

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"»



**АДРЕС РЕДАКЦИИ:**

Москва,  
ул. Скотопрогонная, д. 29/1,  
подъезд 15  
Зав. редакцией  
**Галина Ивановна ГАВРИКОВА**  
8 (495) 670-65-44

E-mail: [immunol@idm.msk.ru](mailto:immunol@idm.msk.ru)  
[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

**Почтовый адрес:**

115088, Москва,  
Новоослаповская ул.,  
д. 5, стр. 14

ЛР № 010215 от 29.04.97

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Сведения о статьях, публикуемых в журнале "Иммунология", помещаются в Excerpta Medica; Biological Abstracts; Chemical Abstracts; INIS Atomindex (International Nuclear Information System); Ulrich's International Periodicals Directory.

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

Тел. 8 (495) 678-64-84

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

Редактор *В.В. Чагина*

Художественный редактор  
*М.Б. Белякова*

Технический редактор *Л.В. Зюкина*  
Корректор *В.С. Смирнова*  
Верстка *Е.М. Архипова*

Сдано в набор 04.12.2017.  
Подписано в печать 22.12.2017.  
Формат 60 × 88 1/8.

Печать офсетная.  
Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,75.  
Уч.-изд. л. 6,05.  
Заказ 180003.

Отпечатано в ООО "Подольская  
Периодика", 142110, г. Подольск,  
ул. Кирова, 15

Подписка через интернет:  
[www.aks.ru](http://www.aks.ru); [www.pressa-rt.ru](http://www.pressa-rt.ru)

**Индексы по каталогу «Роспечать»:**  
Индекс 71492 – для индивидуальных подписчиков  
Индекс 71493 – для предприятий и организаций

**Индексы по каталогу «Пресса России»:**  
27877 – для индивидуальных подписчиков  
27878 – для предприятий и организаций

ISSN 0206-4952. Иммунология. 2018.  
Т. 39. № 1. 1–88.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК  
ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА



*И.И. Мечников*

# ИММУНОЛОГИЯ

Двухмесячный научно-практический журнал

ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1980 г.

*Журнал входит в рекомендуемый ВАК перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени доктора и кандидата наук*

Том 39

1

2018

ЯНВАРЬ–ФЕВРАЛЬ

**Главный редактор академик РАН Р.М. ХАЙТОВ**

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Ч. АКДИС, профессор, доктор мед. наук, Давос, Швейцария, С. ДЖОНСТОН, профессор, доктор мед. наук, Лондон, Великобритания, А. МУРАРО, профессор, доктор мед. наук, Падуя, Италия, И. АГАЧЕ, профессор, доктор мед. наук, Брасов, Румыния, Л.П. АЛЕКСЕЕВ, член-корр. РАН, профессор, доктор мед. наук, Р.И. АТА-УЛЛАХАНОВ, профессор, доктор мед. наук, М.Н. БОЛДЫРЕВА, доктор мед. наук, Ф.Ю. ГАРИБ, профессор, доктор мед. наук (научный редактор), Г.О. ГУДИМА, профессор, доктор биол. наук (зам. главного редактора), И.С. ГУЩИН, член-корр. РАН, профессор, доктор мед. наук, Н.И. ИЛЬИНА, профессор, доктор мед. наук, З.Г. КАДАГИДЗЕ, профессор, доктор мед. наук, Э.В. КАРАМОВ, профессор, доктор биол. наук, А.В. КАРАУЛОВ, академик РАН, доктор мед. наук, профессор, Н.В. МЕДУНИЦЫН, академик РАН, доктор мед. наук, профессор, И.А. НИКОЛАЕВА, доктор биол. наук, М.В. ПАЩЕНКОВ, доктор мед. наук, Р.В. ПЕТРОВ, академик РАН, профессор, доктор мед. наук, Б.В. ПИНЕГИН, профессор, доктор мед. наук, Ю.П. РЕЗНИКОВ, профессор, доктор мед. наук, А.С. СИМБИРЦЕВ, член-корр. РАН, профессор, доктор мед. наук, А.В. ФИЛАТОВ, профессор, доктор биол. наук, М.Р. ХАЙТОВ, член-корр. РАН, профессор, доктор мед. наук

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.В. ЕМЕЛЬЯНОВ (Санкт-Петербург), В.А. КОЗЛОВ (Новосибирск), Л.В. ЛУСС (Москва), М.З. САИДОВ (Махачкала), Р.И. СЕПИАШВИЛИ (Москва), Л.П. СИЗЯКИНА (Ростов-на-Дону), Н.Ю. СОТНИКОВА (Иваново), И.А. ТУЗАНКИНА (Екатеринбург), И.С. Фрейдлин (Санкт-Петербург), В.А. ЧЕРЕШНЕВ (Екатеринбург)

## МЕЖДУНАРОДНЫЙ СОВЕТ:

Т.У. АРИПОВА (Ташкент, Узбекистан), С.С. ГАМБАРОВ (Ереван, Армения), М.П. ПОТАПНЕВ (Минск, Беларусь)

**IZDATEL'STVO  
MEDITSINA**



MOSCOW

115088, Moscow,  
Novoostapovskaya str., 5,  
building 14

**Tel.:+7(495) 670-65-94**

**E-mail: immunol@idm.msk.ru**

**www.medlit.ru**

ЛП № 010215 от 29.04.97

**ISSN 0206-4952**

**RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES  
INSTITUTE OF IMMUNOLOGY OF FEDERAL MEDICAL AND BIOLOGICAL AGENCY**



*И.И. Мечников*

# IMMUNOLOGIYA

**IMMUNOLOGY**

**Bimonthly scientific-practical journal**

**SINCE 1980**

**Volume 39**

**1**

**2018**

**JANUARY–FEBRUARY**

**Editor-in-Chief Rakhim KHAITOV,  
MD, PhD, DSc, Prof., academician of RAS**

## THE EDITORIAL BOARD:

CESMI AKDIS, MD, PhD, Dsc., prof., Davos, Switzerland, SEBASTIAN JOHNSTON, MD, PhD, Dsc., prof., London, United Kingdom, ANTONELLA MURARO, MD, PhD, Dsc., prof., Padua, Italy, IOANA AGACHE, MD, PhD, Dsc., prof., Brasov, Romania, LEONID ALEXEEV, corresponding member of RAS, MD, PhD, Dsc., prof., RAVSHAN ATAULLAKHANOV, MD, PhD, Dsc., prof., MARGARITA BOLDYREVA, MD, PhD, Dsc., FIRUZ GARIB, MD, PhD, Dsc., prof. (Scientific Editor), GEORGII GUDIMA, DBS, PhD, Dsc., prof. (Deputy Editor), IGOR GUSHCHIN, corresponding member of RAS, MD, PhD, Dsc., prof., NATALIA ILINA, MD, PhD, Dsc., prof., ZAIRA KADAGIDZE, MD, PhD, Dsc., prof., EDWARD KARAMOV, DBS, PhD, Dsc., ALEXANDER KARAULOV, academician of RAS, MD, PhD, Dsc., prof., NICKOLAY MEDUNITSYN, academician of RAS, MD, PhD, Dsc., IRINA NIKOLAEVA, DBS, PhD, Dsc., MIKHAIL PASHCHENKOV, MD, PhD, Dsc., REM PETROV, academician of RAS, MD, PhD, Dsc., prof., BORIS PINEGIN, MD, PhD, Dsc., prof., YURIY RESNIKOV, MD, PhD, Dsc., prof., ANDREY SIMBIRTSEV, corresponding member of RAS, MD, PhD, Dsc., prof., ALEXANDER FILATOV, DBS, PhD, Dsc., prof., MUSA KHAITOV, corresponding member of RAS, MD, PhD, Dsc., prof.

## THE EDITORIAL COUNCIL:

ALEXANDER EMEL'YANOV (St. Petersburg), VLADIMIR KOZLOV (Novosibirsk), LUDMILA LUSS (Moscow), MARAT SAIDOV (Makhachkala), REVAZ SEPIASHVILI (Moscow), LUDMILA SIZYAKINA (Rostov-on-Don), NATALIA SOTNIKOVA (Ivanovo), IRINA TUZANKINA (Ekaterinburg), IRINA FREYDLIN (St. Petersburg), VALERY CHERESHNEV (Ekaterinburg)

## THE INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL:

T.U. ARIPOVA (Tashkent, Uzbekistan), S.S GAMBAROV (Erevan, Armenia),  
M.P. POTAPNEV (Minsk, Belarus)

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИММУНОЛОГИЯ И ИММУНОГЕНЕТИКА

**Лебедева Е.С., Багаев А.В., Гараева А.Я., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И.** Кооперативное взаимодействие сигнальных путей рецепторов TLR4, TLR9 и NOD2 в макрофагах мыши . . . . . 4

## ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ

**Гординская Н.А., Лебедев М.Ю., Алейник Д.Я., Рубцова Ю.П., Митрофанов В.Н., Живцов О.П.** Роль TOLL-подобных рецепторов в патогенезе хронического остеомиелита . . . . .

**Сизякина Л.П., Шлык И.Ф., Сидоров Р.В., Шлык С.В.** Характеристика клеточного звена врожденного иммунитета у пациентов, перенесших коронарное стентирование

## КЛЕТЧНАЯ ИММУНОЛОГИЯ

**Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С.** Оценка влияния  $\gamma$ C-цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на экспрессию молекул поздней активации и апоптоза (CD95 и HLA-DR) CD4+/CD8+ T-лимфоцитами в популяции CD45RA T-клеток *in vitro* клеточн . . . . .

**Вольский Н.Н., Перминова О.М., Гойман Е.В., Гаврилова Е.Д.** Влияние Th1/Th2-соотношения на развитие острой РТПХ в полуаллогенной системе C57Bl/6→(C57Bl/6x DBA/2)F1 . . . . .

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ИММУНОПАТОЛОГИЯ

**Гао Ю., Постовалова Е.А., Добрынина М.Т., Макарова О.В.** Половые различия субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови, брыжеечных лимфатических узлах и ободочной кишке при экспериментальном хроническом язвенном колите. . . . .

## КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

**Кулебякина М.А., Дыйканов Д.Т., Рубцов Ю.П., Семина Е.В., Ткачук В.А.** Компоненты урокиназной системы оказывают реципрокное влияние на накопление противовоспалительных регуляторных и провоспалительных цитотоксических T-лимфоцитов в селезенке. . . . .

## ИММУНОПАТОЛОГИЯ

**Саидов М.З., Маммаев С.Н., Абдуллаев А.А., Алиева М.Г.** Иммуномаркеры повреждения миокарда как предикторы клинического исхода острого коронарного синдрома в стенокардию напряжения III функционального класса . . . . .

## МЕТОДЫ

**Зенинская Н.А., Рябко А.К., Колесников А.В., Козырь А.В., Марьян М.А., Фирстова В.В., Шемякин И.Г., Караулов А.В., Дятлов И.А.** Получение и иммуногенные свойства рекомбинантного пептидогликан-ассоциированного липопротеина (PAL) Legionella pneumophila . . . . .

**Фомина Е.Г., Счеслёнок Е.П., Семижон П.А., Школина Т.В., Григорьева Е.Е., Ткачёв С.В., Владыко А.С.** Получение, очистка и антигенная специфичность рекомбинантного полипептида, включающего CH2-CH3 домены Fc-фрагмента иммуноглобулина G человека . . . . .

