень ремис-

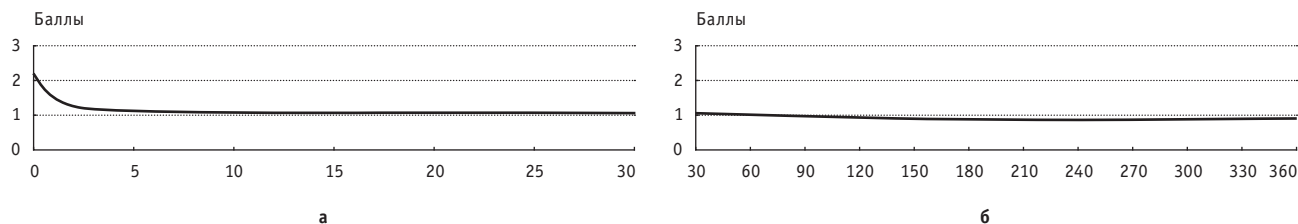


Рис. 1. Зависимость изменений размера полипа у больных с хроническим полипозным риносинуситом от 5-дневного инъекционного введения рекомбинантного интерферона (Интерфераль) в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном (Бестим) в интервале времени наблюдений от 0 до 30 дней (а) и от 30 до 365 дней (б)

По оси абсцисс — продолжительность наблюдения, дни. По оси ординат — размер полипа (S), баллы.

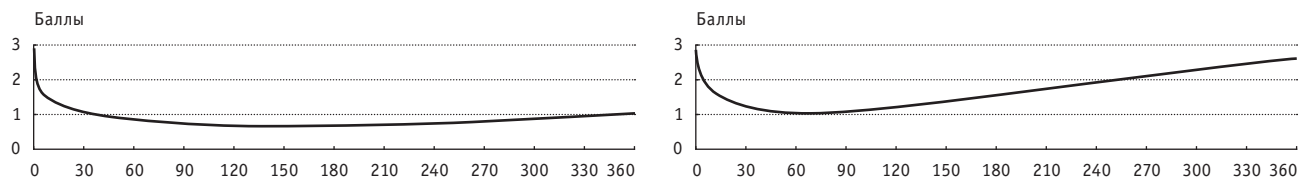


Рис. 2. Зависимость изменений отечности слизистой оболочки нижних носовых раковин у больных с хроническим полипозным риносинуситом от 5-дневного инъекционного введения рекомбинантного интерферона (Интерфераль) в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном (Бестим)

По оси абсцисс — продолжительность наблюдения, дни. По оси ординат — отечность слизистой оболочки нижних носовых раковин (P), баллы.

Рис. 3. Зависимость изменений выраженности симптома выделения из носа у больных с хроническим полипозным риносинуситом от 5-дневного инъекционного введения рекомбинантного интерферона (Интерфераль) в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном (Бестим)

По оси абсцисс — продолжительность наблюдения, дни. По оси ординат — выраженность симптома выделения из носа (I), баллы.

сии патологического процесса в течение одного года.

Представленная на **рис. 2** зависимость изменений признака (P) от (t) показывает, что на фоне 5-дневного введения препаратов в течение 150 дней наблюдается устойчивая динамика снижения отечности слизистой оболочки нижних носовых раковин и достигает уровня 0,65 баллов. Далее, в интервале времени наблюдений от 150-го до 365-го дня, происходит очень медленная динамика увеличения значений данного признака, которая к концу года достигает уровня порядка 1,0 балла. Это означает, что при исходном уровне признака (P) $2,8 \pm 0,4$ балла применение препаратов рекомбинантного интерферона (Интерфераль) в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном (Бестим) снижает отечность слизистой оболочки нижних носовых раковин до 0,65–1,0 балла и свидетельствует об эффективности консервативной терапии.

Представленная на **рис. 3** зависимость изменений признака (I) от (t) показывает, что на фоне 5-дневного введения препаратов в течение 60 дней отмечается быстрая динамика уменьшения выделения из носа с исходного уровня $2,9 \pm 0,3$ балла до 1,0 балла. Далее, в интервале времени с 60-го до 80-го дня, наблюдается непродолжительный период стабилизации данного показателя на уровне 1,0 балла, а затем, с 80-го дня исследования, отмечается повышение его значений, которые к концу периода наблюдений достигают исходного уровня. Это означает, что однократный курс вве-

дения препаратов рекомбинантного интерферона (Интерфераль) в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном (Бестим) обеспечивает только кратковременный эффект снижения данного признака. Возможно, что для достижения стабильного низкого уровня значений этого признака целесообразно назначение пациентам с ХПРС дополнительного 5-дневного курса введения указанных препаратов.

Исследованная динамика выраженности клинических симптомов ХПРС на основе оценки размеров полипозной ткани (S), отечности слизистой оболочки носа (P) и интенсивности выделений из носа (I) после проведенной консервативной иммунокорректирующей терапии показала, что количественные изменения этих симптомов имеют нелинейную зависимость от времени наблюдений (t). Для адекватной оценки изменений этих признаков оправдано применение нелинейных регрессионных уравнений, полученных в виде (1), (2), (3). С их помощью можно с достаточной точностью представить как медленную, так и быструю динамику количественных изменений признаков, а также определить временные интервалы, в которых отмечается стабильный уровень признака, его монотонное возрастание или уменьшение. Если использовать традиционный клинический подход для анализа этих симптомов, например, до начала лечения и после лечения, то линейные оценки указанных признаков не отражают реальную динамику их изменений как во время лечения, так и

в более длительный период наблюдений. Поэтому на основе традиционного клинического подхода невозможно провести надежную оптимизацию процесса лечения, например, назначение повторного курса терапии, изменение дозы препарата и т. д.

Полученные результаты демонстрируют, что рекомбинантный интерферон $\alpha 2b$ в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном являются патогенетически обоснованными средствами консервативного лечения больных с ХПРС с исходными показателями: распространенностью полипозного процесса на уровне $2,2 \pm 0,2$ балла; отечностью — на уровне $2,8 \pm 0,4$ балла; количеством отделяемого — на уровне $2,9 \pm 0,3$ балла. Однократное 5-дневное введение указанных препаратов оказывает позитивное влияние на выраженность изменений размеров полипозной ткани и отеčnosti слизистой носа в течение года наблюдений. Возможно, что эти эффекты связаны со снижением активности воспалительного и пролиферативного процесса слизистой оболочки носа и околоносовых пазух. При оценке динамики симптома выделения из носа показано, что увеличение выраженности этого признака происходит через 90 дней после иммунокорригирующего лечения, что свидетельствует о целесообразности повторного применения указанных препаратов и дальнейшей оптимизации консервативного лечения хронического полипозного риносинусита.

Результаты проведенных исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. Динамическая оценка изменений выраженности клинических симптомов хронического полипозного риносинусита на основе распространенности полипозного процесса (S), отеčnosti слизистой оболочки носа (P) и интенсивности выделений из носа (I) имеет нелинейную направленность и, соответственно, должна базироваться на построении нелинейных моделей, обеспечивающих получение более реалистичной картины изменений этих признаков во время и после лечения.

2. Консервативная терапия хронического полипозного риносинусита на основе рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном дает позитивный лечебный эффект, который сопровождается выраженным снижением указанных клинических симптомов данного заболевания в течение года.

3. Дальнейшая оптимизация консервативного иммунокорригирующего лечения хронического полипозного риносинусита на основе рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном должна базироваться на включении в лечебный процесс дополнительных 5-дневных курсов введения указанных препаратов и динамической оценке изменений симптомов заболевания на более продолжительных сроках наблюдений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дрейпер Н.Р., Смит Г. Прикладной регрессионный анализ. (Пер. с англ.). М., Издательский дом «Вильямс». 2016. 912 с. ISBN 978-5-8459-0963-3, ISBN ENG 0-471-17082-8.
Draper N.R., Smith H. Applied Regression Analysis, 3rd Edition. New York: John Wiley Sons, 1998.
2. Карпищенко С.А., Баранская С.В. Терапия хронического верхнечелюстного синусита // Эффективная фармакотерапия. 2016. № 20. С. 10–13.
Karpishchenko S.A., Baranskaya C.V. [Therapy of chronic maxillary sinusitis] // Effectivnaia Farmakoterapiia. 2016. № 20. P. 10–13. Russian.
3. Кривопалов А.А. Риносинусит: классификация, эпидемиология, этиология и лечение // Медицинский совет. 2016. № 6. С. 22–25.
Krivopalov A.A. [Rhinosinusitis: classification, epidemiology, etiology and treatment] // Meditsinskii Sovet. 2016. № 6. P. 22–25. Russian.
4. Савлевич Е.Л. Клинико-иммунологическая характеристика применения новых аэрозольных форм рекомбинантных цитокинов для лечения больных с острыми назофарингитами: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. СПб., 2010. 23 с.
Savlevich E.L. [Clinical and immunological characteristics of the new aerosol formulations of recombinant cytokines for the treatment of patients with acute nasopharyngitis]: Abstract of Dissertation for the degree of Candidate of Med. Sciences. St. Petersburg, 2010. 23 p. Russian.
5. Шабалдина Е.В. Нарушения системной и локальной иммунной регуляции при гипертрофии миндалин лимфоидного глоточного кольца у детей раннего и дошкольного возраста: Автореф. дисс. ... д-ра. мед. наук. СПб., 2016. 43 с.
Shabal'dina E.V. [Disturbance of systemic and local immune regulation in hypertrophy of tonsils of lymphoid pharyngeal ring in children of early and preschool age]: Abstract of Dissertation for the degree of Doctor of Med. Sciences. St. Petersburg, 2016, 43 p. Russian.
6. Avdeeva K., Fokkens W. Precision medicine in chronic rhinosinusitis with nasal polyps // Curr. Allergy Asthma Rep. 2018. Vol. 18. № 4. P. 25. doi.org/10.1007/s11882-018-0776-8.
7. Bachert C., Pawankar R., Zhang L., Bunnag C., Fokkens W.J., Hamilos D.L., Jirapongsananuruk O., Kern R., Meltzer E.O., Mullol J., Naclerio R., Pisan R., Rhee C.S., Suzuki H., Voegels R., Blaiss M. ICON: chronic rhinosinusitis // World Allergy Organ. J. 2014. Vol. 7. № 1. P. 25. doi: 10.1186/1939-4551-7-25.
8. De Greve G., Hellings P.W., Fokkens W.J., Pugin B., Steelant B., Seys S.F. Endotype-driven treatment in chronic upper airway diseases // Clin. Transl. Allergy. 2017. Vol. 7. P. 22. doi: 10.1186/s13601-017-0157-8.
9. Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Baroody F., Cohen N., Cerwin A., Douglas R., Gevaert P., Georgalas C., Goossens H., Harvey R., Hellings P., Hopkins C., Jones N., Joos G., Kalogjera L., Kern B., Kowalski M., Price D., Riechelmann H., Schlosser R., Senior B., Thomas M., Toskala E., Voegels R., Wang de Y., Wormald P.J. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists // Rhinology. 2012. Vol. 50. № 1. P. 1–12. doi: 10.4193/Rhino50E2.
10. Khan W.A. Recombinant interferon alpha 2b in rheumatoid arthritis: good antigen for rheumatoid arthritis antibodies // Cent. Eur. J. Immunol. 2018. Vol. 43. № 1. P. 58–68. doi: 10.5114/cej.2018.74874.
11. Rudmik L., Schlosser R.J., Smith T.L., Soler Z.M. Impact of topical nasal steroid therapy on symptoms of nasal polyposis: a meta-analysis // Laryngoscope. 2012. Vol. 122. № 7. P. 1431–1437. doi: 10.1002/lary.23259.
12. Schleimer R.P. Immunopathogenesis of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis // Annu. Rev. Pathol. 2017 Vol. 12. P. 331–357. doi: 10.1146/annurev-pathol-052016-100401.