## ОБЗОРЫ

**Владимирский М.А.** Иммунологические методы диагностики туберкулезной инфекции у детей и подростков. Проблемы и перспективы . . . . .

**Мисурин В.А.** Прогностическое значение экспрессии гена PRAME при солидных опухолях. . . . .

**Оловникова Н.И., Николаева Т.Л., Эршлер М.А.** Иммунопрофилактика резус-иммунизации: перспектива создания моноклонального иммуноглобулина для предупреждения гемолитической болезни новорожденных. . . . .

**Щубелко Р.В., Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е.** Мукозальный иммунитет верхних дыхательных путей . . . . .

## MOLECULAR IMMUNOLOGY AND IMMUNOGENETICS

**Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Garaeva A.Y., Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataulakhanov R.I.** The cooperative interaction of TLR4-, TLR9- and NOD2-signaling pathways in mouse macrophages

## INNATE IMMUNITY

**Gordinskaya N.A., Lebedev M.Yu., Aleynik D.Ya., Rubtsova Yu.P., Mitrofanov V.N., Zhivtsov O.P.** Role of toll-like receptors in the pathogenesis of chronic osteomyelitis

**Sizyakina L.P., Shlyk I.F., Sidorov R.V., Shlyk S.V.** Characteristics of the cellular link of innate immunity in patients undergoing coronary stenting

## CELL IMMUNOLOGY

**Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Litvinova L.S.** Evaluation of the effect of  $\gamma$ c-cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15) on expression of the late activation molecules and apoptosis (CD95 AND HLA-DR) CD4+/CD8+ T-lymphocytes in a population of CD45RA T cells *in vitro*

**Volsky N.N., Perminova O.M., Goiman E.V., Gavrilova E.D.** Effect of the Th1/Th2 ratio on the development of acute GVHD in the semiallogeneic system C57Bl/6 →(C57Bl/6 x DBA/2)F1

## EXPERIMENTAL IMMUNOPATHOLOGY

**Gao Yu., Postovalova E.A., Dobrynina M.T., Makarova O.V.** Sex differences of subpopulation composition of lymphocytes in the peripheral blood, mesenteric lymph nodes and colon in experimental chronic ulcerative colitis

## CLINICAL IMMUNOLOGY

**Kulebiakina M.A., Dyikanov D.T., Rubtsov Yu.P., Semina E.V., Tkachuk V.A.** Urokinase system components have reciprocal effects on regulatory and cytotoxic T-cells accumulation in spleen

## IMMUNOPATHOLOGY

**Saidov M.Z., Mammaev S.N., Abdulaev A.A., Alieva M.G.** Immunomarkers of myocardial injury as a predictor of clinical issue acute coronary syndrome to stable angina of III functional class

## METHODS

**Zeninskaya N.A., Riabko A.K., Kolesnikov A.V., Kozyr A.V., Marin M.A., Firstova V.V., Shemyakin I.G., Karaulov A.V., Dyatlov I.A.** The preparation of recombinant peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) Legionella pneumophila and characterisation of its immunogenic properties

**Fomina E.G., Scheslenok E.P., Semizhon P.A., Shkolina T.V., Grigorieva E.E., Tkachov S.V., Vladlyko A.S.** Production, purification and antigenic specificity of recombinant polypeptide including CH2-CH3 domains of Fc-fragment of human immunoglobulin G

## REVIEWS

**Vladimirsky M.A.** Immunological methods for tb infection diagnostics in children and adolescents. Challenges and opportunities

**Misurin V.A.** Prognostic value of prame's gene expression in solid tumors

**Olovnikova N.I., Nikolaeva T.L., Ershler M.A.** Immunization of rhesus immunization: the prospect of a monoclonal immunoglobulin to prevent haemolytic disease of the newborn

**Shchubelko R.V., Zuykova I.N., Shuljenko A.E.** Mucosal immunity of the upper respiratory tract

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИММУНОЛОГИЯ И ИММУНОГЕНЕТИКА

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.112.95.014.467.083

Лебедева Е.С., Багаев А.В., Гараева А.Я., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И.

### КООПЕРАТИВНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ РЕЦЕПТОРОВ TLR4, TLR9 И NOD2 В МАКРОФАГАХ МЫШИ

Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115478, Москва, Россия

Рецепторы, распознающие молекулярные образы патогенов (pattern recognition receptors, PRR), выполняют функцию первичных сенсоров инфекции. Большинство патогенов несут в своём составе множество агонистов различных типов PRR и потому индуцируют одновременную активацию не одного, а двух, трёх или более типов сенсорных рецепторов. Ранее мы сообщали о синергическом усилении ответа клеток врождённого иммунитета при их одновременной активации парными сочетаниями агонистов PRR, в частности TLR4+NOD2, TLR4+TLR9 или TLR9+NOD2 [1–3]. В этой работе мы усложнили внешний сигнал до комбинации трёх агонистов и сравнили ответы макрофагов на тройную активацию суммой агонистов TLR4+TLR9+NOD2 с ответами этих клеток на парные сочетания тех же агонистов.

Ответную реакцию макрофагов на воздействие агонистами оценивали по активации внутриклеточных сигнальных путей на уровне протеинкиназ и транскрипционных факторов: TAK1, IKK $\alpha/\beta$ , NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B-путь), ERK1/2, c-Fos (MAPK-путь) и TBK1 (IRF-путь). Наряду с амплитудой изучалась кинетика активации.

Наибольшую активацию макрофагов наблюдали после воздействия парными сочетаниями агонистов TLR4+TLR9, TLR4+NOD2 или тройной комбинацией LPS+CrG+MDP. По активации TAK1, IKK $\alpha/\beta$ , NF- $\kappa$ B, ERK1/2, c-Fos и TBK1 указанные комбинации превысили одиночное действие агонистов TLR4, TLR9 и NOD2. Сочетание агонистов TLR9+NOD2 проявило слабое или ингибирующее действие по сравнению с одиночным действием агонистов этих рецепторов. Тройное сочетание агонистов TLR4+TLR9+NOD2 индуцировало в макрофагах более интенсивную активацию IKK $\alpha/\beta$ , NF- $\kappa$ B и ERK1/2 по сравнению с двойными сочетаниями агонистов TLR4+TLR9 и TLR4+NOD2. Полученные результаты свидетельствуют о синергической кооперации внутриклеточных NF- $\kappa$ B- MAPK- и IRF-сигнальных каскадов при воздействии на макрофаги тройным и парными сочетаниями агонистов TLR4, TLR9 и NOD2. Результатом кооперации является возрастание в клетках концентрации активных факторов транскрипции NF- $\kappa$ B и AP-1 (c-Fos). Вероятно, повышенная транскрипционная активность этих факторов обеспечивает синергическую продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами, активированными сочетанием агонистов TLR4, TLR9 и NOD2 [1, 2].

**Ключевые слова:** *Toll-подобные рецепторы; NOD-подобные рецепторы; сигнальные пути; кооперация; NF- $\kappa$ B, MAP-киназа; ERK; IRF3.*

**Для цитирования:** Лебедева Е.С., Багаев А.В., Гараева А.Я., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. Кооперативное взаимодействие сигнальных путей рецепторов TLR4, TLR9 и NOD2 в макрофагах мыши. *Иммунология*. 2018; 39(1): 4–11. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-4-11>

*Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Garaeva A.Y., Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataulakhanov R.I.*

#### THE COOPERATIVE INTERACTION OF TLR4-, TLR9- AND NOD2-SIGNALING PATHWAYS IN MOUSE MACROPHAGES

National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, 115478, Moscow, Russia  
Pattern recognition receptors (PRR) recognize conserved pathogen associated molecular patterns (PAMPs) and function as primary sensors of infection. As many pathogens carry multiple PAMPs, they are able to simultaneously activate not one but two, three or more types of sensory receptors. We reported previously a synergistic enhancement of response of innate immunity cells after their simultaneous activation with paired combinations of PRR agonists, in particular, TLR4+NOD2, TLR4+TLR9 or TLR9 +NOD2 [1–3]. In this paper, we complicated the external signal up to three PRR-agonists. The responses of macrophages to triple activation with TLR4+TLR9+NOD2 agonists were compared with the ones to paired combinations or the same agonists used alone.

The response of macrophages to agonists was evaluated according to activation of intracellular signaling pathways. We tracked activation of cellular protein kinases and transcription factors (TAK1, IKK $\alpha/\beta$ , NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B pathway), ERK1/2, c-Fos (MAPK pathway) TBK1 (IRF -way)) in macrophages treated with different PRR agonistic compositions. Along with the amplitude, the activation kinetics was studied.

The highest activation response of macrophages was observed to paired TLR4+TLR9, and TLR4+NOD2 combinations of agonists or to TLR4+TLR9+NOD2 triple combination. These combinations exceeded the response to the TLR4, TLR9 or NOD2 agonists used alone according to the activation of TAK1, IKK $\alpha/\beta$ , NF- $\kappa$ B, ERK1/2, c-Fos and TBK1. The combination of TLR9+NOD2 agonists showed weak or inhibitory effect compared to the same agonists used alone. The TLR4+TLR9+NOD2 triple combination of agonists induced more intensive activation of IKK $\alpha/\beta$ , NF- $\kappa$ B and ERK1/2 in macrophages as compared to the TLR4+TLR9 and TLR4+NOD2 double combinations.

**Для корреспонденции:** Атауллаханов Равшан Иноятович, д-р мед. наук, профессор, руководитель отдела иммунной биотехнологии ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, E-mail: [ravshan.ataullakhanov@gmail.com](mailto:ravshan.ataullakhanov@gmail.com)

Our results evidence for a synergistic cooperation of intracellular NF- $\kappa$ B, MAPK and IRF-signal cascades in macrophages upon exposure to triple and paired combinations of TLR4, TLR9 and NOD2 agonists. As a consequence of NF- $\kappa$ B, MAPK and IRF pathways' cooperation the concentration of active transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 (c-Fos) is increased. Probably, the enhanced transcription activity of these factors provides synergistic production of pro-inflammatory cytokines in macrophages activated with the combination of TLR4, TLR9 and NOD2 agonists [1, 2].

**Key words:** *Toll-like receptors; NOD-like receptors; signaling pathways; cooperation; NF- $\kappa$ B, MAP kinase; ERK; IRF3.*

**For citation:** Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Garaeva A.Y., Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataulakhanov R.I. The cooperative interaction of TLR4-, TLR9- and NOD2-signaling pathways in mouse macrophages. *Immunologiya*. 2018; 39(1):4-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-4-11>

**For correspondence:** *Ravshan I. Ataulakhanov*, MD, PhD, Prof., Head, Department of Immune Biotechnology, NRC Institute of Immunology FMBA, Russia, E-mail: [ravshan.ataullakhanov@gmail.com](mailto:ravshan.ataullakhanov@gmail.com)

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

**Acknowledgments.** *The work is executed at financial support of RGNF, grant 15-15-00102.*

Received 15.07.17

Accepted 16.08.17

## Введение

Клетки врождённого иммунитета распознают чужеродные агенты различной природы – вирусы, бактерии, грибы, простейшие – с помощью рецепторов, определяющих молекулярные образы патогенов (pattern recognition receptors, PRR). В соответствии со структурной организацией выделяют несколько семейств PRR: Toll-подобные (TLR), NOD-подобные (NLR), RIG-подобные рецепторы (RLR) и др. [4, 5].

TLR являются наиболее изученной группой PRR. Так, TLR1, TLR2, TLR4 и TLR5 встроены во внешнюю мембрану клеток, TLR3, TLR7/8 и TLR9 локализируются в мембранах внутриклеточных органелл – эндосом и фагосом. TLR распознают такие структурные компоненты бактерий, как липопроtein, липопептид, пептидогликан (TLR1, 2 и 6), липополисахарид (TLR4) и флагеллин (TLR5), или консенсусные структуры чужеродных нуклеиновых кислот dsRNA (TLR3), ssRNA (TLR7/8) и CpG-DNA (TLR9) [6]. NLR локализируются в цитозоле. Рецепторы этого типа NOD1 и NOD2 распознают компоненты пептидогликана клеточной стенки бактерий – диаминопимелиновую кислоту и мурамилдипептид соответственно [7]. Другие представители RLR, в частности MDA5 и LGP2, распознают молекулы двухцепочечной вирусной РНК и служат цитоплазматическими сенсорами вирусной инфекции [8]. Такая 3-уровневая компартиментализация сенсорных рецепторов (внешняя мембрана, цитозоль, эндосома) обеспечивает надёжную детекцию клеткой вторгшихся возбудителей инфекции.

Несмотря на довольно большое разнообразие PRR и их агонистов, в активированной клетке задействуется ограниченное количество сигнальных путей, обеспечивающих передачу активационного сигнала и индукцию защитных реакций в ответ на инфекцию. В сигналинг с рецепторов PRR главным образом вовлечены 3 внутриклеточных сигнальных пути: MAPK-, NF- $\kappa$ B- и IRF-пути (рис. 1). Для трансдукции активационного сигнала в клетку TLR способны задействовать все 3 сигнальные оси. Связавшись со своим агонистом, TLR через TIR-домен активируют адапторные белки MyD88 или TRIF. В зависимости от задействованных адапторных молекул TLR-сигнальные пути подразделяют на MyD88- и TRIF-зависимые. Большинство известных TLR активируют MyD88-зависимый путь, исключение составляют TLR3 и TLR4. TLR3 активирует ответ клетки через сигнальную ось TRIF → IRF, а TLR4 активирует одновременно MyD88- и TRIF-сигнальные пути. MyD88 через протеинкиназы IRAK передаёт сигнал на цитозольный адаптерный белок TRAF-6, способный к убиквитинилированию и активации киназы TAK1. TAK1 определяет передачу сигнала на NF- $\kappa$ B-ось TLR-сигнального каскада в результате фосфорилирования комплекса IKK $\alpha\beta\gamma$ . Фосфорилирование IKK $\alpha\beta\gamma$  под действием TAK1 инициирует деградацию I $\kappa$ B, ингибитора

транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B. Высвобожденный из ингибиторного комплекса NF- $\kappa$ B транслируется в ядро, где активирует подконтрольные гены. Помимо NF- $\kappa$ B-пути TAK1 передаёт сигнал на митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK-путь) – p38, Erk1/2 и JNK, последние участвуют в активации транскрипционных факторов AP-1 и Elk-1. В случае TRIF-зависимого пути адаптерный белок TRIF передаёт активационный сигнал на IKK-подобную киназу TBK1. TBK1 в результате фосфорилирования транскрипционных факторов семейства IRF активирует в клетках IRF-сигнальный путь, обеспечивающий интерфероновый ответ клетки на инфекцию. NLR (NOD1 и NOD2) подобно TLR через протеинкиназу TAK1 индуцируют NF- $\kappa$ B- и MAPK-сигнальные пути в клетке. RLR через TBK-1 стимулируют активацию IRF-пути [4–8].

Патогены содержат в своём составе множество молекул различной природы, которые распознаются рецепторами PRR как агонисты [9]. В условиях реальной инфекции разные PPR и связанные с ними внутриклеточные сигнальные пути активируются одновременно, приводя к индукции ответа клеток, адекватно вторгшейся в организм инфекции [4, 9]. Кооперация внутриклеточных сигнальных путей от нескольких PRR может вызывать синергическое усиление ответа клетки. Так, одновременное воздействие на клетки сочетанием нескольких агонистов PRR индуцировало синергическую активацию продукции клетками широкого спектра защитных субстанций и провоспалительных цитокинов [4, 9–12]. Имеются также сообщения, что перекрёстная активация нескольких PPR-путей в клетке может подавлять и ингибирование реакций врождённого иммунитета [13–15]. В целом можно отметить, что точные механизмы взаимодействия разных сигнальных путей исследованы недостаточно, и не сформировано научное представление, где и каким образом в клетке формируются синергический или антагонистический ответы при активации двух или более агонистов PRR.

Несмотря на отсутствие системных представлений, имеются полезные фактические сведения о молекулярных процессах в клетке при воздействии сочетанием TLR-агонистов [10]. Комбинация агонистов TLR3+TLR8 приводит к усиленной продукции IL-12, как считают авторы, в результате взаимодействия NF- $\kappa$ B-, IRF-, MAPK-, PI3K- и STAT-сигнальных путей [16]. Ингибирование NF- $\kappa$ B-, JNK-, p38-, cJun- и ERK-путей в клетке отменяет синергическую продукцию провоспалительных цитокинов [16–19]. При этом вклад каждого пути в синергическую продукцию конкретного цитокина неравнозначен. JNK- и ERK-пути главным образом регулируют синергическую продукцию TNF, IL6 и IL12, а p38 - продукцию IL12 [16, 20–22]. В ряде работ обнаружено соответствие уровня активации транскрипционных факторов и отдельных компонентов PRR-сигнальных путей с синергическим ответом

клеток на сочетанное действие агонистов PRR. Так, показано, что синергическое действие агонистов TLR3+TLR7 сопровождается повышенным уровнем фосфорилирования ERK в клетках [19], а снижение активности JNK отменяет синергическую продукцию TNF по действию TLR4+TLR9 [22]. Показано участие транскрипционного фактора IRF5 в синергической продукции провоспалительных цитокинов в макрофагах, активированных TLR3+TLR9 [10]. Действие TLR4+TLR7 и TLR3+TLR7 вместе с синергической активацией клеток вызывает в них усиление и пролонгирование синтеза мРНК IB $\zeta$  – регулятора экспрессии ряда цитокинов [17].

Ранее нами исследовано действие двойных сочетаний агонистов TLR, NOD2, TLR9 на макрофаги мыши [1, 2, 23]. Усиленная макрофагами продукция провоспалительных цитокинов и противомикробных субстанций под влиянием парных сочетаний агонистов TLR4+NOD2, TLR9+NOD2, TLR4+NOD2, TLR4+TLR9 [1, 2] сопровождалась возрастанием активности транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B в клетках [2], что указывало на возможность интеграции двух PRR-сигнальных путей на уровне активации NF- $\kappa$ B-пути. В настоящей работе мы исследовали взаимодействие PRR-сигналов на уровне отдельных компонентов NF- $\kappa$ B-, MAPK- и IRF-путей при действии на клетки тройной комбинацией агонистов TLR4+NOD2+TLR9 в сравнении с воздействием одиночными агонистами этих же рецепторов и их парными сочетаниями.

## Материал и методы

### Реактивы и антитела

В работе использованы агонисты Toll-подобных рецепторов: липополисахарид из *E. coli* серотип 055:B5 (LPS, агонист TLR4, Sigma, L-2880), ODN CpG-1826 (CpG, агонист TLR9, Invitrogen), L18-MDP (MDP, агонист NOD2-рецептора, Invitrogen).

В работе также применяли моноклональные антитела к следующим белкам: Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (T202/204) (Cell signaling, 4370), Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536), (Cell signaling, 3033S),  $\beta$ -актин (Cell signaling, 4967S), c-Fos (Ser32) (D82C12) (Cell signaling, 5348), NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) (Cell signaling, 3033S), Phospho-IKK-alpha/beta (S176/180) (Cell signaling, 2697S), Phospho-TBK1/NAK (Ser172) (D52C2) (Cell signaling, 5483S), Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (T202/204) (Cell signalling, 4370), Phospho IRF-3(S396) (Cell signaling, 29047S),  $\beta$ -actin (Cell signaling, 4970S), и GAPDH (Abcam, ab22555)

### Животные

Мышей линии BALB/c в возрасте 8–10 нед, полученных из питомника «Столбовая», содержали на стандартной диете в стандартных условиях вивария ГНЦ «Института иммунологии» ФМБА России.

### Культуры клеток

Все культуры клеток инкубировали в полной среде (ПС), составленной из DMEM с 25 мМ HEPES, дополненной коктейлем заменимых аминокислот, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия, 50 мкМ  $\beta$ -меркаптоэтанола и 10 мкг/мл гентамицина (все реактивы фирмы «ПанЭко») при 37°C в увлажнённой атмосфере с 5% CO $_2$ .

Костномозговые макрофаги получали *in vitro* дифференцировкой клеток костного мозга мышей BALB/c в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колонистимулирующего фактора (GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, Sigma). Костный мозг вымывали из бедренных и больших берцовых костей мыши, эритроциты удаляли осмотическим лизисом, ядродержащие клетки дважды отмывали PBS, после чего культивировали в ПС с добавлением 10 нг/мл GM-CSF (Sigma) в течение 7 дней. К окончанию этого срока адгезионная культура клеток была на 95% представлена макрофагами. Монослой адгезионных клеток промывали (PBS, 0,5%

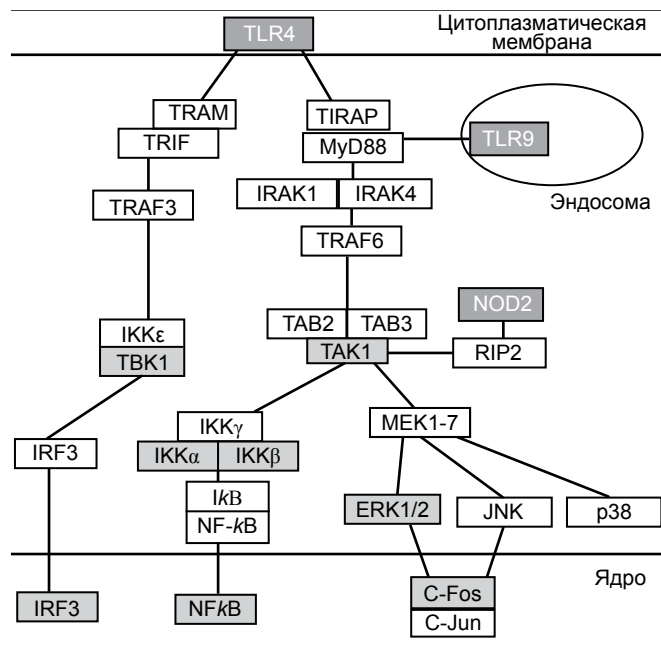


Рис. 1. Взаимодействие TLR4-, NOD2- и TLR9-сигнальных путей в клетке.

Серым выделены компоненты сигнальных путей, исследованные в настоящей работе.