Applying of recombinant interferon $\alpha 2b$ (Interferal), and γ -D-glutamyl-L-tryptophan in treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps

*E.V. Bezrukova¹, V.G. Konusova²,
E.V. Vorobeychikov³, A.S. Simbirtsev^{2, 4}*

¹I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg;

²State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg;

³"Polifarm" Ltd., St. Petersburg;

⁴Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg

The efficacy of recombinant interferon $\alpha 2b$ (Interferal) and γ -D-glutamyl-L-tryptophan (Bestim) for conservative treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRS with NP) was evaluated. Recombinant interferon $\alpha 2b$ at a dose of 1 million units, and γ -D-glutamyl-L-tryptophan at a dose of 0.1 mg were administered into nasal polyps for five days. To assess the results of the study, regression analysis was used to compare the following clinical signs: size of polypous tissue; the swelling of the mucous membrane and intensity of the secretions from the nose. It was shown that conservative therapy of CRS with NP based on the introduction of recombinant interferon $\alpha 2b$ with γ -D-glutamyl-L-tryptophan into polypous tissue gives a positive therapeutic effect, which is accompanied by a marked decrease in the size of polypous tissue, swelling of the mucosa and nasal secretions during the year. (Cytokines and Inflammation. 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 97–102.)

Key words: chronic rhinosinusitis with nasal polyps, interferon $\alpha 2b$,
 γ -D-glutamyl-L-tryptophan.

Иммуноориентированная терапия в комплексном лечении острого панкреатита

*М.М. Абдурахманов, Ш.Т. Ураков,
С.С. Сафаров, Г.Н. Кулдашев*

Бухарский Государственный медицинский институт,
Бухарский филиал Республиканского научного центра экстренной
медицинской помощи, Республика Узбекистан

Изучены иммуноориентированные эффекты полиоксидония и иммуномодулина в комплексной терапии больных с острым панкреатитом (ОП). У больных с ОП с первых дней заболевания выявлены нарушения иммунного статуса в виде развития иммунодефицита. Комплексная терапия, включающая иммуномодулин или полиоксидоний, позволила приближению уровня цитокинов к показателям здоровых доноров. Результаты исследования позволяют рекомендовать включение в базисную, комплексную консервативную терапию больных с ОП полиоксидоний и иммуномодулин с целью иммуноориентированной терапии. (Цитокины и воспаление. 2019. Т. 18. № 1–4. С. 103–107.)

Ключевые слова: острый панкреатит, иммунокоррекция, иммуномодулин, полиоксидоний.

Острый панкреатит (ОП) представляет собой деструктивный процесс ткани поджелудочной железы различной степени выраженности. Рассматривая ОП как эволюционирующий во времени процесс, по ходу которого наблюдается закономерная смена периодов и фаз заболевания, можно выделить ряд осложнений, типичных как для фазы панкреатогенной токсемии, так и для фазы деструктивных осложнений. Синдром системной воспалительной реакции (ССВР) может иметь место в любую фазу течения панкреатита и быть основным синдромом, в то время как его патогенетическую основу будут определять совершенно разные механизмы [12, 14]. В общих чертах ССВР — абсолютная нормальная реакция на инвазию. Однако вследствие сверхактивности происходящих процессов ССВР может поставить под угрозу функционирование различных органов и систем, что приводит к синдрому полиорганной недостаточности [7, 8]. На сегодняшний день

известно, что ведущую роль в патогенезе ОП играют медиаторы воспаления: провоспалительные цитокины, такие как IL-1, IL-6, IL-8 и TNF α [1, 10]. Результатами их влияния являются увеличение сосудистой проницаемости, миграция лейкоцитов, локальное повреждение тканей, генерализация воспалительной реакции, повреждение органов естественной детоксикации с развитием полиорганной недостаточности [2, 9]. Когда иммунная система борется против инфекционных агентов, цитокины сигнализируют иммунным клеткам, таким как Т-лимфоциты и макрофаги, чтобы они направились в участок инфекции. В дополнение цитокины стимулируют клетки к еще большей продукции цитокинов. Эта положительная обратная связь становится бесконтрольной, и слишком много активированных иммунных клеток накапливается в одном месте. Таким образом, становится понятным механизм, посредством которого выброс большого количества цитокинов способствует прогрессированию тяжелого ССВР при ОП [13]. Использование препаратов с имму-

Абдурахманов Мамур Мустафаевич, e-mail: abdurakhmanov@mail.ru

нотропной активностью у больных с ОП открыло новые возможности для повышения эффективности проведения консервативной терапии, оперативных вмешательств больных с ОП, уменьшения летальности и сроков пребывания в стационаре [3–5]. Большой интерес представляют такие препараты, как полиоксидоний (синтетический гетероцепный алифатический полиамин) и иммуномодулин — препарат полипептидной природы. Первый обладает выраженной иммуномодулирующей, детоксикационной, мембраностабилизирующей и антиоксидантной активностью, снижает цитотоксичность химических, лекарственных веществ и инфекционных агентов. Применение полиоксидония в комплексном лечении ряда хирургических заболеваний позволяет повысить эффективность терапии, снизить дозу антибактериальных средств, сократить длительность лечения [5]. Иммуномодулин — отечественный иммуностимулятор (ООО «Immunomed», Республика Узбекистан), в виде раствора для инъекций 0,01 % 1 мл, который содержит комплекс высококачественных природных тимусных пептидов или их аналогов 100 мкг. Представляя комплекс высококачественных природных тимусных пептидов или их аналогов, иммуномодулин корректирует функции иммунной системы, стимулирует продукцию эндогенного интерферона, систему детоксикации в печени, процессы регенерации, эритро- и лейкопоэза, восстанавливает биоритмы иммунной системы. При вторичных иммунодефицитных состояниях иммуномодулин восстанавливает содержание в крови Т-лимфоцитов, Т-супрессоров, Т-хелперов, фагоцитов и снижает интенсивность клеточных иммунных реакций, направленных против собственных органов и тканей, стимулирует иммунный ответ против инфекционных агентов (вирусов, грибов, бактерий, паразитов), процессы детоксикации в печени, а также регенерацию тканей организма. Препарат совместим с антибиотиками и другими препаратами базисной терапии. Иммунотерапия является необходимым компонентом лечебной терапии острого панкреатита наряду с базисной терапией.

Цель работы — изучение иммуноориентированных эффектов полиоксидония и иммуномодулина в комплексной терапии больных с ОП.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 82 пациента (45 мужчин и 37 женщин) с ОП, комплексное клиничко-лабораторно-инструментальное обследование и лечение которых проводили в условиях хирургического отделения Бухарского филиала РНЦЭМП Республики Узбекистан. Длительность заболевания до момента госпитализации варьировала от нескольких часов до 3 суток. Клиничко-лабораторные признаки ССВР были

выявлены при первичном осмотре у 5 больных с отечной формой ОП и у всех больных с острым деструктивным панкреатитом (ОДП). Лечение всех больных проводили с включением антисекреторной (контривер, октреотид, квамател) и инфузионной терапии. В соответствии с общепринятой классификацией больные были распределены на 3 рандомизированные по полу, возрасту и проводимому лечению группы. 1-ю группу составили 26 пациентов (17 — с отечным панкреатитом и 9 — с мелкоочаговым панкреонекрозом), получавших лечение (инфузионная терапия со спазмолитиками и анальгетиками; блокаторы H₂-гистаминовых рецепторов — квамател; антибактериальная терапия — цефеперазон-сульбактам, амикацин), не включавшее иммунокорректирующих препаратов. 2-ю группу — 28 пациентов (19 — с отечным панкреатитом и 9 — с мелкоочаговым панкреонекрозом), дополнительно получавших полиоксидоний (100 мг внутримышечно 10 раз, через 24 ч). В 3-ю группу были включены 28 больных (19 — с отечным панкреатитом и 9 — с мелкоочаговым панкреонекрозом), которые в составе комплексного лечения получали иммуномодулин (по 100 мкг внутримышечно, одна инъекция ежедневно, всего 10 инъекций, в суточной дозе 1,0–1,5 мкг/кг). Контрольная группа пациентов состояла из 20 здоровых доноров-добровольцев того же возраста.

В работе исследован иммунный статус больных и здоровых лиц с помощью наборов тестов I и II уровней по Р.В. Петрову. Фенотип лимфоцитов определяли методом иммуноферментного анализа с помощью моноклональных антител (ООО «Сорбент», г. Москва) к структурам CD3 (общие Т-лимфоциты), CD22 (В-лимфоциты), CD4 (Т-хелперы), CD8 (цитотоксические клетки), CD16 (NK-клетки), CD25 (рецептор к IL-2). Содержание иммуноглобулинов классов IgM, IgG, IgA — радиальной иммунодиффузией. Определение содержания в сыворотке периферической крови цитокинов (TNF α , IL-1, IL-6, IL-4) проводили до начала лечения, на 1-е–3-и сутки, 4–7-е сутки, позднее 7 суток при консервативной терапии отечной формы ОП и в те же сроки после операции при ОДП. Определение уровней цитокинов проводили в лаборатории иммунологии репродукции Института иммунологии и геномики человека АН Республики Узбекистан методом иммуноферментного анализа с применением реагентов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования иммунного статуса больных с ОП показали, что до лечения достоверно сниженным было абсолютное и относительное содержание общих Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперной (CD4⁺) и цитотоксической (CD8⁺) субпопуляций, относительное содержание NK-клеток (CD16⁺). Повышенным был процент клеток, экспрессирующих ранние (CD25⁺) маркеры активации, а также относительный и абсолютный уровень В-лимфоцитов (CD22⁺) (табл. 1).