BSA), выдерживали в растворе Версена (ПанЭко) в течение 1 ч при 37°C и смывали (PBS, 0,5% BSA) тщательным пипетированием. Полученную культуру макрофагальных клеток использовали в дальнейших экспериментах.

### Вестерн-блот

Клетки трижды промывали охлаждённым фосфатно-солевым буфером и подвергали лизису (Invitrogen, Cell Extraction Buffer, FNN0011) в присутствии ингибиторов протеаз (Sigma, P2714-1BTL) 30 мин при 4°C. Клеточные лизаты осветляли центрифугированием (14,000 · g; 10 мин; 4 °C), после чего в них измеряли концентрацию клеточных белков (Pierce, Protein Assay Reagent, 23225). Полученную смесь белков (10–40 мкг) разделяли в 8% SDS-ПААГ и переносили на PVDF-мембрану (Amersham, Hybond-P). Для детекции целевых белков мембрану последовательно в течение 1 ч инкубировали с первичными антителами к Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) (Cell signaling, 3033S), Phospho-TAK1(T184/187) (Cell signaling, 4508S), Phospho-IKK-alpha/beta (S176/180) (Cell signaling, 2697S), Phospho-TBK1/NAK (Ser172) (D52C2) (Cell signaling, 5483S), Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (T202/204) (Cell signalling, 4370), Phospho IRF-3(S396) (Cell signaling, 29047S), c-Fos (Ser32) (Cell Signaling, 5348),  $\beta$ -actin (Cell signaling, 4970S), и GAPDH (Abcam, ab22555) в разведении 1:1000 и со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в разведении 1:1 000 000 (Sigma, A0545-1ML). Визуализацию результатов осуществляли методом хемилюминесценции (Pierce, SuperSignal West Femto Maximum sensitivity, 34095). Интенсивность окраски пятен целевых белков нормировали на значения интенсивности пятен GAPDH и делили на значение в контроле (точка «0 минут»).

### Анализ внутриклеточного содержания фосфорилированного транскрипционного фактора c-Fos в макрофагах методом проточной цитометрии

Клетки фиксировали раствором 4% параформальдегида в течение 10 мин при 37°C, отмывали и пермеабилizировали холодным (-20°C) метанолом в течение суток при -20°C. По-

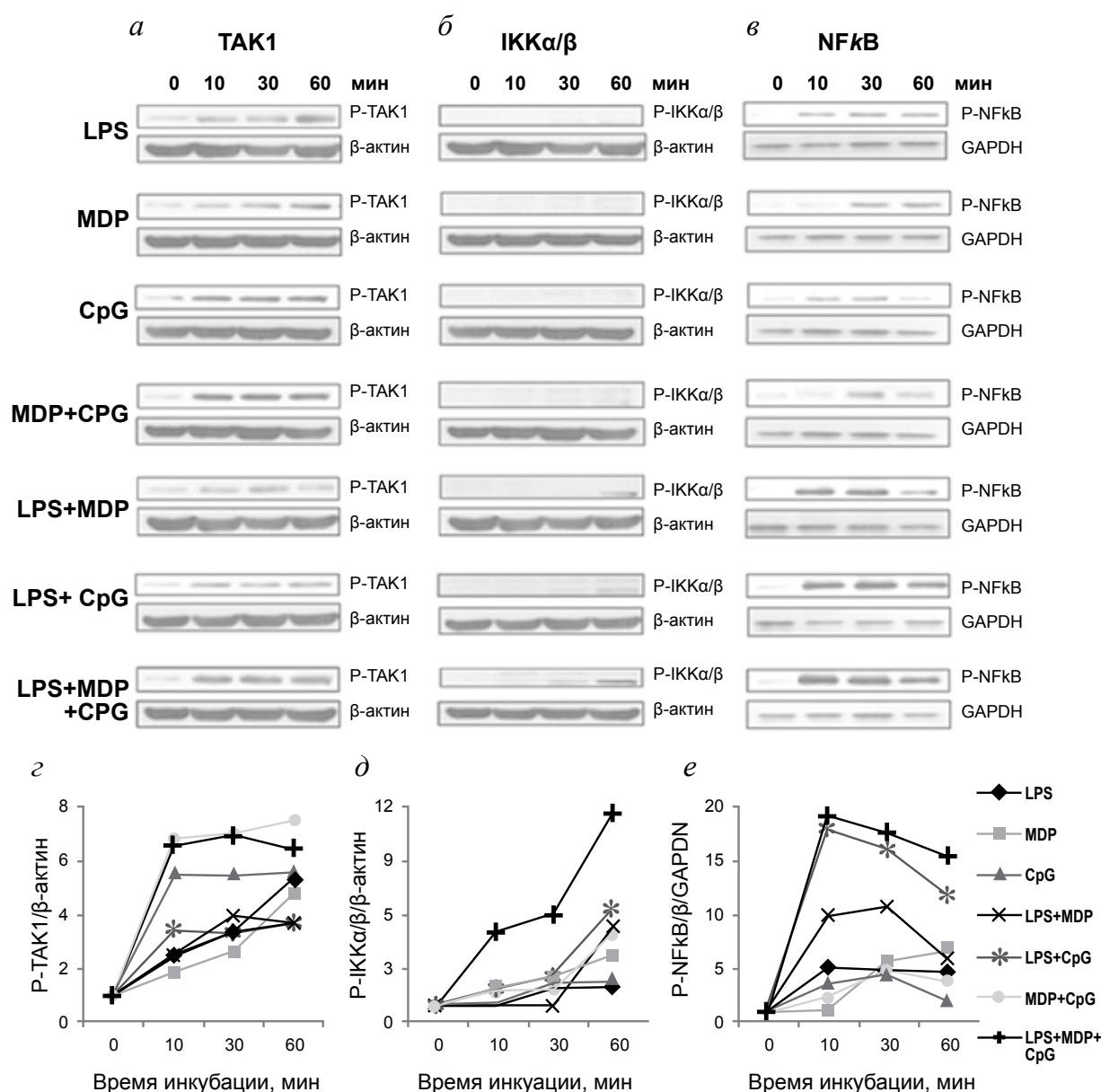


Рис. 2. Кинетика активации NF-κB-сигнального пути в макрофагах мыши при комбинированном воздействии на 3 рецептора врождённого иммунитета.

TLR4, TLR9 и NOD2. Клетки инкубировали 0 – 60 мин. в присутствии LPS 5 нг/мл, MDP 200 нг/мл, CpG 200 нг/мл и их различных комбинаций. В клеточных лизатах анализировали активность P-TAK1 (а, г), P-IKKα/β (б, д), P-NFκB (в, е) методом вестерн-блота с использованием специфических антител к целевым белкам, GAPDH и β-актин использовали в качестве вторичными anti-Rabbit-Ig AF488 (Invitrogen). Анализ флуоресценции меченых клеток проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSAria II.

Результаты и обсуждение

**Активация NF-κB-сигнального пути в макрофагах мыши под действием агонистов TLR4, TLR9 и NOD2**

NF-κB-сигнальный путь объединяет последовательность реакций, обеспечивающих активацию транскрипционного

фактора NF-κB в клетке (рис. 1). В отсутствии инфекции NF-κB локализуется в цитоплазме клетки в комплексе со своим ингибитором IκB. Диссоциация IκB – необходимое условие для высвобождения транскрипционно-активной формы NF-κB. Сигнальные каскады, инициированные взаимодействием агонистов с PRR, обеспечивают диссоциацию от NF-κB и деградацию IκB. Ключевую роль в этом играет IκB-киназный (IKK) комплекс. IKK – гетеродимер, состоящий из субъединиц IKKα, IKKβ и IKKγ. Две субъединицы – IKKα и IKKβ – обладают каталитической активностью, а IKKγ является регуляторной субъединицей комплекса. Аго-

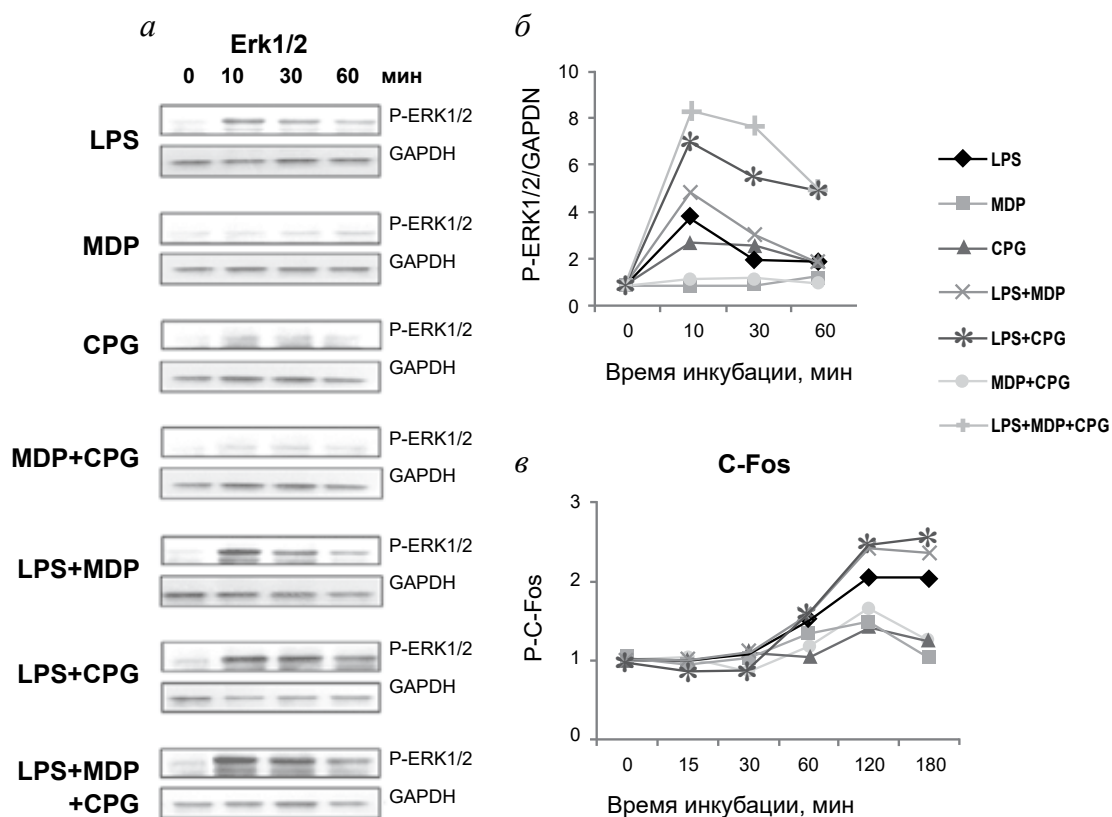


Рис. 3. Кинетика активации MAPK-сигнального пути в макрофагах мыши при комбинированном воздействии на 3 рецептора врождённого иммунитета.

TLR4, TLR9 и NOD2. Клетки инкубировали 0 – 60 мин. в присутствии LPS 5 нг/мл, MDP 200 нг/мл, CpG 200 нг/мл и их различных комбинаций. В клеточных лизатах анализировали активность P-Erk1/2 (а, б) и P-c-Fos (в). P-Erk1/2 (а, б) детектировали методом вестерн-блота с использованием специфических антител к белкам, GAPDH использовали в качестве нормировочного белка. Визуализацию результатов осуществляли методом химилюминесценции (а). Интенсивность белковых пятен анализировали с помощью программы «ImageJ», для количественной оценки результатов интенсивность окраски пятен целевых белков нормировали на значения интенсивности пятен GAPDH и делили на значение в контроле (точка «0 минут») (б). Активность P-c-Fos (в) детектировали методом внутриклеточного окрашивания белков с последующим анализом флуоресценции клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSAria II. Приведены средние значения и стандартные отклонения по двум культуральным параллелям, нормированные на значение в контроле без активации.

нисты TLR и NOD2-рецепторов через киназу TAK1 индуцируют активацию ИКК-комплекса. Для активации TAK1 агонисты TLR инициируют TRAF6 (E3 убиквитин лигаза), а агонисты NOD2 действуют через адапторный белок RIP2. Активированный TAK1 передаёт сигнал на ИКК-комплекс, и каталитические субъединицы ИКК-комплекса фосфорилируют ИкВ. Фосфорилированная форма ИкВ отсоединяется от NF-кВ, подвергается убиквитинилированию и последующей протеосомной деградации. Освободившийся NF-кВ транспортируется в ядро, где активирует экспрессию генов, которые регулируются этим транскрипционным фактором [1–5].

На рис. 2 представлены результаты исследования активности компонентов NF-кВ-пути в макрофагах, активированных тройной комбинацией агонистов TLR4+NOD2+TLR9 в сравнении с активацией отдельными агонистами TLR4, NOD2 и TLR9 или их парными сочетаниями TLR4+NOD2, TLR4+TLR9, TLR9+NOD2. Для этого клетки инкубировали в течение 0, 10, 30 или 60 мин в присутствии одиночных агонистов LPS (5 нг/мл, TLR4), MDP (200 нг/мл, NOD2) и CpG (2,5 мкг/мл, TLR9) или их сочетаний по 2 и 3. Уровень активности компонентов PRR-путей в клеточных экстрактах анализировали методом вестерн-блоттинга с использованием специфических антител к интересующим белкам. Результаты наших экспериментов по активации ключевых белков

NF-кВ-пути представлены как активация TAK1 (см. рис. 2, а, з), ИКК $\alpha$ , ИКК $\beta$  (см. рис. 2, б, д), NF-кВ (см. рис. 2, в, е).

Об активации киназы TAK1 в клетке свидетельствует её фосфорилирование в положении Thr184/187 (P-TAK1). На рис. 2, а, з видно, что все исследуемые агонисты PRR индуцировали накопление (P-TAK1) через 10 мин после воздействия на клетки. CpG индуцировал наибольший уровень P-TAK1 в клетках по сравнению с агонистами TLR4 и NOD2. После активации макрофагов CpG уровень P-TAK1 в клетках максимально сохранялся в течение 10–60 мин. Агонисты TLR4 и NOD2 проявили схожую активность в отношении фосфорилирования TAK1. Уровень P-TAK1 в клетках, активированных LPS и MDP, постепенно нарастал и достигал максимума на 60-й минуте. Сочетание 2 агонистов MDP+CpG вызывало более высокий уровень P-TAK1 в клетках по сравнению с одиночным действием CpG и MDP. Активация макрофагов сочетанием LPS+MDP, LPS+ CpG, напротив, приводила к снижению уровня P-TAK1 относительно действия CpG, LPS и MDP.

Таким образом, из всех исследованных нами парных сочетаний агонистов лишь комбинация агонистов TLR9+NOD2 привела к усилению активности TAK1, остальные парные сочетания агонистов PRR имели отрицательный эффект на активность TAK1 в клетках. Интересно, что одновременная



активация в клетках всех трёх исследуемых сигнальных PRR-путей (TLR9, TLR4, NOD2) индуцировала промежуточный уровень активности P-TAK1. Действие комбинации из тройного сочетания агонистов CpG+LPS+MDP превысило стимулирующую активность LPS, MDP, CpG, LPS+MDP, LPS+CPG, но оказалось менее эффективным относительно действия GPG+MDP на активацию TAK1.

В составе NF-kB-сигнального каскада TAK1 передаёт активационный сигнал на киназный комплекс IKK $\alpha/\beta$ . Об уровне активности IKK $\alpha/\beta$  в клетках свидетельствует его фосфорилирование в положении Ser176/180 (P-IKK $\alpha/\beta$ ). В наших экспериментах максимальная активность IKK $\alpha/\beta$  детектировалась через 60 мин после воздействия PRR-агонистами и их сочетаниями (см. рис. 2, б, д). Одиночные агонисты CpG, LPS, MDP проявили слабую активность в отношении индукции фосфорилирования IKK $\alpha/\beta$ -комплекса. Уровень активности IKK $\alpha/\beta$  в клетках, активированных двойными сочетаниями агонистов CpG+MDP, LPS+MDP, LPS+CpG превысил одиночное действие каждого из них. Максимальный уровень активности IKK $\alpha/\beta$ -комплекса обнаружен при действии на клетки тройным сочетанием агонистов LPS+MDP+CpG. P-IKK $\alpha/\beta$ -комплекс обеспечивает деградацию I $\kappa$ B и активацию NF-kB. Транскрипционно-активный NF-kB фосфорилирован в положении Ser536 в составе p65 субъединицы (P-NF-kB). Все исследуемые агонисты PRR стимулировали активацию NF-kB, однако кинетика активации NF-kB в клетках, активированных разными агонистами PRR, заметно различалась (см. рис. 2, в, е). После активации LPS активная форма NF-kB детектировалась в клетках через 10 мин. Уровень P-NF-kB, индуцированный LPS, сохранялся на протяжении всего времени наблюдения (10–60 мин). NF-kB также был активирован через 10 мин после активации макрофагов CpG, но через 60 мин уровень P-NF-kB в клетках резко снижался. MDP стимулировал фосфорилирование NF-kB через 30 мин после активации, сохраняя его активность до 60 мин наблюдения. Ответ клеток на сочетания двух агонистов LPS+MDP или LPS+CpG был более интенсивным, чем на одиночные агонисты LPS, MDP и CpG, при этом наблюдалась более ранняя кинетика активации NF-kB. При действии на клетки сочетанием MDP+CpG усиления активации NF-kB не обнаружено, в клетках детектировалась поздняя кинетика активации NF-kB, характерная для MDP. Тройная комбинация LPS+MDP+CpG значительно превысила одиночное действие каждого агониста и сочетания двух агонистов LPS+MDP, однако совпадало по уровню с ответом на двойное сочетание LPS+CpG. Таким образом, практически все исследованные двойные и тройные сочетания агонистов PRR, за исключением MDP+CpG, синергически активировали NF-kB в клетках, и возрастание уровня P-NF-kB в клетках сопровождалось ускоренной кинетикой активации этого транскрипционного фактора.

Следует заметить, что возрастание уровня активности NF-kB в клетках (см. рис. 2, в, е), активированных сочетаниями агонистов LPS+MDP, LPS+CpG, LPS+MDP+CpG, хорошо согласуется с повышенным уровнем активности IKK $\alpha/\beta$ -комплекса в этих же клетках (см. рис. 2, б, д). Поэтому можно предположить, что активационные сигналы от TLR3, TLR9 и NOD2 кооперируют на уровне IKK $\alpha/\beta$ -комплекса. Вероятно, возрастание активности комплекса IKK $\alpha/\beta$  при активации макрофагов сочетаниями агонистов LPS+MDP, LPS+CpG или LPS+MDP+CpG обеспечивает повышенное содержание в клетках P-NF-kB. При этом уровень активности P-TAK1 (см. рис. 2, а, з) в активированных клетках не повышается в согласии с содержанием P-NF-kB (см. рис. 2, в, е) в этих же клетках. Следовательно, TAK-1 не является ни лимитирующим, ни ключевым звеном при активации макрофагов сочетанием двух агонистов LPS+MDP или LPS+CpG. Минимального количества активной формы TAK1 достаточно для усиления активности P-NF-kB в клетке под влиянием

LPS+MDP и LPS+CpG. Возможно, P-TAK1 не играет критической роли в синергической интеграции TLR4-, TLR9- и NOD2-путей на уровне NF-kB-сигнального каскада.

Известно, что активационный сигнал от PRR-рецепторов с P-TAK1 в клетке перераспределяется между NF-kB- и MAPK-сигнальными каскадами. Это может объяснить несоответствие уровня активности NF-kB и TAK1 в исследуемых клетках. Поэтому мы исследовали эффективность активации MAPK-сигнального пути при воздействии на макрофаги тройной комбинацией TLR4+TLR9+NOD2 в сравнении с активацией отдельными агонистами и их парными сочетаниями.

#### **Активация MAPK-сигнального пути в макрофагах мыши под действием агонистов TLR4, TLR9 и NOD2, и их сочетаний**

MAPK-сигнальный путь передаёт активационный сигнал с PRR на три MAPK-киназы: ERK1/2, p38 и JNK. Эти MAPK-киназы задействованы в активации транскрипционного фактора AP-1. AP-1 – гетеродимер, состоящий из двух субъединиц c-Jun и c-Fos [3, 8].

Мы исследовали уровень активности MAPK-киназы ERK1/2 и субъединицы c-Fos транскрипционного фактора AP-1 при воздействии на костномозговые макрофаги одиночными агонистами TLR4, TLR9 и NOD2, их парными сочетаниями или тройной комбинацией TLR4+TLR9+NOD2 (рис. 3). Об активности ERK1/2 в клетках судили по фосфорилированию p42/p44-субъединиц белка в положении Thr202/Tyr204 (P-ERK1/2). TLR4-агонист LPS вызывал наибольшую активацию ERK1/2 киназы в макрофагах (см. рис. 3, а, б). Активация ERK1/2 (P-ERK1/2) в макрофагах достигала максимума через 10 мин после их активации LPS, к 60-й минут наблюдения уровень P-ERK1/2 в клетках постепенно снижался. По активации ERK1/2 CpG оказывал меньший эффект по сравнению LPS, а MDP практически не активировал накопления P-ERK1/2 в клетках. Совместное действие MDP+CpG приводило к ингибированию активации ERK1/2 относительно одиночного действия CpG. В то же время сочетания агонистов LPS+MDP и LPS+CpG индуцировали значительный прирост количества P-ERK1/2 в клетках по сравнению с действием LPS, CpG и CpG+MDP. Наибольший эффект в усилении активности ERK1/2 оказало тройное сочетание агонистов LPS+MDP+CpG.

P-ERK1/2 передаёт активационный сигнал на c-Fos, субъединицу транскрипционного фактора AP-1. Для детекции активности c-Fos в клетках использовали внутриклеточное окрашивание с последующим анализом флуоресценции окрашенных клеток методом проточной цитометрии. Признак активации c-Fos в клетке – наличие в его составе фосфоэпитопа в положении Ser32 (P-c-Fos). Из рис. 3, в видно, что LPS по сравнению с CpG и MDP индуцировал наибольший уровень активации c-Fos в клетках. Активационное действие сочетания двух агонистов LPS+MDP или LPS+CPG или комбинации трёх агонистов LPS+MDP+CPG превысило одиночное действие каждого агониста в отдельности. Сочетание MDP+CPG не индуцировало усиленного накопления P-c-Fos в клетках.