На фоне традиционного лечения установлено повышение процентного и абсолютного числа общих Т-лимфоцитов даже по сравнению со здоро-

Таблица 1

Показатели клеточного звена иммунитета в периферической крови больных с острым панкреатитом (% , $M \pm m$)

Группы больных	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD16 ⁺	CD25 ⁺	CD22 ⁺
Контроль	20	24,3 $\pm$ 2,5	38,1 $\pm$ 3,1	22,1 $\pm$ 2,3	11,6 $\pm$ 2,2	13,8 $\pm$ 1,4	21,4 $\pm$ 1,8
Больные с острым панкреатитом	82	16,7 $\pm$ 2,3	24,1 $\pm$ 2,5	16,9 $\pm$ 2,1	7,9 $\pm$ 1,3	29,2 $\pm$ 1,2	39,1 $\pm$ 2,4

Таблица 2

Показатели клеточного звена иммунитета в периферической крови больных с острым панкреатитом в результате иммуноориентированной терапии (% , $M \pm m$)

Группы больных	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD16 ⁺	CD25 ⁺	CD22 ⁺
Традиционное лечение	26	23,8 $\pm$ 2,6	39,3 $\pm$ 2,1	23,7 $\pm$ 2,6	11,8 $\pm$ 2,4	13,4 $\pm$ 1,2	21,9 $\pm$ 1,6
Традиционное лечение + иммуномодулин	28	24,6 $\pm$ 2,2	30,1 $\pm$ 2,7	22,9 $\pm$ 2,3	12,9 $\pm$ 1,3	13,2 $\pm$ 1,2	19,9,1 $\pm$ 2,4
Традиционное лечение + полиоксидоний	28	23,6 $\pm$ 2,3	38,7 $\pm$ 3,3	22,6 $\pm$ 2,5	10,3 $\pm$ 1,4	12,3 $\pm$ 1,4	22,8 $\pm$ 2,9

выми донорами, нормализация содержания CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, при этом уровни CD16⁺, CD25⁺, CD22⁺ лимфоцитов оставались такими же, как и у больных до лечения (табл. 2).

Применение иммуномодулина нормализовало относительный и абсолютный уровни CD3⁺ клеток, абсолютное количество В-лимфоцитов и процентное содержание Т-хелперов, NK-клеток и клеток, экспрессирующих ранние маркеры активации. При этом сниженным, даже по сравнению с традиционным лечением, оставалось абсолютное содержание CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, а процентные уровни Т-хелперов и В-лимфоцитов были такими же, как и после традиционного лечения (см. табл. 2).

После применения полиоксидония относительное и абсолютное содержание CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD22⁺ клеток не отличалось от показателей здоровых доноров, исключение составляли CD16⁺ и CD25⁺ лимфоциты, уровни которых были ниже, чем в контрольной группе (см. табл. 2).

На момент поступления в стационар, а также после применения различных схем лечения, концентрация IgM достоверно не изменялась. Содержание IgG, IgA было повышенным. Традиционная терапия снижала уровень IgG и повышала концентрацию IgA по сравнению с показателями больных до лечения, но при этом нормализации показателей после лечения не происходило. Включение иммуномодулина в комплексную консервативную терапию снижало до уровня здоровых доноров концентрацию IgG, содержание IgA изменялось так же, как и в группе больных, получавших традиционное лечение. Полиоксидоний нормализовал концентрации IgG, IgA.

На момент поступления у больных с ОП обнаружено существенное повышение в плазме кро-

ви уровня основной доминирующей секреторной формы IL-1, а именно, IL-1 β (в 2,1 раза), который является основным медиатором развития местной воспалительной реакции, острофазного ответа на уровне организма [9].

Традиционное лечение и лечение с включением иммуномодулина не изменяли повышенный уровень плазменного IL-1. Нормализация показателя происходила только под влиянием полиоксидония (табл. 3).

Еще в большей степени у больных с ОП повышался (в 5,6 раза) уровень TNF α — первичного медиатора воспаления, играющего значительную роль в координации воспалительного ответа и цитокинового каскада, включая IL-1, IL-6 и IL-4. Традиционное лечение почти на 50 % снижало концентрацию TNF α , применение иммуномодулина аналогичным образом влияло на изученный показатель; более эффективным оказался полиоксидоний, на фоне применения которого концентрация TNF α снижалась в большей степени, но не до уровня здоровых доноров. Выявлено повышение IL-6 в плазме крови больных на момент поступления в 2,6 раза. Традиционное лечение снижало его содержание, но не до уровня контрольной группы. В группах больных, получавших в составе комплексной терапии иммуномодулин и полиоксидоний, концентрация IL-6 нормализовалась (см. табл. 3). Многочисленные биологические функции IL-4 включают индукцию переключения продукции иммуноглобулинов плазматическими клетками на продукцию IgE и стимуляцию субпопуляции Т-хелперов (Th2) второго типа. В наших наблюдениях уровень IL-4 у больных с ОП на момент поступления был выше в 4,2 раза, чем у здоровых доноров. Так же как и в предыдущих случаях, после традиционного лечения

Таблица 3

Содержание цитокинов периферической крови у больных с острым панкреатитом в динамике комплексной и иммуноориентированной терапии (пг/мл, M ± m)

Группы больных	n	Цитокины			
		TNFα	IL-1	IL-6	IL-4
До лечения	82	62,2±2,0	65,8±1,2	43,5±8,7	58,7±1,2
Традиционное лечение	26	32,2±0,5	56,9±1,40	29,7±1,1	36,5±1,4
Традиционное лечение + иммуномодулин	28	23,1±1,4	45,1±0,2	18,2±9,8	16,8±1,2
Традиционное лечение + полиоксидоний	28	18,1±1,2	35,1±0,2	17,2±9,8	14,9±1,4
Контроль	20	10,9±0,5	32,1±0,2	16,3±0,6	14,2±4,5

концентрация снижалась, но не до уровня нормы; после комплексной терапии, включавшей иммуномодулин или полиоксидоний, уровень цитокина не отличался от показателей здоровых доноров (см. табл. 3).

Таким образом, у больных с острым панкреатитом обнаружены значительные нарушения иммунного статуса. Полученные данные во многом перекликаются с работами ряда авторов и вписываются в картину системного воспалительного ответа [11, 13, 14]. Результаты наших исследований позволяют рекомендовать включение в базисную, комплексную консервативную терапию больных с острым панкреатитом, полиоксидоний и иммуномодулин с целью иммуноориентированной терапии.

Выводы

- 1. При остром панкреатите патологические изменения в органах и системах носят генерализованный характер и проявляются синдромом системной воспалительной реакции.
- 2. У больных с острым панкреатитом с первых дней заболевания выявляются нарушения иммунного статуса в виде развития иммунодефицита.
- 3. Полученные результаты исследований позволяют нам рекомендовать включение в базисную, комплексную консервативную терапию больных с острым панкреатитом полиоксидоний и иммуномодулин с целью иммуноориентированной терапии и контроля над синдромом системной воспалительной реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аверкиев В.Л., Тарасенко В.С., Латышева Т.В., Проскуряков В.Е., Аверкиева Л.В. Изменения некоторых иммунологических показателей при панкреонекрозе и их коррекция // Хирургия. 2003. № 5. С. 31–34.
Averkiev V.L., Tarasenko V.S., Latysheva T.V., Proskuryakov V.E., Averkieva L.V. [Changes of immune indices in pancreonecrosis and their correction] // Khirurgiya. Zhurnal imeni N.I. Pirogova. 2003. № 5. P. 31–34. Russian.

2. Благовестнов Д.А., Бердников Г.А., Боровкова Н.В., Гришин А.В., Ермолов А.С., Иванов П.А., Новосёл С.Н., Хватов В.Б. Прогностическая значимость параметров иммунного ответа в лечении больных острым панкреатитом // Вестник новых медицинских технологий. 2006. Т. 13. № 1. С. 67–69.
Blagovestnov D.A., Berdnikov G.A., Borovkova N.V., Grishin A.V., Ermolov A.S., Ivanov P.A., Novosel S.N., Khvatov V.B. Significantly prognostic parameters of immune response in the management of severe acute pancreatitis // Journal of New Medical Technologies. 2006. Vol. 13. № 1. P. 67–69. Russian.

3. Булава Г.В., Абакумов М.М., Боровкова Н.В., Хватов В.Б., Годков М.А. Оценка тяжести иммунных расстройств и прогнозирование развития гнойно-септических осложнений у пациентов с неотложной хирургической патологией // Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. 2009. Т. 168. № 3. С. 10–16.
Bulava G.V., Abakumov M.M., Borovkova N.V., Khvatov V.B., Godkov M.A. Evaluation of severity of immune disorders and prognosis of the development of pyo-septic complications in patients with emergency surgery pathology // Grekov's Bulletin of Surgery. 2009. Vol. 168. № 3. P. 10–16. Russian.

4. Боровкова Н.В. Вторичный иммунодефицит при гнойно-септических осложнениях хирургических заболеваний: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М., 2011. 49 с.
Borovkova N.V. [Secondary immunodeficiency in purulent-septic complications of surgical diseases]: Dissertation for the Degree of Dr. Med. Sci. Abstract. Moscow. 2011. 49 p. Russian.

5. Ермолов А.С., Боровкова Н.В., Иванов П.А., Гришин А.В., Благовестнов Д.А., Хватов В.Б. Иммунологическая оценка тяжести и прогноза острого панкреатита // Вестн. хирургии им. И. И. Грекова. 2005. Т. 164. № 6. С. 22–28.
Ermolov A.S., Borovkova N.V., Ivanov P.A., Grishin A.V., Blagovestnov D.A., Khvatov V.B. [Immunological assessment of severity and prognosis of acute pancreatitis] // Grekov's Bulletin of Surgery. 2005. Vol. 164. № 6. P. 22–28. Russian.

6. Толстой А.Д., Попович А.М. Иммунные нарушения и методы иммуноориентированной перапии при остром деструктивном панкреатите // Terra medica. 2003. № 4. С. 28–31.
Tolstoy A.D., Popovich A.M. [Immune disorders and methods of immuno-oriented therapy in acute destructive pancreatitis] // Terra medica. 2003. № 4. P. 28–31.

7. Свистунов Н.Н., Ивлев В.В. О возможности прогнозирования исходов острого панкреатита с тяжелым течением // Вестник Санкт-Петербургского Университета, Медицина. 2009. № 3. С. 135–142.
Svistunov N.N., Ivlev V.V. [About the opportunity of forecasting of outcomes of the sharp pancreatitis] // Vestnik of Saint Petersburg University. Medicine. 2009. № 3. P. 135–142. Russian.

8. Литвин А.А. Современные возможности прогнозирования инфекционных осложнений тяжелого панкреатита (обзор литературы) // Вестник Санкт-Петербургского Университета. Сер. 11. 2009. Вып. 3. С. 127–134.
Litvin A.A. [Modern possibilities of predicting infectious complications of severe acute pancreatitis (review of literature)] // Vestnik of Saint Petersburg University. Medicine. Ser. 11. 2009. № 3. P. 127–134. Russian.

9. Шильяев А.В. Прогнозирование гнойных осложнений при остром деструктивном панкреатите с учетом иммунных нарушений и их коррекция: дисс. ... канд. мед. наук. Военно-медицинская академия. Санкт-Петербург, 2007. 112 с.
Shilyaev A.V. [Prediction of purulent complications in acute destructive pancreatitis taking into account immune disorders and their correction]: Dissertation for the Degree of Candidate of Med. Sciences. Military Medical Academy. St. Petersburg, 2007. 112 p. Russian.