Следует заметить, что уровень активности c-Fos (см. рис. 3, в), индуцированный отдельными агонистами TLR4, TLR9 и NOD2 или их сочетаниями коррелирует с содержанием активной формы ERK1/2 в этих же клетках (см. рис. 3, а, б). Однако уровень P-TAK (см. рис. 2, а, з) не соответствовал уровню активных форм исследованных компонентов MAPK-пути (c-Fos и ERK1/2) в этих же клетках. В частности, при воздействии LPS+MDP и LPS+CPG наблюдалась минимальный уровень P-TAK, но максимальная активация P-c-Fos и P-ERK1/2 в этих же клетках. Напротив, при активации макрофагов MDP+CPG максимальный уровень P-TAK1 сопровождался низким уровнем активности ERK1/2 и отсутствием активации P-c-Fos.

Таким образом, на уровне активации сигнальной оси ERK1/2 → P-c-Fos MAPK-сигнального пути нами обнаружена синерги-

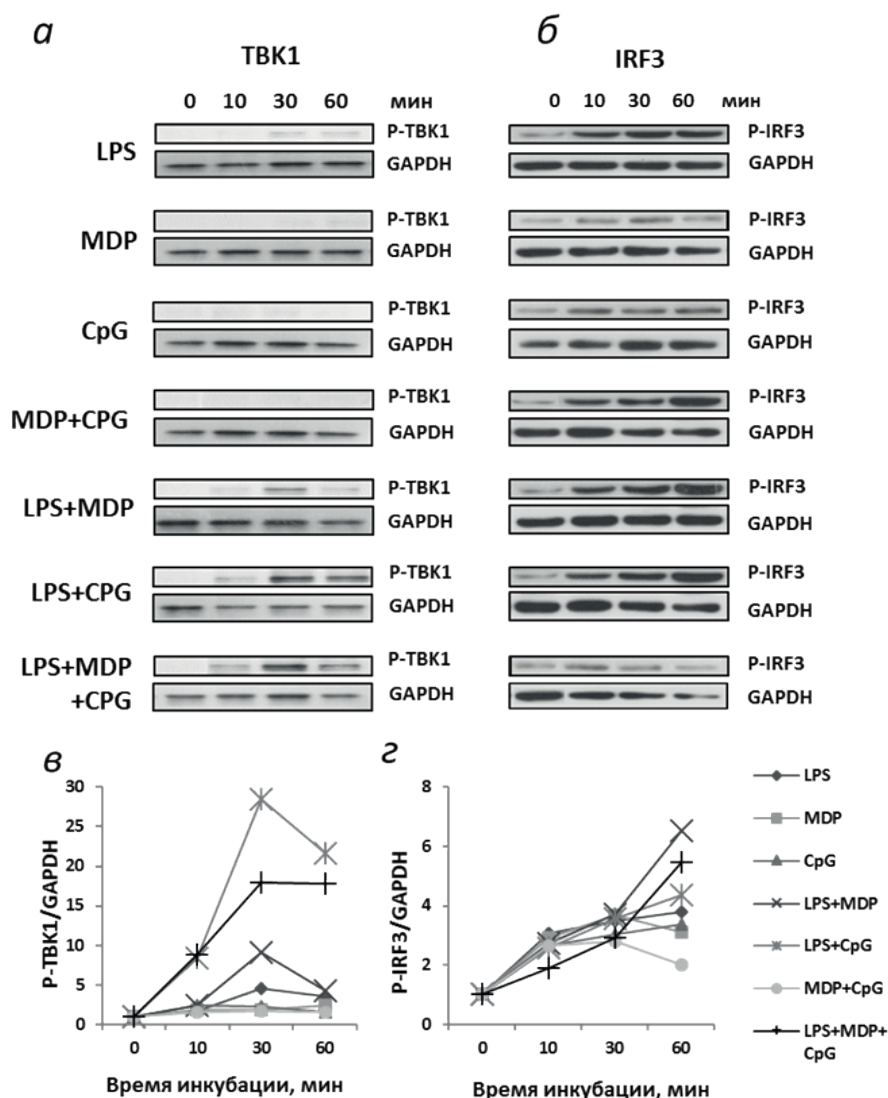


Рис. 4. Кинетика активации IRF-сигнального пути в макрофагах мыши при комбинированном воздействии на 3 рецептора врождённого иммунитета.

TLR4, TLR9 и NOD2. Клетки инкубировали 0 – 60 мин. в присутствии LPS 5 нг/мл, MDP 200 нг/мл, CpG 200 нг/мл и их различных комбинаций. В клеточных лизатах анализировали активность P-TBK1 (а, в), P-IRF3 (б, г), методом вестерн-блота с использованием специфических антител к целевым белкам, GAPDH использовали в качестве нормировочных белков. Визуализацию результатов осуществляли методом хемилюминесценции (а, б). Интенсивность белковых пятен анализировали с помощью программы «ImageJ», для количественной оценки результатов интенсивность окраски пятен целевых белков нормировали на значения интенсивности пятен GAPDH и делили на значение в контроле (точка «0 минут») (в, г).

ческая кооперация при воздействии на макрофаги сочетаниями агонистов TLR4+TLR9, TLR4+NOD2 и TLR4+TLR9+NOD2. При этом активность компонентов оси ERK1/2 → P-c-Fos не зависит от активности P-TAK1. Однако нами исследована активность лишь одной из трёх MAPK-киназ, активируемых агонистами PRR, и не следует исключать возможности неравномерного распределения сигнала с P-TAK между MAPK-киназами ERK1/2, p38 и JNK. Влияние сочетанного действия агонистов TLR4, TLR9, и NOD2 на активность ERK1/2, p38 и JNK послужит предметом дальнейшего исследования.

**Активация IRF-сигнального пути в макрофагах под действием агонистов TLR4, TLR9 и NOD2**

IRF-сигнальные пути получили своё название от активируемых ими транскрипционных факторов – регулятор-

ных факторов интерферонов (Interferon regulatory factors, IRF). Активация IRF обеспечивает интерфероновый ответ клетки на инфекцию. В результате PRR-сигнальных каскадов происходит фосфорилирование IRF (P-IRF), молекулы P-IRF димеризуются и транслоцируются в клеточное ядро, где активируют гены, транскрипция которых контролируется этими транскрипционными факторами. Многие агонисты PRR способны к активации IRF в клетке [3, 8], задействуя для этого разные адапторные белки. Одним из белков, способных передавать активационный сигнал от PRR на IRF, является киназа TBK1. TBK1 передаёт активационный сигнал на IRF3, используя белки сигнальной оси TRIF→IRF, в частности TRIF, TRAM и TRAF3.

Для того чтобы проследить возможность интеграции PRR-сигнальных каскадов на уровне IRF-пути, мы исследовали активность TBK1 и IRF3 в макрофагах, активированных тройной комбинацией TLR4+TLR9+NOD2 в сравнении с активацией отдельными агонистами и их парными сочетаниями. На рис. 4, а и б представлены результаты измерения активности TBK1 в активированных клетках. Об активности TBK1 в клетках судили по его фосфорилированию в положении Ser172 (P-TBK1). Через 30 мин после воздействия LPS можно было наблюдать слабую активацию TBK1 в макрофагах. CpG, MDP и их сочетание CpG+MDP не индуцировали накопления P-TBK1. Известно, что роль адаптора для передачи сигнала от PRR на TBK1 выполняет TRIF [4, 9]. Среди исследуемых агонистов PRR лишь LPS использует TRIF для передачи сигнала от TLR4 на TBK1. По-видимому, это объясняет, почему мы наблюдали накопление P-TBK1 при активации клеток LPS, но не MDP, CpG или CpG+MDP. Интересно, что сочетания LPS+MDP, LPS+CpG, LPS+MDP+CpG были более эффективны в активации TBK1, чем LPS, хотя MDP, CpG и MDP+CpG не влияли на активность TBK1 в макрофагах.

Субстратом для P-TBK1 является транскрипционный фактор IRF3. Об активации IRF3 свидетельствует его фосфорилирование в положении Ser396 (P-IRF3). На рис 4, б, г видно, что накопление P-IRF3 детектировалось в клетках

через 30 мин после воздействия LPS. CpG, MDP и CpG+MDP не активировали IRF3, что соответствует уровню активности TBK1 в этих же клетках (см. рис. 3, а, в). Однако в отличие от TBK1, сочетания агонистов LPS+MDP, LPS+CpG, LPS+MDP+CpG не стимулировали повышенного накопления P-IRF3 в клетках. Известно, что активационный сигнал с TBK1 может перераспределяться на IKKαβγ-комплекс, обеспечивая TRIF-зависимую активацию NF-κB [4, 9]. Возрастное накопление P-NF-κB под действием сочетаний агонистов LPS+MDP, LPS+CpG и LPS+MDP+CpG (см. рис. 2, в, е) соответствует повышенному уровню TBK1 в этих же клетках (см. рис. 4, а, в). Поэтому можно предположить, что TBK1 усиливает активность NF-κB в результате кооперации TLR4-, NOD2- и TLR9-сигнальных путей в клетках.

Таким образом, интеграция TLR4-, TLR9- и NOD2-сигнальных путей приводит к повышенной активности TBK1 в клетках. Однако возрастание активности TBK1 не сопровождается усилением транскрипционной активности IRF3. По-видимому, IRF3 не принимает участие в интеграции TLR4-, TLR9- и NOD2 в клетке

### Заключение

Мы исследовали взаимодействие TLR4-, TLR9- и NOD2-сигнальных путей в макрофагах костномозгового происхождения, активированных одиночными агонистами LPS, MDP и CPG, их парными сочетаниями или тройной комбинацией. Интеграция сигнальных путей, идущих от TLR4, TLR9 и NOD2-рецепторов, приводит к возрастанию активности протеинкиназ TAK1, IKK $\alpha/\beta$ , ERK1/2 и TBK1, являющихся звеньями NF- $\kappa$ B-, MAPK- и IRF-сигнальных осей. Усиление активационного сигнала в результате кооперации компонент NF- $\kappa$ B-, MAPK- и IRF-сигнальных путей индуцирует повышенный уровень транскрипционно-активных форм NF- $\kappa$ B и AP-1, но не влияет на уровень активности IRF3. Вероятно, повышенная активность указанных транскрипционных факторов обеспечивает синергическую продукцию провоспалительных цитокинов при активации макрофагов сочетанием агонистов TLR4, TLR9 и NOD2 [1, 3].

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 15-15-00102.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (Пп. 4—23 CM. REFERENCES)

- 1 Пичугин А.В., Багаев А.В., Лебедева Е.С., Чулкина М. М., Атауллаханов Р.И. Синергическая продукция цитокинов дендритными клетками в ответ на одновременную активацию парами агонистов различных рецепторов врожденного иммунитета. *Иммунология*. 2017; 38(1): 83–9.
- 2 Лебедева Е.С., Багаев А.В., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. NF- $\kappa$ B-, но не MAPK-сигнальный путь определяет синергический ответ макрофагов на одновременную активацию двух типов рецепторов TLR4 + NOD2 или TLR9 + NOD2. *Иммунология*. 2017; 38(2): 76–82.
- 3 Лебедева Е. С., Багаев А. В., Чулкина М. М., Пичугин А. В., Атауллаханов Р.И. Синергическое усиление транскрипции генов интерферонов I-го типа и цитокинов при активации макрофагов и дендритных клеток сочетанием двух агонистов PRR. *Иммунология*. 2017; 38(1): 76–83.