10. Hietaranta A., Mustonen H., Puolakkainen P., Haapiainen R., Kemppainen E. Proinflammatory effects of pancreatic elastase are mediated through TLR4 and NF- κ B // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Vol. 323. № 1. P. 192–196. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.077.
11. Li H.G., Zhou Z.G., Li Y., Zheng X.L., Lei S., Zhu L., Wang Y. Alterations of Toll-like receptor 4 expression on peripheral blood monocytes during the early stage of human acute pancreatitis // *Dig. Dis. Sci.* 2007. Vol. 52. № 8. P. 1973–1978. doi:10.1007/s10620-006-9211-4.
12. Kylänpää-Bäck M.L., Takala A., Kemppainen E., Puolakkainen P., Kautiainen H., Jansson S.E., Haapiainen R., Repo H. Cellular markers of systemic inflammation and immune suppression in patients with organ failure due to severe acute pancreatitis // *Scand. J. Gastroenterol.* 2001. Vol. 36. № 10. P. 1100–1107. doi:10.1080/003655201750422738.
13. Ulloa L., Tracey K.J. The 'cytokine profile': a code for sepsis // *Trends Mol. Med.* 2005. Vol. 11. № 2. P. 56–63. doi: 10.1016/j.molmed.2004.12.007.
14. Weber C.K., Adler G. From acinar cell damage to systemic inflammatory response: current concepts in pancreatitis // *Pancreatology.* 2001. Vol. 1. № 4. P. 356–362. doi: 10.1159/000055834.

The use of immunocorrectors in complex therapy of acute pancreatitis

M.M. Abdurakhmanov, Sh.T. Urakov, S.S. Safarov, G.N. Kuldashv

Bukhara State Medical Institute, Bukhara Branch of Republican Scientific Center
for Emergency Medicine, Republic of Uzbekistan

The immuno-oriented effects of polyoxidonium and immunomodulin in the complex treatment of patients with acute pancreatitis were studied. In patients, from the first days of the disease, changes in the immune status in the form of the development of immunodeficiency were detected. Complex therapy, including immunomodulin or polyoxidonium, allowed approximation of cytokine levels to those of healthy donors. The results of the study make it possible to recommend the addition of polyoxidonium and immunomodulin to the basic, comprehensive conservative therapy of patients with acute pancreatitis for the purpose of immuno-oriented therapy. (*Cytokines and Inflammation.* 2019. Vol. 18. № 1–4. P. 103–107.)

Key words: acute pancreatitis, immunocorrection, immunomodulin, polyoxidonium.



Академик Корнева Елена Андреевна (к 90-летию со дня рождения)

Елена Андреевна Корнева родилась 5 декабря 1929 г. в городе Кзыл-Орда. В 1953 г. окончила 1-й Ленинградский медицинский институт им. акад. И.П. Павлова, в 1956 г. — аспирантуру при кафедре физиологии. В 1956–1975 г. — младший, затем старший научный сотрудник отдела экологической физиологии Института экспериментальной медицины. С 1975 г. — руководитель лаборатории нейрогуморальной регуляции специфической резистентности, в 1982–2014 г. — руководитель отдела общей патологии и патофизиологии Института. В настоящее время — главный научный сотрудник отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ». С 1995 г. — профессор кафедры патологии Медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета.

Член-корреспондент РАМН с 1986 г., академик РАМН с 1997 г., академик РАН с 2013 г. — Отделение медицинских наук.

Академик Е.А. Корнева — один из основателей новой научной дисциплины — нейроиммунофизиологии, развитие которой было в немалой степени инициировано сделанным ею открытием о влиянии определенной структуры мозга на интенсивность иммунного ответа. Свойство гипоталамических структур мозга при повреждении угнетать, а при раздражении — стимулировать иммунный ответ — было открыто Е.А. Корневой и Л.М. Хай в 1961 г. Эти работы положили начало новому направлению, которое сформировалось и выросло в научную дисциплину — нейроиммунофизиологию (психонейроиммунологию). В изданной в США книге «Основы психонейроиммунологии» (1986) Е.А. Корнева — международно признанный основоположник этой научной дисциплины.

Е.А. Корнева разработала концепцию многоуровневой иерархической организации системы нейрогуморальной регуляции иммунологических процессов. Весомый вклад в развитие научных знаний в этой области связан с исследованием механизмов реакции центральной нервной системы на антигенный стимул, выявлением закономерностей вовлечения определенных структур мозга в процесс реализации иммунного ответа.

Важнейшим шагом в изучении проблемы являются результаты, продемонстрировавшие участие орексин-содержащих нейронов гипоталамуса в механизмах реализации нейроиммунных взаимодействий, что впервые позволило констатировать связь орексин-содержащих нейронов А и В типов с процессом реализации ответов мозга на антигенный стимул, показать изменение этих реакций при стрессе и димиелинизирующих про-

цессах. Ею предложены новые методы прогнозирования развития заболеваний, вызванных нарушением нейроиммунных взаимодействий. Применение этих методов в клинической практике открывает реальные перспективы разработки новых способов лечения.

Е.А. Корнева — организатор многих отечественных и международных научных форумов. Начиная с 2007 по 2019 г. в Санкт-Петербурге совместно с Институтом нейробиологии Общества Макса Планка (Германия) проведено 8 международных симпозиумов «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии», которые определили новые пути развития нейроиммунофизиологии. Она — один из основателей двух международных научных обществ: «Neuroimmunomodulation» и «Psychoneuroimmunology», а также международных журналов «Neuroimmunomodulation», «Brain, Behavior and Immunity».

Е.А. Корнева — руководитель крупной научной школы, она воспитала известных ученых, которые возглавляют научные подразделения в России и зарубежных странах — ею подготовлено 13 докторов и 37 кандидатов наук.

Автор более 470 публикаций, в т. ч. 7 монографий, свидетельства на открытие (диплом № 69, 1970 г.), автор и редактор научного «Руководства по Нейроиммунофизиологии» и книги «NeuroImmune Biology. Vol. 6: Cytokines and the Brain», Elsevier, 2008. Соредактор журнала «Патогенез»; входила и входит в состав редколлегии журналов «Advances in Neuroimmune Biology», «Integrative Immunobiology and Vaccines», «Медицинский академический журнал», «Медицинская иммунология», «Клиническая патофизиология», «Цитокины и воспаление». В 1986–2014 г. была председателем Санкт-Петербургского отделения Общества иммунологов.

Почетный Директор Фонда по психонейроиммунологии (США, 1993–1996), член Нью-Йоркской академии наук, почетный член Общества патофизиологов Японии.

Заслуженный деятель науки РФ. Награждена орденом «Знак Почета», орденом Дружбы, Знаком «Отличник здравоохранения». Удостоена Золотой медали Российского иммунологического общества. Отмечена дипломом Международного научного Общества по нейроиммуномодуляции (ISNIM) за служение человечеству. Лауреат премии принца Ольденбургского — за цикл работ в области иммунофизиологии.

Руководимая ею лаборатория удостоена Бронзового знака, как показательная лаборатория мира.

Александр Анатольевич Смородинцев (к 90-летию со дня рождения)

Доктор медицинских наук (1970), профессор (1971), член-корреспондент (1994), действительный член Петровской Академии наук и искусств Санкт-Петербурга (2002)



Александр Анатольевич Смородинцев родился 27 декабря 1929 г. в семье врачей. В 1941 г. перед началом Великой Отечественной войны он окончил 4-й класс. Во время блокады Ленинграда в 1941–1942 г. вместе со сверстниками защищал от немецких зажигательных бомб здания Института акушерства и гинекологии им. Отта, где жил вместе с матерью, Смородинцевой Татьяной Владимировной, которая с начала войны работала врачом-психиатром в Госпитале на 14-й линии Васильевского острова. В октябре 1942 г., вместе с матерью, был эвакуирован из Ленинграда в Москву. Там окончил с серебряной медалью 10-й класс средней школы и в 1948 г. возвратился с родителями в Ленинград.

В 1954 г. окончил 1-й Ленинградский медицинский институт им. И.П. Павлова с дипломом «врача-лечебника» по специальностям «терапия», «хирургия», «акушерство» со специализацией по «инфекционным болезням» и был направлен в аспирантуру Центрального рентгено-радиологического института МЗ СССР. В 1958 г. защитил кандидатскую диссертацию на тему «Развитие экспериментальных вирусных инфекций и иммунитет у животных на фоне лучевой болезни». В этот период принимал участие в разработке живой вакцины против полиомиелита на базе отдела вирусологии Института экспериментальной медицины (ИЭМ) Академии медицинских наук СССР, где выполнял часть своей диссертационной работы.

В 1959 г. избран по конкурсу на должность старшего научного сотрудника в лабораторию гриппа НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Разработал методику получения новых культур тканей из почек эмбрионов человека для выделения мало известных тогда парогриппозных вирусов, установив их высокую значимость среди ОРВИ у детей в Ленинграде.

В 1962 г. избран старшим научным сотрудником в отдел вирусологии ИЭМ АМН СССР, где разработал методы культивирования почти неизвестного в то время вируса гепатита В. Тогда же, впервые в СССР, Ал.А. Смородинцев организовал цикл работ по исследованию недавно открытого интерферона.

В 1967 г. Ал.А. Смородинцев стал одним из организаторов Всесоюзного НИИ Гриппа Министерства здравоохранения СССР, где возглавил лабораторию интерферона. В связи с этими исследованиями в 1967–1968 г. получил стипендию от Wellcome Research Foundation для работы в г. Солсбери (Англия) в Центре по изучению простудных заболеваний (Common Cold Research Unit). На людях-волонтерах с экспериментальными гриппозными, риновирусными и парогриппозными инфекциями проводил оценку формирования интерферона. Находясь по одному месяцу в лабораториях фирм Imperial Chemical Industries и Glaxo Laboratories, провел количественные биохимические исследования интерферона в образцах, полученных ранее от волонтеров.

В 1970 г. Ал.А. Смородинцев защитил докторскую диссертацию, посвященную новому направлению в науке — индукции интерферона у людей и различным группам индукторов интерферона в ходе эпидемий гриппа в нашей стране. В 1971 г. ему присвоено ученое звание профессора.

В 1976 г. приказом МЗ СССР переведен из ВНИИ гриппа в Ленинградский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и назначен руководителем лаборатории детских вирусных инфекций. Руководил работами по созданию, совершенствованию и внедрению в практику вакцин против кори, паротита и краснухи. Обосновал целесообразность коревой ревакцинации, которая при поддержке ГИСК им. Л.А. Тарасевича была введена с 1986 г. в нашей стране как обязательная для всех детей перед поступлением в школу. Это снизило 10-кратно заболеваемость корью в России. Затем были проведены работы по восстановлению и испытаниям нового коревого вакцинного штамма «Л-16», который заменил в 1993 г. старую ослабевшую вакцину. Это привело тогда почти к полной ликвидации кори в России.

Под руководством Ал.А. Смородинцева был восстановлен краснушный штамм «Орлов», созданный ранее Валентиной Николаевной Мешаловой под руководством академика Анатолия Александровича Смородинцева (отца Александра Анатольевича). На основе штамма «Орлов» был создан и испытан новый штамм для краснушной вакцины «АВ-1», депонированный в 1991 г. в государственную коллекцию Института вирусологии им. Д.И. Ивановского.

В 1978 г. Ал.А. Смородинцеву удалось спасти от уничтожения вакцину против эпидемического паротита «Л-3» и с 1981 г. подготовить повторное ее введение в практику здравоохранения.

В 1994 г. Ал.А. Смородинцева избирают членом-корреспондентом, а в 2002 г. — действительным членом Петровской Академии наук и искусств Санкт-Петербурга. В конце XX — начале XXI века Александр Анатольевич Смородинцев был включен в число 20 000 известных медиков нашей планеты в сборник «Marquis Who's Who in Medicine and Healthcare» (1999–2000). В 2001 г. ученый избран адъюнкт-профессором кафедры тропической медицины Университета им. Дж. Вашингтона (США).

Ал.А. Смородинцев награжден знаком «Отличник здравоохранения СССР», медалью «За доблестный труд» и 12 медалями как ветеран Великой Отечественной войны.

Он автор и соавтор более 190 научных статей в отечественных и зарубежных научных журналах, пяти монографий, семи научно-популярных книг, 10 изобретений и одного патента РФ; под его руководством защищено 14 кандидатских диссертаций.

В настоящее время Александр Анатольевич работает как писатель, создавая новые научно-популярные книги о вирусологии.



Памяти Глеба Борисовича Федосеева (04.09.1930–11.05.2019)

На 89-м году жизни скончался видный отечественный терапевт, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Глеб Борисович Федосеев.

Вся научная, врачебная и педагогическая деятельность Г.Б. Федосеева была связана с кафедрой госпитальной терапии 1-го ЛМИ/ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, которую он возглавлял в течение 27 лет (1975–2001). В 1973–1993 г. он был одновременно заместителем директора по научной работе Всесоюзного НИИ пульмонологии МЗ СССР в Ленинграде.

Г.Б. Федосеев — один из создателей отечественной научной школы пульмонологов и аллергологов. Его научные исследования были посвящены бронхиальной астме, ее этиологии, патогенезу, клинике, диагностике, лечению, профилактике. Он внес большой вклад в заложенное классиками учение о наследственной предрасположенности к заболеваниям. Тезис М.В. Чернуцкого о роли конституции в формировании болезни получил дальнейшее развитие и научное обоснование в трудах руководимой Г.Б. Федосеевым кафедры, эволюционировав в представление об особенностях реактивности организма, затем в понятие «предболезни» и, наконец, в концепцию «биологических дефектов».

Г.Б. Федосеев обосновал диверсификацию бронхиальной астмы в соответствии с ведущими механизмами патогенеза и выделил новые клинико-патогенетические варианты заболевания, чем существенно дополнил и расширил классификацию бронхиальной астмы, предложенную А.Д. Адо и П.К. Булатовым. Усовершенствованная Г.Б. Федосеевым классификация бронхиальной астмы сохраняет свое значение до настоящего времени, является для врачей инструментом тонкой нюансировки диагноза и опорой при выборе адекватной индивидуализированной терапии.

В 2002 г. по инициативе Г.Б. Федосеева был создан центр «Доклиническая диагностика и первичная профилактика бронхиальной астмы» на базе ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова и НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта в Петербурге. В задачи центра входили разработка и совершенствование методов ранней диагностики угрозы возникновения бронхиальной астмы у лиц, имеющих большой риск ее развития (члены семьи больного, особенно дети матерей, которые страдают бронхиальной астмой), совершенствование методов первичной профилактики и лечения больных на ранних этапах развития заболевания, обучение практических врачей методам ранней диагностики и профилактики бронхиальной астмы.

С 1978 г. Г.Б. Федосеев был внештатным главным аллергологом Ленинграда и Санкт-Петербурга, а с 2003 г. — главным внештатным терапевтом Северо-Западного ФО. В 2002 г. он положил начало и многие годы был главным организатором ежегодных конгрессов терапевтов Петербурга и Северо-Западного ФО, посвященных актуальным вопросам современной медицины.

В течение последних 25 лет Г.Б. Федосеев — бессменный председатель Правления Санкт-Петербургского общества терапевтов им. С.П. Боткина и член Президиума Российского научного медицинского общества терапевтов. Он был активным участником конгрессов Европейского респираторного общества, членом Международной академии пульмонологов, Американского колледжа пульмонологов.

С 1992 г. под редакцией Г.Б. Федосеева выходили «Санкт-Петербургские врачебные ведомости» (с 1997 г. — «Новые Санкт-Петербургские врачебные ведомости»), журнал для врачей общей практики.

Научное наследие Г.Б. Федосеева велико. Он — автор книги «Мелочи жизни? Аутопатогения и здоровье», в которой предложил термин «аутопатогения» для обозначения таких состояний, как алкоголизм, курение, наркомания и др., автор, соавтор и редактор 18 монографий, сборников научных трудов, 460 статей, 7 изобретений, фармакотерапевтического электронного справочника для практикующих врачей.

Он был членом ред. советов «Терапевтического архива» и «Пульмонологии», членом редколлегий «Российского аллергологического журнала». Выпустил 28 докторов и 73 кандидата наук. Его ученики работают во многих городах России и за рубежом. Многие стали крупными учеными.

Врачебная, научная, педагогическая и организаторская деятельность Г.Б. Федосеева была удостоена многих наград, среди которых «Знак Почёта», орден Трудового Красного Знамени и «Орден Почёта», серебряная и золотая медали ВДНХ за исследования бронхиальной астмы и разработку методов ее лечения и др. В 2011 г. он был избран почетным доктором ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Глеб Борисович Федосеев останется в нашей памяти как успешный и деятельный ученый, обаятельный, высокоинтеллигентный, блестящий человек, прекрасный врач и мудрый учитель.

Памяти Сергея Александровича Кетлинского (21.07.1940–12.06.2019)

Ушел из жизни известный отечественный иммунолог, ведущий специалист страны в области цитокинов, член-корреспондент РАН, лауреат премии Правительства РФ, доктор биологических наук, профессор Сергей Александрович Кетлинский.



С.А. Кетлинский родился в Ленинграде в семье писателей. Пережил блокаду, войну, работая фрезеровщиком на Ленинградском металлическом заводе, окончил вечернюю школу рабочей молодежи, служил в рядах Советской Армии. В 1962–1968 г. учился в 1-м Ленинградском медицинском институте им. акад. И.П. Павлова, совмещая учебу с работой на скорой помощи.

В 1968–1982 г. работал научным сотрудником, а затем заведующим лабораторией экспериментальной гистологии в Институте экспериментальной медицины. Здесь защитил кандидатскую, а затем докторскую диссертацию, посвященную изучению структуры и функции кейлонов (chalones) — тогда нового класса тканеспецифических регуляторов пролиферации, давших толчок к развитию цитокинологии (монография С.А. Кетлинского «Кейлоны и регуляция деления клеток», 1984). С 1990 г. С.А. Кетлинский — профессор.

С 1982 г. С.А. Кетлинский работал в Гос. НИИ особо чистых биопрепаратов, возглавлял лабораторию иммунофармакологии, развивая молекулярные аспекты иммунологии. Под его руководством была создана библиотека кДНК из активированных мононуклеаров донорской крови, на основе которой создавались диагностические тесты для определения цитокинов при различных заболеваниях человека, а также рекомбинантные цитокины, предназначенные для профилактики и лечения многих болезней.

В 1990 г. С.А. Кетлинский был назначен заместителем директора Гос. НИИ ОЧБ по научной работе. Работая на этой должности, он предложил программу изучения цитокинов и создания на этой основе генно-инженерных лекарственных препаратов для лечения патологических процессов, возникающих на фоне иммунодефицита, в т. ч. радиационных поражений, интоксикаций, состояния после проведения химиолучевой терапии опухолей и др. В результате было создано производство рекомбинантных цитокинов (ИЛ-1α, ИЛ-1β, рИЛ-1, ИЛ-8, эритропоэтин и др.), сертифицированное по международным требованиям GMP, разработаны и внедрены в клиническую практику лекарственные средства для лечения ряда социально значимых заболеваний. Созданный им и соавторами рекомбинантный препарат интерлейкина-1β человека «Беталейкин» показал высокую радиопротекторную и лечебную эффективность, прошел доклинические и клинические исследования, был зарегистрирован в РФ и до настоя-

щего времени является единственным реально существующим отечественным средством ранней (экстренной) патогенетической терапии радиационных поражений.

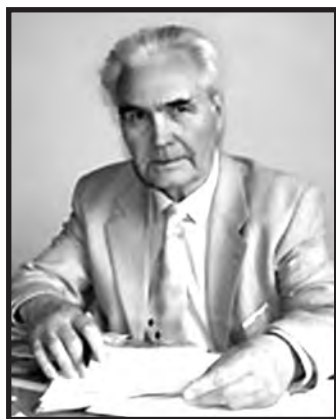
В 2005 г. С.А. Кетлинский был избран членом-корреспондентом РАМН (ныне РАН). В 2007 г. в составе авторского коллектива удостоен премии Правительства РФ в области науки и техники за конструирование бактериальных продуцентов, организацию биотехнологического производства субстанций и препаратов на основе рекомбинантных цитокинов человека и внедрение разработанного медицинского препарата «Беталейкин».

В последние годы его научная деятельность была посвящена изучению роли цитокинов в патологии, исследованию иммунопатогенеза ВИЧ-инфекции, разработке гемосорбентов для удаления провоспалительных цитокинов, исследованию иммунопатогенеза атеросклероза, созданию молекулярной вакцины против этого заболевания.

С.А. Кетлинский создал школу исследователей-единиц. Среди его учеников 5 докторов и 10 кандидатов наук, множество научных работников и врачей-иммунологов. Он автор и соавтор более 200 научных статей и обзоров, 6 монографий, 21 патента на изобретения. Его монография «Эндогенные иммуномодуляторы» (1992), первая в России книга о цитокинах, была отмечена дипломом РАМН и премией акад. Н.Ф. Гамалеи, а монография «Цитокины» (2008) получила широкое признание коллег и уже стала библиографической редкостью. Он был членом Международного, Европейского и Российского цитокиновых обществ, Президиума правления Российского научного общества иммунологов, членом редколлегий журналов «Цитокины и воспаление», «Медицинский академический журнал», «Иммунодефициты и СПИД», членом нескольких диссертационных советов.

Сергей Александрович был открытым и жизнерадостным человеком, его уважали коллеги, любили друзья и ученики. Память о нем навсегда останется в наших сердцах, а его книги и статьи еще долго будут востребованы учеными и практикующими врачами.