### REFERENCES

1. Pichugin A.V., Bagaev A.V., Lebedeva E.S., Chulkina M.M., Ataulakhanov R.I. Synergistic cytokine production by murine dendritic cells in response to their simultaneous activation with pairs of agonists of innate immune receptors. *Immunologiya*. 2017; 38(1): 83–9. (in Russian)
2. Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataulakhanov R.I. NF- $\kappa$ B-, but not MAPK-signaling pathway determines synergistic response of macrophages to the simultaneous activation of two types receptors TLR4 + NOD2 or TLR9 + NOD2. *Immunologiya*. 2017; 38(2): 76–82. (in Russian)
3. Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataulakhanov R.I. Synergistic activation of gene transcription encoding type I interferons and cytokines in macrophages and dendritic cells by the combinations of two PRR-agonists. *Immunologiya*. 2017; 38(1):76–83. (in Russian)
4. Thaiss C.A., Levy M., Itav S., Elinav E. Integration of Innate Immune Signaling. *Trends Immunol.* 2016; 37(2): 84–101.

5. Janeway C.A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1989; 54(1): 1–13.
6. Medzhitov R., Janeway C. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 2000; 8(10): 452–6.
7. Kim Y.K., Shin J.S., Nahm M.H. NOD-like receptors in infection, immunity, and diseases. *Yonsei Med. J.* 2016; 57(1): 5–14.
8. Loo Y.M., Gale M. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity*. 2011; 34(5): 680–92.
9. Trinchieri G., Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7(3): 179–90.
10. Ouyang X., Negishi H., Takeda R., Fujita Y., Taniguchi T., Honda K. Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 354(4): 1045–51.
11. Krummen M., Balkow S., Shen L., Heinz S., Loquai C., Probst H.C. et al. “Release of IL-12 by dendritic cells activated by TLR ligation is dependent on MyD88 signaling, whereas TRIF signaling is indispensable for TLR synergy. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 88(1): 189–99.
12. He H., Genovese K.J., Nisbet D.J., Kogut M.H. Synergy of CpG oligodeoxynucleotide and double-stranded RNA (poly I:C) on nitric oxide induction in chicken peripheral blood monocytes. *Mol. Immunol.* 2007; 44(12): 3234–42.
13. Re F., Strominger J.L. IL-10 Released by Concomitant TLR2 Stimulation Blocks the Induction of a Subset of Th1 Cytokines That Are Specifically Induced by TLR4 or TLR3 in Human Dendritic Cells. *J. Immunol.* 2004; 173(12): 7548–55.
14. Thaiss C.A., Elinav E. NF- $\kappa$ B Regulation by NLRs: T Cells Join the Club. *Immunity*. 2015; 42(4): 595–7.
15. Sato S., Nomura F., Kawai T., Takeuchi O., Mühlradt P.F., Takeda K. et al. Synergy and Cross-Tolerance Between Toll-Like Receptor (TLR) 2- and TLR4-Mediated Signaling Pathways. *J. Immunol.* 2000; 165(12):7096–101.
16. Makela S.M., Strengell M., Pietila T.E., Osterlund P., Julkunen I. Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 2009; 85(4): 664–72.
17. Napolitani G., Rinaldi A., Bertoni F., Sallusto F. Selected TLR agonist combinations synergistically trigger a TH 1 polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 2005; 6(8): 2166–217.
18. Zhu Q., Egelston C., Vivekanandhan A., Uematsu S., Akira S., Klinman D.M. et al. Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: implications for vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; 105(42): 16260–5.
19. Tukhvatulin A.I., Dzharrullaeva A.S., Tukhvatulina N.M., Shchablyakov D.V., Shmarov M.M., Dolzhikova I.V. et al. Powerful complex immunoadjuvant based on synergistic effect of combined TLR4 and NOD2 activation significantly enhances magnitude of humoral and cellular adaptive immune responses. *PLoS One*. 2016; 11(5): 1–24.
20. Bohnenkamp H.R., Papazisis K.T., Burchell J.M., Taylor-Papadimitriou J. Synergism of Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of T-helper cell type I responses. *Cell. Immunol.* 2007; 247(2): 72–84.
21. Mitchell D., Yong M., Schroder W., Black M., Tirrell M., Olive C. Dual stimulation of MyD88-dependent Toll-like receptors induces synergistically enhanced production of inflammatory cytokines in murine bone marrow-derived dendritic cells. *J. Infect. Dis.* 2010; 202(2): 318–29.
22. De Nardo D., De Nardo C.M., Nguyen T., Hamilton J.A., Scholz G.M. Signaling Crosstalk during Sequential TLR4 and TLR9 Activation Amplifies the Inflammatory Response of Mouse Macrophages. *J. Immunol.* 2009; 183(12): 8110–8.

## ВРОЖДЁННЫЙ ИММУНИТЕТ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.71-018.46-002.2-092:612.014.467

Гординская Н.А., Лебедев М.Ю., Алейник Д.Я., Рубцова Ю.П., Митрофанов В.Н., Живцов О.П.

## РОЛЬ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ОСТЕОМИЕЛИТА

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, 603155, Нижний Новгород, Россия

В работе проанализирована экспрессия и функциональная активность TLR2 и TLR4 на CD14+ клетках периферической крови пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей. Экспрессия TLR4 у всех пациентов была высокой и составляла 98,8%. По уровню экспрессии TLR2 выделены две группы пациентов с различным течением заболевания. В первой группе уровень экспрессии TLR2 при обострении процесса был достоверно ниже, чем во второй группе больных, в процессе лечения повышался с  $31,7 \pm 17,4$  до  $80,3 \pm 2,3\%$ , при этом их функциональная активность (продукция ФНО- $\alpha$  спонтанная и стимулированная) снижалась. Во второй группе пациентов при обострении остеомиелита экспрессия TLR2 на моноцитах составила  $70,7 \pm 8,05\%$ , после лечения снижалась до  $51,2 \pm 18,9\%$ , а их функциональная активность повышалась. На фоне однотипного лечения всех пациентов спонтанная выработка ФНО- $\alpha$  мононуклеарными клетками у больных второй группе снижалась, а стимулированная – повышалась. При стимуляции мононуклеарных клеток пептидогликаном выработка ФНО- $\alpha$  была достоверно выше ( $p < 0,05$ ) в первой группе. Эти изменения коррелировали с достоверно большим содержанием HLA-DR+, CD19+, CD3+DR+-клеток и клинически стойкой ремиссией после лечения в первой группе больных. После лечения у больных первой группы обострение хронического процесса не наблюдалось в период всего исследования. Максимальное время наблюдения составило полтора года ( $17 \pm 2$  мес). В противоположность этому у пациентов второй группы период до рецидива был значительно короче и составлял в среднем три с половиной месяца ( $3 \pm 0,5$  мес).

Выявлена связь между экспрессией и функциональной активностью TLR2 на CD14+ клетках периферической крови пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей ссылаются на 7 литературных источников, а в списке литературы приведены право его не писать с длительность ремиссии заболевания.

Ключевые слова: врожденный иммунитет; TLR; CD-рецепторы; интерлейкины; хронический остеомиелит.

Для цитирования: Гординская Н.А., Лебедев М.Ю., Алейник Д.Я., Рубцова Ю.П., Митрофанов В.Н., Живцов О.П. Роль TOLL-подобных рецепторов в патогенезе хронического остеомиелита. *Иммунология*. 2018; 39(1): 12-15. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-12-15>

Gordinskaya N.A., Lebedev M.Y., Aleynik D.Y., Rubtsova Y.P., Mitrofanov V.N., Zhivtsov O.P.

## ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC OSTEOMYELITIS

Federal State Budgetary Institution «Privolzhsky Federal Research Medical Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 603155, Nizhny Novgorod, Russia

The aim of this study was to analyze expression and functional activity of TLR2 and TLR4 on CD14+ peripheral blood cells in patients with chronic osteomyelitis of long bones. TLR4 expression in all patients was high and equaled to 98.8%. Depending on TLR2 expression level, patients were divided into two groups with different disease courses. The first group showed a significantly lower TLR2 expression level as compared to the second group of patients, and in the course of treatment it increased from  $31.7 \pm 17.4\%$  to  $80.3 \pm 2.3\%$  with a functional activity reduction (spontaneous and stimulated TNF-alpha production). The second group of patients developed TLR2 expression on monocytes equal to  $70.7 \pm 8.05\%$  at osteomyelitis aggravation; after treatment it reduced to  $51.2 \pm 18.9\%$ , and their functional activity increased. With similar treatment for all patients, spontaneous TNF-alpha production by mononuclear cells in the second group of patients reduced, while stimulated production increased. With stimulation of mononuclear cells by peptidoglycane, TNF-alpha production was significantly higher ( $p < 0,05$ ) in the first patient group. These changes correlated with a significantly higher content of HLA-DR+, CD19+, CD3+ DR+ cells and clinically stable remission after treatment in the first patient group. After provided treatment patients of the first group showed no aggravation of the chronic process throughout the research period. Maximum monitoring time was a year and a half ( $17 \pm 2$  months). By contrast to this, the time to relapse in patients of the second group was much shorter and was equal to three and a half months on the average ( $3 \pm 0.5$  months). The interrelation between the expression and functional activity of TLR2 on CD14+ peripheral blood cells of patients with chronic osteomyelitis of long tubular bones with a duration of remission of the disease.

Key words: Innate immunity; TLRs; CD-receptors; interleukins; chronic osteomyelitis.

For citation. Gordinskaya N.A., Lebedev M.Y., Aleynik D.Y., Rubtsova Y.P., Mitrofanov V.N., Zhivtsov O.P. Role of toll-like receptors in the pathogenesis of chronic osteomyelitis. *Immunologiya*. 2018; 39(1): 12-15. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-12-15>.

**For correspondence:** *Gordinskaya N.A.*, Dr. Sci. Med., Head of Laboratory Department Federal State Budgetary Institution «Privolzhsky Federal Research Medical Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, E-mail: [info@nniito.ru](mailto:info@nniito.ru)  
*Gordinskaya N.A.* <http://orcid.org/0000-0002-4146-0332>  
*Lebedev M.Y.* <http://orcid.org/0000-0001-5596-2619>  
*Aleynik D.Y.* <http://orcid.org/0000-0003-1482-4281>  
*Rubtsova Y.P.* <http://orcid.org/0000-0002-2781-6419>  
*Mitrofanov V.N.* <http://orcid.org/0000-0003-2046-3865>  
*Zhivtsov O.P.* <http://orcid.org/0000-0002-2809-1683>

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

**Acknowledgments.** *The study had no sponsorship.*

Received 12.09.17

Accepted 16.12.17

**Актуальность.** Хронический остеомиелит как любое хроническое заболевание приводит к многочисленным изменениям в иммунной системе. Многолетними исследованиями доказано снижение фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов у пациентов с остеомиелитом, уменьшение числа NK-клеток и CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, повышение CD8<sup>+</sup>-клеток и содержания про- и одновременно противовоспалительных цитокинов в периферической крови [1]. Однако выявленные иммунологические сдвиги не привели к объяснению причин хронического течения заболевания и очередных рецидивов процесса после ремиссии [2, 3].