Российское цитокиновое общество
Российское научное общество иммунологов
Радиобиологическое общество РАН
Редколлегия и редакционный совет журнала
«Цитокины и воспаление»



Памяти Николая Сергеевича Сапронова (11.09.1937–30.06.2019)

На 82-м году жизни скончался крупный отечественный фармаколог, член-корреспондент РАН, профессор, заслуженный деятель науки РФ, почетный доктор Института экспериментальной медицины, лауреат премии им. принца А.П. Ольденбургского Николай Сергеевич Сапронов.

Николай Сергеевич родился во Владивостоке. В 1962 г. он окончил Ленинградский Санитарно-гигиенический медицинский институт и 2 года работал главным санитарным врачом одного из целинных районов Оренбургской области. Еще студентом он увлекался фармакологией и в 1964 г. поступил в аспирантуру Института экспериментальной медицины (ИЭМ) к выдающемуся отечественному фармакологу академику С.В. Аничкову. После защиты кандидатской диссертации (1968) вся научная деятельность Н.С. Сапронова была связана с ИЭМ, где он прошел путь от младшего научного сотрудника до директора института. В 1980 г. защитил докторскую диссертацию, в 1990 г. стал заместителем директора института по научной работе, а в 1992 г. возглавил отдел нейрофармакологии имени акад. С.В. Аничкова. В 1992 г. ему присвоено звание профессора по специальности «фармакология». За высокие достижения и вклад в развитие отечественной науки он удостоен почетного звания Заслуженного деятеля науки Российской Федерации (1996), а в 1999 г. он был избран членом-корреспондентом РАМН.

Научные труды Н.С. Сапронова посвящены нейрофармакологии и нейроэндокринологии. Его работы по новым нейротропным средствам для фармакокоррекции поражений нервной системы и заболеваний внутренних органов, в генезе которых ведущим является нейрогенный фактор, широко известны в стране и за рубежом. Наиболее крупные его достижения связаны с изучением роли моноами-

нергических структур мозга в регуляции эндокринных функций организма и участия гормональных факторов в формировании высших функций мозга. Они суммированы в монографиях «Фармакология гипоталамо-надпочечниковой системы» (1998), «Гормоны гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы и мозг» (2002), «Гормоны гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и мозг» (2005), «Гормоны гипоталамо-гипофизарно-овариальной системы и мозг» (2009), «Фармакология новых холинергических средств» (2015).

Н.С. Сапронов — автор около 600 научных работ, в числе которых 13 монографий и книг, 16 патентов на новые лекарственные препараты и способы лечения различных заболеваний, более 190 зарубежных публикаций, он был организатором и участником многих отечественных и зарубежных научных форумов. Под его руководством и при его консультировании подготовлено более 25 докторов и кандидатов наук.

Н.С. Сапронов был членом правления Российской и Председателем Санкт-Петербургского научного общества фармакологов, членом Нью-Йоркской Академии наук, инициатором создания и Президентом Российской ассоциации психонейроэндокринологов, членом ряда отечественных и международных научных обществ, членом редколлегий и редакционных советов ряда научных журналов.

Память о Николае Сергеевиче останется в сердцах всех, кто его знал.



Нобелевская премия по физиологии или медицине 2019 года

7 октября 2019 года Нобелевскую премию по физиологии или медицине «за открытие того, как клетки чувствуют кислород и адаптируются к его доступности» получили Уильям Кейлин-младший (William G. Kaelin Jr.), сэр Питер Ретклифф (Sir Peter J. Ratcliffe) и Грегг Семенза (Gregg L. Semenza). (<https://www.nobelprize.org/all-2019-nobel-prizes/>)

КАК ВКЛЮЧИТЬ АДАПТАЦИЮ К ГИПОКСИИ С ПОМОЩЬЮ ВЫКЛЮЧЕНИЯ КИСЛОРОДНО-ЖЕЛЕЗНОГО ВЫКЛЮЧАТЕЛЯ?

Работы Уильяма Кейлина-младшего, сэра Питера Ретклиффа и Грегга Семенза, расшифровывающие сложные механизмы регуляции ответа клеток на дефицит кислорода, перекликаются с рядом предыдущих открытий, отмеченных Нобелевским комитетом, поэтому не будет преувеличением назвать кислород «Нобелевским газом». Так, в 1931 г. Отто Генрих Варбург получил Нобелевскую премию за открытие дыхательных ферментов, использующих кислород как один из субстратов. И хотя биохимическая гипотеза Варбурга о том, что раковые клетки получают энергию за счет бескислородного (анаэробного) гликолиза, а причина возникновения рака заключается в снижении митохондриального (аэробного) дыхания, была ошибочной (путающей причину и следствие), следует отметить, что в условиях дефицита кислорода (гипоксии) гипоксия-индуцибельный фактор-1альфа (HIF-1 α), открытый Греггом Семенза, активирует транскрипцию генов ряда ферментов анаэробного гликолиза. Такой путь адаптации к гипоксии клеток, в том числе и опухолевых, обусловлен тем, что при дефиците кислорода получение энергии в виде АТФ возможно только за счет анаэробного гликолиза, а включение в катаболизм жирных кислот и аминокислот возможно только с участием кислорода. В 1978 г. Питер Деннис Митчелл за открытие хеомосмотического механизма синтеза АТФ (окислительного фосфорилирования) получает Нобелевскую премию по химии. В 1938 г. Корней Жан Франсуа



William G. Kaelin, Jr.
(1957, New York, NY, USA)

Photo: A. Mahmoud © Nobel Media.



Sir Peter J. Ratcliffe
(1954, Lancashire, United Kingdom)

Photo: A. Mahmoud © Nobel Media.

Хейманс получает Нобелевскую премию «за открытие роли синусного и аортального механизмов в регуляции дыхания». При этом следует отметить, что до открытия Нобелевских лауреатов 2019 г. хеморецепторы каротидного синуса считались единственными клетками, чувствительными к парциальному напряжению кислорода. В работе Грегга Семенза было убедительно показано, что у мышей с дефицитом HIF-1 α отсутствует реакция каротидного тела на дефицит кислорода [8]. В 1962 г. Марк Фердинанд Перутц и Джон Коудери Кендрю удостоены Нобелевской премии по химии за рентгеноструктурный анализ глобулярных белков, а именно гемоглобина и миоглобина, обеспечивающих транспорт и хранение кислорода. Феномен усиления созревания эритроцитов, переноса кислорода за счет гемо-



Gregg L. Semenza
(1956, New York, NY, USA)

Photo: A. Mahmoud © Nobel Media.

глобина, в условиях сниженного содержания кислорода высокогорных районов был описан еще в 1882 г. Полем Бертом. Тренировки в высо-

когорьях до сих пор используются для увеличения выносливости, а рекомбинантный эритропоэтин (Епо) — гормон, отвечающий за увеличение числа эритроцитов в кровотоке, используется как антианемический препарат и, нелегально, как допинг. Лишь в конце 80-х годов прошлого века в нескольких независимых работах групп под руководством Мориса Бондурна, Марка Коури и Джейми Каро было показано, что при гипоксии на уровне транскрипции гена *Епо* увеличивается его синтез в почках. Однако механизм чувствительности почек к парциальному давлению кислорода был на тот момент еще неизвестен и многие коллективы безуспешно искали молекулу, которая является «кислородным сенсором» [9]. В рассматриваемом процессе адаптации к гипоксии нужно было найти зависящий от железа и кислорода выключатель, выключение которого приводит к включению гена *Епо*.

Грегг Семенза родился в 1956 г. в Нью-Йорке. Получил степень Бакалавра биологии в Гарвардском Университете (г. Бостон). В 1984 г. получил степень Доктора медицины (PhD) на Медицинском факультете Университета Пенсильвании, Филадельфия. Прошел подготовку по педиатрии в Университете Дьюка (г. Дарем). Был постдоком в Университете Джона Хопкинса (г. Балтимор), где организовал свою группу, в 1999 г. там же стал профессором, а с 2003 г. является директором Сосудистой исследовательской программы в Институте клеточной инженерии. Индекс Хирша на конец 2019 года — 152. В период 1989–1991 г. при исследовании линий мышей, трансгенных по длинным фрагментам гена *Епо* человека, Грегг Семенза идентифицировал 50-нуклеотидный фрагмент ДНК, расположенный в 3'-концевом участке гена *Епо*, который обеспечивал специфическую для печени гипоксия-индуцибельную экспрессию *Епо* человека [10, 11].

Сэр Питер Рэдклифф родился в 1954 г. в Ланкашире (Великобритания). Изучал медицину в колледже Гонвилл-энд-Киз Кембриджского университета, прошел подготовку по нефрологии в Оксфорде. Создал

исследовательскую группу в Оксфордском университете и в 1996 г. стал профессором. Является директором клинических исследований в Институте Фрэнсиса Крика (г. Лондон), директором в TDI в Оксфорде и членом Людвигского института исследований рака. Индекс Хирша на конец 2019 г. — 99. В 1991 г. при культивировании в условиях гипоксии и нормоксии клеток гепатомы, трансфицированных плазмидами с различными участками 3'-концевого гена *Епо* мыши и альфа-глобинового репортера, Питер Рэдклифф идентифицировал участок, активируемый гипоксией [12]. В этой работе эффект культивирования клеток при 1%-ном содержании кислорода был сопоставим с эффектом от добавления в среду 50 мкМ соли кобальта при нормоксии (20 % кислорода). Использование солей кобальта как метиков гипоксии позже было использовано Греггом Семенза при сравнительном выделении HIF из клеток.

В 1993 г. коллективы под руководством Грегга Семенза и Питера Ретклиффа независимо друг от друга публикуют данные о том, что отвечающий на гипоксию элемент (*hypoxia responsive element*, HRE) гена *Епо* связывает HIF-1 не только в клетках, синтезирующих *Епо* [6, 13]. После этого ряд исследовательских групп начинают активный поиск генов, находящихся под контролем HIF. Специалисты в области онкологии уделяют HIF-1 особое внимание, поскольку адаптация солидных опухолей к гипоксии включает изменение метаболизма, ангиогенез, регуляцию pH, устойчивость к терапии и другие.

В 1995 г. Грегг Семенза и его постдок Гуанг Вонг проводят титаническую работу. Используя смолу с иммобилизованным участком HRE промотора *Епо*, из 120 литров экстракта трех граммов ядер клеток HeLa (культивированных в присутствии соли кобальта) они очищают 60 микрограммов HIF-1 в 11 250 раз [14]. Анализ HIF-1 показал, что он является гетеродимером, состоящим из ранее неизвестной альфа-субъединицы и бета-субъединицы, которая уже была описана токсикологами как ARNT (или рецептор диоксинов). После клонирования гена, кодиру-

ющего HIF-1 α , были открыты его гомологи HIF-2 α и HIF-3 α . Оказалось, что именно HIF-2 α , а не HIF-1 α вызывает экспрессию *Епо* в почках, однако это не умаляет важности открытия Нобелевских лауреатов.

Несмотря на то, что были клонированы гены, кодирующие субъединицы HIF, было показано, что в условиях нормоксии альфа-субъединица крайне быстро деградирует, молекулярный механизм, связывающий кислород и нестабильность HIF оставался неизвестен до работ, проведенных под руководством Уильяма Кейлина.

Уильям Кейлин-младший родился в Нью-Йорке в 1957 г. Ему присвоена степень Доктора медицины в Университете Дьюка (г. Дарем). Уильям Кейлин прошел подготовку по внутренним болезням и онкологии в Университете Джона Хопкинса (г. Балтимор), и в Институте Рака Дана-Фарбер (г. Бостон), где организовал свою лабораторию, а в 2002 г. стал профессором Гарвардской медицинской школы. С 1998 г. он является исследователем Медицинского института Говарда Хьюза. Индекс Хирша на конец 2019 г. — 112. В 1995 г. группа Уильяма Кейлина показала, что белок фон Хиппель-Линдау (pVHL), мутации в гене которого приводят к карциноме почек (синдром фон Хиппель-Линдау), является опухолевым супрессором [1]. В 1996–1997 г. при коллаборации с группой Марка Голдберга они обнаруживают, что клетки со сверхпродукцией мутантного VHL синтезируют гены, находящиеся под контролем HIF, в том числе сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) [4]. И, наконец, практически одновременно группы Уильяма Кейлина и Питера Ретклиффа обнаруживают комплексы pVHL с ферментами, участвующими в убиквитинировании белков, и взаимодействие HIF-1 α с pVHL, а также идентифицируют два остатка пролина, которые при нормоксии подвергаются гидроксигированию с помощью железо-зависимых ферментов [2, 3, 7]. Прол-гидроксилазы HIF (PHD) оказались ферментативными сенсорами кислорода, активность которых также зависит от пула лабильного железа в клетке, аскорбата и

2-оксиглутарата, и запускает процессы направления альфа-субъединицы HIF на убиквитинилирование и протеасомную деградацию. На тот момент были известны аскорбат- и железо-зависимые пролил-гидроксилазы коллагена, определяющие нормальное посттрансляционное созревание коллагена, нарушенное при цинге. В том же 2001 г. Грегг СемENZA открывает ингибирующий HIF фактор (FIH), который при нормоксии гидроксигирует остаток аспарагина HIF, нарушая связывание HIF-1 с коактиватором транскрипции (p300) [5]. Таким образом, именно PHD и FIH являются молекулярными сенсорами кислорода, а также железа и митохондриального дыхания (рисунок).

К середине первой декады XXI века становится очевидным, что под контролем HIF-1 и HIF-2 находится более 200 генов-мишеней, отвечающих за метаболизм железа, эритропоэз, ангиогенез и тонус сосудов, транспорт и метаболизм углеводов, регуляцию pH, рост, дифференцировку и выживание клеток в условиях стресса, в том числе апоптоз. Активно описываются нокаутированные по генам *HIF* и *PHD* животные, в том числе с «тканеспецифическим» выключением транскрипции. Активно разрабатываются ингибиторы PHD, способные купировать последствия

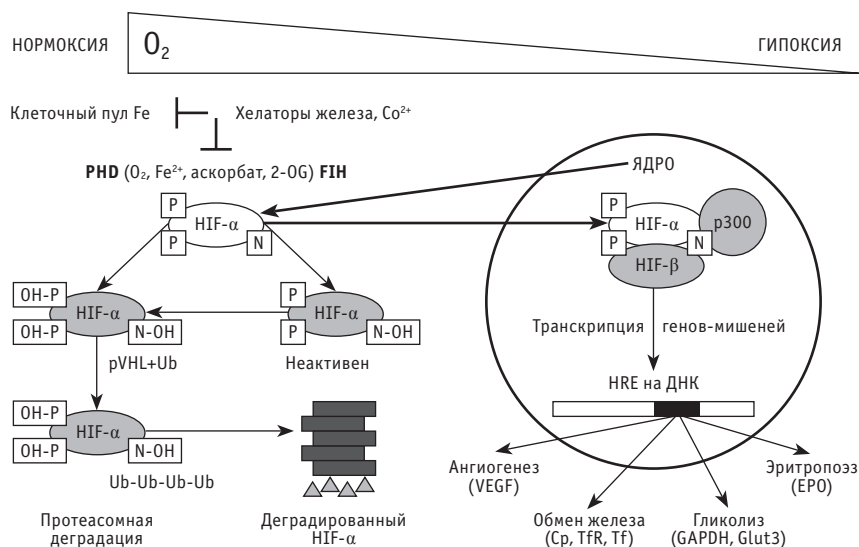


Рисунок. Кислород- и железо-зависимая регуляция стабильности HIF-α. В условиях нормоксии HIF-α гидроксигируется по остаткам пролина (P) и аспарагина (N) ферментами PHD и FIH, выполняющими роль сенсоров O₂, ионов железа, аскорбата и 2-оксиглутарата (2-OG). Гидроксигированный HIF метится убиквитином (Ub) с участием белка фон Хиппель-Линдау (pVHL) и подвергается протеасомной деградации. При гипоксии процесс гидроксигирования HIF-α блокируется, в ядре образуется гетеродимер с HIF-β, который при участии коактиватора (p300) инициирует транскрипцию генов, промоторы которых содержат отвечающие на гипоксию элементы (HRE): VEGF, EPO, Cp, TfR, Tf, GAPDH, Glut 3, и многих других генов адаптации к гипоксическому стрессу.

анемии, в том числе при различных вариантах почечной недостаточности. Варианты воздействий на HIF-сигнальную систему признаны перспективными подходами к терапии онкологических заболеваний, нейродегенеративных и ишемических поражений, в том числе гипоксии плода и преэклампсии. С начала ты-

сячелетия число работ, посвященных HIF, прогрессивно растет, что подтверждает исключительную важность процессов, контролируемых данным транскрипционным фактором, и существенный вклад лауреатов Нобелевской премии 2019 года по физиологии или медицине в развитие науки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Iliopoulos O., Kibel A., Gray S., Kaelin W.G.Jr. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product // *Nat. Med.* 1995. Vol. 1. № 8. P. 822–826.
2. Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S., Kaelin W.G.Jr. HIFα targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing // *Science*. 2001. Vol. 292. № 5516. P. 464–468.
3. Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., von Kriegsheim A., Hebestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. Targeting of HIF-α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation // *Science*. 2001. Vol. 292. № 5516. P. 468–472.
4. Levy A.P., Levy N.S., Iliopoulos O., Jiang C., Kaelin W.G.Jr., Goldberg M.A. Regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia and its modulation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene // *Kidney Int.* 1997. Vol. 51. № 2. P. 575–578.
5. Mahon P.C., Hirota K., Semenza G.L. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity // *Genes Dev.* 2001. Vol. 15. № 20. P. 2675–2686.
6. Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90. P. 2423–2427.
7. Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R., Ratcliffe P.J. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis // *Nature*. 1999. Vol. 399. № 6733. P. 271–275.
8. Semenza G.L. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1 // *J. Appl. Physiol.* 2004. Vol. 96. № 3. P. 1173–1177.
9. Semenza G.L. Perspectives on oxygen sensing // *Cell*. 1999. Vol. 98. № 3. P. 281–284.
10. Semenza G.L., Neijfelt M.K., Chi S.M., Antonarakis S.E. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. Vol. 88. P. 5680–5684.
11. Semenza G.L., Traystman M.D., Gearhart J.D., Antonarakis S.E. Polycythemia in transgenic mice expressing the human erythropoietin gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. Vol. 86. P. 2301–2305.
12. Pugh C.W., Tan C.C., Jones R.W., Ratcliffe P.J. Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. Vol. 88. P. 10553–10557.
13. Wang G.L., Semenza G.L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90. P. 4304–4308.
14. Wang G.L., Semenza G.L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1 // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 1230–1237.

А.В. Соколов

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург

Систематизированный порядковый указатель статей, опубликованных в журнале «Цитокины и воспаление» в 2019 г.

Обзоры

1. Ветлугина Т.П., Лобачева О.А. Цитокины в патогенезе шизофрении. Т. 18. № 1–4. С. 5–9.
2. Демина О.М., Гуревич К.Г. Роль воспаления в патогенезе угревой болезни. Т. 18. № 1–4. С. 10–15.
3. Побежимова О.О., Жестков А.В., Козлова О.С., Лямин А.В., Протасов А.Д., Кулагина В.В. Роль цитокинов в патогенезе атопического дерматита. Т. 18. № 1–4. С. 16–21.
4. Голубкина Е.В., Тризно М.Н. Нарушения иммунного гомеостаза в возрастном аспекте. Т. 18. № 1–4. С. 22–27.

Оригинальные статьи

5. Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Гапон Л.И., Горбатенко Е.А., Еменева И.В., Шароян Ю.А., Зуева Е.В. Перспективная оценка маркеров сосудистой воспалительной реакции и параметров липидного профиля у больных ишемической болезнью сердца при наличии и отсутствии сахарного диабета 2-го типа, перенесших ангиопластику со стентированием коронарных артерий. Т. 18. № 1–4. С. 28–36.
6. Безрукова Е.В., Хмельницкая Н.М., Воробейчиков Е.В., Симбирцев А.С. Морфологические изменения полипозной ткани больных с хроническим полипозным риносинуситом на фоне локального применения интерферона $\alpha 2b$ и сочетания интерферона $\alpha 2b$ с γ -D-глутамил-L-триптофаном. Т. 18. № 1–4. С. 37–42.
7. Портнягина О.Ю., Кузьмич А.С., Хоменко В.А., Исаева М.П., Соловьева Т.Ф., Новикова О.Д. Индукция синтеза интерлейкинов и активаторов хемотаксиса под действием *OmpF* порина из *Yersinia pseudotuberculosis* на модели *in vivo*. Т. 18. № 1–4. С. 43–49.

8. Кудрявцев И.В., Ильвес А.Г., Новоселова О.М., Рубаник К.С., Серебрякова М.К., Прахова Л.Н. Субпопуляционный состав цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови и спинномозговой жидкости при рассеянном склерозе. Т. 18. № 1–4. С. 50–57.
9. Кутукова Н.А., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Гусельникова В.В., Шамова О.В., Назаров П.Г. Холинергическая регуляция активности тучных клеток перитонеального экссудата. Т. 18. № 1–4. С. 58–65.
10. Минеев В.Н., Лалаева Т.М., Скворцова Р.Д., Куликов А.Н. Лептин и индекс апноэ/гипопноэ у больных бронхиальной астмой (Предварительное исследование). Т. 18. № 1–4. С. 66–70.
11. Рутто К.В., Кудрявцев И.В., Людыно В.И., Киселева Е.П. Влияние семафорина 3А на адгезию тимочитов к клеткам эпителия тимуса при опухолевом росте. Т. 18. № 1–4. С. 71–74.
12. Маммедова Дж.Т., Старикова Э.А., Бурова Л.А., Малашичева А.Б., Семёнова Д.С., Фрейдлин И.С. Бактериальная аргининдеиминаза нарушает структуру актинового цитоскелета эндотелиальных клеток. Т. 18. № 1–4. С. 75–79.
13. Иванова О.С., Левагина Г.М., Батенева А.В., Гамалей С.Г., Богрянцева М.П., Даниленко Е.Д. Получение и исследование физико-химических и биологических свойств интраназальных форм аналога интерферона гамма человека. Т. 18. № 1–4. С. 80–84.
14. Мороз Л.А., Талако Т.М., Потапов М.П., Сорока Н.Ф. Цитокиновая сеть синовиальной жидкости и ее связь с активностью ревматоидного артрита. Т. 18. № 1–4. С. 85–90.
15. Мальцева О.Н., Назаров П.Г., Танянский Д.А., Денисенко А.Д. Двухфазный характер действия гистамина на проницаемость моно слоя эндотелиальных клеток линии EA.hy926

для белковых молекул *in vitro*. Т. 18. № 1–4. С. 91–96.

16. Безрукова Е.В., Конусова В.Г., Воробейчиков Е.В., Симбирцев А.С. Применение рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ (Интерфераль) и γ -D-глутамил-L-триптофана (Бестим) для консервативного лечения хронического полипозного риносинусита. Т. 18. № 1–4. С. 97–102.
17. Абдурахманов М.М., Ураков Ш.Т., Сафаров С.С., Кулдашев Г.Н. Иммуноориентированная терапия в комплексном лечении острого панкреатита. Т. 18. № 1–4. С. 103–107.

Юбилей

18. Академик Корнева Елена Андреевна (к 90-летию со дня рождения). Т. 18. № 1–4. С. 108.
19. Александр Анатольевич Смородинцев (к 90-летию со дня рождения). Т. 18. № 1–4. С. 109.

Некролог

20. Памяти Глеба Борисовича Федосеева (04.09.1930–11.05.2019). Т. 18. № 1–4. С. 110.
21. Памяти Сергея Александровича Кетлинского (21.07.1940–12.06.2019). Т. 18. № 1–4. С. 111.
22. Памяти Николая Сергеевича Сапронова (11.09.1937–30.06.2019). Т. 18. № 1–4. С. 112.

События года

23. Соколов А.В. Нобелевская премия по физиологии или медицине 2019 г. Т. 18. № 1–4. С. 113–115.

Новости лабораторной диагностики

18. ЗАО «БиоХимМак». Набор для количественного определения антител к NR2 субъединице NMDA рецептора глутамата в сыворотке крови человека методом ИФА. Т. 18. № 1–4. 3-я стр. обложки.

Алфавитный именной указатель (ссылки даны на систематизированный порядковый указатель)

А бдурахманов М.М.	17	К иселева Е.П.	11	Протасов А.Д.	3
		Козлова О.С.	3	Прахова Л.Н.	8
Б атенева А.В.	13	Конусова В.Г.	16		
Безрукова Е.В.	6, 16	Кудрявцев И.В.	8, 9, 11	Р убаник К.С.	8
Богрянцева М.П.	13	Кузьмич А.С.	7	Рутто К.В.	11
Бурова Л.А.	12	Кулагина В.В.	3		
		Кулдашев Г.Н.	17	С афаров С.С.	17
В етлугина Т.П.	1	Куликов А.Н.	10	Семёнова Д.С.	12
Воробейчиков Е.В.	6, 16	Кутукова Н.А.	9	Серебрякова М.К.	8, 9
				Симбирцев А.С.	6, 16
Г амалей С.Г.	13	Л алаева Т.М.	10	Скворцова Р.Д.	10
Гапон Л.И.	5	Левагина Г.М.	13	Соколов А.В.	23
Голубкина Е.В.	4	Лобачева О.А.	1	Соловьева Т.Ф.	7
Горбатенко Е.А.	5	Людено В.И.	11	Сорока Н.Ф.	14
Гуревич К.Г.	2	Лямин А.В.	3	Старикова Э.А.	12
Гусельникова В.В.	9				
		М алашичева А.Б.	12	Т алако Т.М.	14
Д емина О.М.	2	Мальцева О.Н.	15	Танянский Д.А.	15
Даниленко Е.Д.	13	Маммедова Дж.Т.	12	Тризно М.Н.	4
Денисенко А.Д.	15	Минеев В.Н.	10		
		Мороз Л.А.	14	У раков Ш.Т.	17
Е менева И.В.	5	Мусихина Н.А.	5		
				Ф рейдлин И.С.	12
Ж естков А.В.	3	Н азаров П.Г.	9, 15		
		Новикова О.Д.	7	Х мельницкая Н.М.	6
З уева Е.В.	5	Новоселова О.М.	8	Хоменко В.А.	7
И ванова О.С.	13	П етелина Т.И.	5	Ш амова О.В.	9
Ильвес А.Г.	8	Побежимова О.О.	3	Шароян Ю.А.	5
Исаева М.П.	7	Портнягина О.Ю.	7		
		Потапнев М.П.	14		

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ В ЖУРНАЛЕ «ЦИТОКИНЫ И ВОСПАЛЕНИЕ»

ОБЪЕМ

Редакция журнала «Цитокины и воспаление» предъявляет следующие требования к оформлению статей, которые соответствуют международным правилам построения публикаций и резюме к ним.

Объем оригинальной статьи — до 20 тысяч знаков, включая рисунки, таблицы, список литературы, русское и английское резюме; число ссылок — не более 15. Объем обзоров — не более 30 тысяч знаков (включая рисунки, таблицы, список литературы, русское и английское резюме); число ссылок — не более 40.

СТРУКТУРА

В начале первой страницы указать: 1) инициалы и фамилии авторов; 2) название статьи; 3) названия учреждений, в которых выполнена работа; 4) город (города), где находятся учреждения. Затем следуют: введение (с указанием цели и задач исследования); материалы и методы; результаты и обсуждение; благодарности (ссылки на гранты и т. п.); литература; резюме на русском языке; резюме на английском языке; таблицы; рисунки или фотографии; подписи к рисункам. В конце статьи обязательно список всех авторов, содержащий фамилии, имена и отчества (полностью), ученые степени, звания, должности, собственные рукописные подписи. Автор, ответственный за переписку с редакцией, указывает свое имя, отчество, фамилию, почтовый и электронный адреса и телефоны. Резюме на русском языке (около 200 слов) должно содержать цели исследования, материалы и методы, результаты, заключение, ключевые слова (5-6). Резюме на английском языке имеет такую же структуру и обязательно должно содержать перевод названия статьи, названий учреждений и ключевых слов, фамилии и инициалы авторов в латинской транскрипции.

Просим проверять грамотность английского языка у носителя или преподавателя языка.

ПРИ ОФОРМЛЕНИИ СТАТЕЙ ПРОСИМ СОБЛЮДАТЬ СЛЕДУЮЩИЕ ПРАВИЛА:

1. Статьи, направляемые для публикации в журнале, необходимо присылать в электронном виде (по электронной почте), набранными в текстовых редакторах Word, WordPad или других приложениях Windows. Средний объем каждой страницы — 2000 знаков, включая пробелы, кегль 14, гарнитура Times New Roman, полуторный межстрочный интервал, поля обычные. При наборе **не нужно выполнять форматирование текста** (т. е. заголовки и подзаголовки следует набирать как отдельный абзац, не выделяя их ПРОПИСНЫМИ или жирными буквами; не расставлять переносы вручную; не использовать пробелы или табуляцию для центровки строк и выравнивания текста).

2. Графики и рисунки предоставлять в электронном виде в графических форматах TIFF, JPG, BMP, PSD (с разрешением не менее 300 dpi). Диаграммы и графики сопровождать таблицей цифровых данных, по которым они были построены. Фотографии присылать в виде качественных оригиналов (сканировать самим не нужно). На каждом рисунке или фотографии карандашом на обороте указывать номер рисунка, фамилию первого автора и название статьи, обозначить верх и низ. Подписи к рисункам обязательны.

3. Список литературы формируется **по алфавиту**. Сначала — русскоязычные (обязательно с транслитерацией), затем — иностранные. В списке литературы следует по каждому источнику указывать ВСЕХ авторов, а не только первых трех авторов с заменой остальных аббревиатурой «и др.» или «et al.». Все иностранные источники необходимо проверить по pubmed, обязательно писать все фамилии и инициалы. После каждой буквы в инициалах проставляйте точки. Указывайте том (Vol.), №, полный диапазон страниц (напр., P. 1110–1116).

Примеры оформления ссылок:

Булгакова А.И. Изменения показателей местного иммунитета десны и ротовой полости больных при лечении хронического пародонтита // Пародонтология. 2002. № 1–2 (23). С. 55–59.

Bulgakova A.I. [Changes in local immunity of the gums and oral cavity of patients in the treatment of chronic periodontitis] // Parodontologiya. 2002. № 1–2 (23). P. 55–59. Russian.

Dinarello C.A. Biologic basis for IL-1 in disease // Blood. 1996. Vol. 87. № 6. P. 2095–2147.

Neis M.M., Peters B., Dreuw A., Wenzel J., Bieber T., Mauch C., Krieg T., Stanzel S., Heinrich P.C., Merk H.F., Bosio A., Baron J.M., Hermanns H.M. Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis // J. Allergy Clin. Immunol. 2006. Vol. 118. № 4. P. 930–937.

Настоятельно просим тщательно выверять каждую ссылку. Правильность написания фамилий авторов, особенно иностранных, их инициалов, а также сокращенного написания названий журналов, номеров тома, выпуска и страниц (первой и последней) рекомендуем сверять с электронными базами данных, доступ в которые бесплатный: «eLIBRARY.RU» (Научная Электронная Библиотека, <http://www.elibrary.ru>) и PubMed (<http://www.pubmed.com>). Вместе с тем, убедительно просим соблюдать принятую в журнале «Цитокины и воспаление» пунктуацию (см. выше: «Примеры оформления ссылок»).

4. Не допускается направление в редакцию работ, которые уже опубликованы или направлены для публикации в другие издания.

5. Корректур авторам не высылаются. Согласование с авторами изменений и правки производится по электронной почте.

6. Авторский гонорар и оплата труда по рецензированию рукописей не предусмотрены.

7. Рукописи, не принятые к печати, авторам не возвращаются.

8. Все статьи, в том числе аспирантские, рассматриваемые и публикуемые в порядке очереди, печатаются в журнале «Цитокины и воспаление» бесплатно. Исключение составляют срочные (экстренные) публикации.

Статьи направлять по адресу:

Профессору Назарову Петру Григорьевичу,
главному редактору журнала «Цитокины и воспаление»
ул. Академика Павлова, 12
Институт экспериментальной медицины
197376, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: peter_nazarov@mail.ru или cytokines_inflammation@yahoo.com
Тел.: +7 (812) 234 29 29, +7 (921) 909 55 49 (моб.)

Координаты для справок:

Заведующая редакцией журнала
«Цитокины и воспаление»
Ольга Ярославовна Михайлова
Тел.: +7 (921) 984 11 30
E-mail: cytokines@yandex.ru