Последнее десятилетие характеризуется активным изучением состояния врожденного иммунитета при различных инфекционных заболеваниях. Врожденный иммунитет рассматривают как наследственно закреплённую систему защиты многоклеточных организмов от любых патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также эндогенных продуктов тканевой деструкции [4–7]. При этом врожденная иммунная система обеспечивает распознавание и элиминацию патогенов в первые часы после вторжения антигена, когда механизмы адаптивного иммунитета еще не функционируют [8]. Являясь первой линией защиты от микробов, попадающих в организм человека, врожденная иммунная система распознает чужеродные молекулярные структуры (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны – ПАМП) с помощью многочисленных структур – паттернраспознающих рецепторов – PRR, к которым относятся сигнальные Toll-подобные (Toll-like receptors – TLRs), NOD-подобные и RIG-подобные рецепторы. TLRs – это семейство трансмембранных гликопротеинов, третичная структура которых определяет специфичность связывания с определенными ПАМП. Каждый из TLRs распознает определённый набор микробных продуктов, что позволяет организму обнаружить большую часть патогенов, которыми он может быть инфицирован. После взаимодействия клеток врожденного иммунитета, несущих TLRs с патогеном, происходит передача сигнала внутрь клетки и последовательная активация адапторных белков, протеинкиназ и транскрипционных факторов, что приводит к изменению экспрессии различных генов, в частности провоспалительных цитокинов [9–13]. Уровень экспрессии толл-рецепторов и их функциональная активность определяют выраженность воспалительной реакции.

В настоящей работе проанализирован уровень экспрессии молекул TLR2 и TLR4 на моноцитах периферической крови пациентов с обострением хронического остеомиелита до и после лечения и уровня спонтанной и индуцированной выработки этими клетками фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), а также количества CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоцитов в периферической крови. Прослежена зависимость количества TLR2<sup>+</sup> и TLR4<sup>+</sup>-клеток с клиническими особенностями течения хронического остеомиелитического процесса.

## Материал и методы

Исследовали образцы крови от 49 больных (9 женщин и 40 мужчин 17–67 лет), находившихся на хирургическом

лечении в отделении гнойной хирургии ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России в период с 2014 по 2016 г. по поводу обострения хронического остеомиелита. У всех пациентов был моноочаг, локализовавшийся в длинной трубчатой кости с наличием одного или множественных костных секвестров. Длительность остеомиелитического процесса к моменту госпитализации составила от 3 мес до 12 лет. Каждый больной предварительно перенёс от 2 до 7 оперативных вмешательств из-за обострений хронического остеомиелита. По поводу гематогенного остеомиелита лечение получали 7 больных. Остальные имели в анамнезе закрытые или открытые переломы. Хирургическое лечение проводилось всем больным. Оперативное вмешательство заключалось в остеонексеквестрэтомии, санации раны при помощи ультразвукового кавитатора в антибактериальном растворе. Костный дефект заполняли препаратом на основе коллагена.

Сроки ремиссии оценивали, исходя из времени повторного обращения по поводу обострения у пациентов в отделении гнойной хирургии центра.

В группу сравнения вошли 23 условно здоровых добровольца, сопоставимых по возрасту и полу.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из гепаринизированной крови (25 ЕД на 1 мл) с помощью градиентного центрифугирования при 1500 об/мин (фиколл-урографин  $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>) 40 мин и дважды отмывали средней RPMI 1640 при 1500 об/мин в течение 10 мин. После чего культивировали МНК в полной ростовой среде RPMI 1640, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки (ООО «ПанЭко»), 2% Мм глутамин и антибиотики (пенициллин 100 ЕД/мл и стрептомицин 50 мг/мл, ООО «ПанЭко»). Исходная концентрация МНК составляла  $1 \cdot 10^6$  клеток/мл.

В качестве лигандов TLR использовали стимуляторы ЛПС (*E.coli* O127: B8; Sigma) в дозе 0,1 мкг/мл и пептидогликан (*Staphylococcus aureus*; Sigma) в дозе 5 мкг/мл. Оптимальные дозы выбраны на основании методических рекомендаций фирм-производителей используемых лигандов и литературных данных. Клетки инкубировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе фирмы Sanyo (Япония) при 5% CO<sub>2</sub>, 37°C и абсолютной влажности. Спонтанную выработку ФНО- $\alpha$  определяли, культивируя МНК в полной ростовой среде без стимуляторов. По окончании культивирования клетки осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 15 мин. Отбирали супернатанты и хранили их в течение 1–2 мес при –80°C. Рассчитывали индекс стимуляции как отношение количества ФНО- $\alpha$  при использовании соответствующего лиганда к спонтанной выработке цитокина клетками.

Продукцию ФНО- $\alpha$  определяли в супернатантах культур методом ИФА с помощью тест-систем фирмы Bioscience (США) на анализаторе Sunrise Tecan (Австрия), оснащённом системой Magellan, позволяющей в автоматическом режиме производить подсчёт оптической плотности.

Для определения экспрессии TLR2 и TLR4 на моноцитах МНК периферической крови сразу после их выделения инкубировали с FITC-мечеными антителами к CD14 (Beckman Coulter, США), PE-мечеными антителами к TLR2 (CD14<sup>+</sup>CD282<sup>+</sup>)

Таблица 1

**Количество и функциональная активность TLR2 и TLR4 по уровню продукции ФНО-α у пациентов с обострением хронического остеомиелита (M±m)**

Показатель	Группа				Доноры, n=23
	1-я (n=15)		2-я (n=34)		
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	
TLR2, %	31,7±17,4	80,3±2,3**	70,7±8,05*	51,2±18,9	55,6± 3,1
TLR4, %	99,3±0,4	100,0±0,4	97,0±2,6	99,0±0	42,9± 4,6
Продукция ФНО-α спонтанная, пг/мл	71,2±48,9	53,65±24,1**	24,9±7,4	16,3±5,7	25,4±6,8
Продукция ФНО-α стимулированная ПГ, пг/мл	877,5±163,8	310,2±36,7	668,02±97,7	1222,0±140,04*, **	359,7±23,2
Продукция ФНО-α стимулированная ЛПС, пг/мл	740,7±234,5	578,2±146,2	479,05±62,5	1128,2±270,08*, **	687±18,8

Примечание. \* – p<0,05 при сравнении показателей первой и второй групп; \*\* p<0,05 при сравнении данных до и после лечения внутри групп.

и APC-мечеными антителами к TLR4 (CD14<sup>+</sup>CD284<sup>+</sup>) (Bioscience) с соответствующими изотипическими контролями (Beckman Coulter) в течение 30 мин при 4°C. Анализ экспрессии CD14, TLR2 и TLR4 проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter). Оценивали процент моноцитов, несущих на своей поверхности TLR2 и TLR4, и среднюю интенсивность флуоресценции (RMFI), величину которой выражали в условных единицах (усл. ед.) флуоресценции.

Определение иммунофенотипа клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter) методом многоцветного анализа. В качестве реагентов использовали пятицветную панель моноклональных антител против CD45 (меченных FITC), CD4 (меченных PE), CD8 (меченных ECD), CD3 (меченных PC5) и CD19 (меченных PC7), а также четырехцветную панель моноклональных антител против CD45 (меченных PC5), CD3 (меченных FITC), CD16+56 (меченных PE) и HLA-DR (меченных PC7) производства Beckman Coulter. Полученные результаты оценивали как статистически значимые при значениях p<0,05. Все данные выражались в виде средних величин ± стандартная ошибка среднего (M±m).

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 6.1.

**Результаты и обсуждение**

Результаты исследования количества TLR2 и TLR4-положительных моноцитов в крови доноров показали, что их число было относительно стабильным показателем и составило в среднем 55,6± 3,1 и 42,9± 4,6% соответственно (табл. 1).

При обострении хронического остеомиелита оказалось, что по экспрессии TLR2 на моноцитах среди обследованных пациентов можно выделить две группы. В первую группу (n=15) вошли больные, у которых экспрессия исследуемого рецептора выше, чем у доноров и составила в среднем 70,7±8,05%. Соответственно во вторую группу (n=34) вошли больные, у которых количество TLR2<sup>+</sup>-моноцитов ниже, чем у доноров и составил в среднем 31,7±17,16%.

Экспрессия TLR4 была высокой (98,7±1,1%) практически у всех пациентов. Средняя интенсивность флуоресценции при этом в обеих группах сравнима для TLR2 и TLR4 и составила 37 усл. ед.

Следует отметить, что у большинства (94,3%) пациентов из остеомиелитического очага выделялся *Staphylococcus aureus*.

В стадии обострения хронического остеомиелита спонтанная продукция ФНО-α мононуклеарами в первой группе больных была выше, чем во второй, однако достоверности различий не выявлено. При использовании пептидогликана и липополисахарида для стимуляции МНК продукция ФНО-α у пациентов первой и второй групп достоверных различий не имела. Стимулирующее влияние различных лигандов на продукцию ФНО-α рассчитывали, используя условный коэффициент стимуляции (КС): отношение концентрации ФНО-α

в супернатантах МНК, стимулированных лигандами, к концентрации ФНО-α в супернатантах не стимулированных мононуклеаров. В первой группе пациентов при стимуляции МНК пептидогликаном КС был равен 12,3, во второй – 27,8. При стимуляции мононуклеарных клеток липополисахаридом в группах сравнения достоверных отличий не выявлено, КС в первой группе больных равен 10,4, во второй – 19,9.

Результаты исследований, проведенных после лечения, также показали значимую разницу показателей в выделенных группах. В первой группе уровень экспрессии TLR2-рецептора в процессе лечения повысился с 31,7±17,4 до 80,3±2,3%, при этом функциональная активность – продукция ФНО-α как спонтанная, так и стимулированная – снижалась. Во второй группе при обострении остеомиелита экспрессия TLR2-рецептора на моноцитах составила 70,7±8,05%, после курса лечения снизилась до 51,2±18,9%. Изменения функциональной активности TLR-рецепторов у пациентов второй группы были неоднозначными: спонтанная выработка ФНО-α МНК периферической крови во второй группе больных снизилась (24,9±7,4 vs. 16,3±5,7 пг/мл), а стимулированная продукция ФНО-α повысилась (668,02±97,7 vs. 1222,0±140,04 пг/мл и 479,05±62,5 vs. 1128,2±270,08 пг/мл, для ПГ и ЛПС соответственно).

Функциональная активность TLR после лечения у пациентов первой группы достоверно снизилась. Коэффициент стимуляции при использовании пептидогликана в первой группе составил 5,8, во второй – 76,3, при использовании ли-

Таблица 2

**Имунофенотип лимфоцитов периферической крови у пациентов с остеомиелитом в период обострения (%)**

Показатель	Группа 1, n=15		Группа 2, n=34	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
CD 3+	75,2±0,7	74,8±1,2	77,4±0,8	77,5±2,0
CD 4+	50,25±3,4	48,7±7,5	50,1±6,7	47,4±2,9
CD 8+	22,9±3,6	23,2±3,2	32,5±2,4	26,3±3,7
HLA-DR+	21,5±2,1*	23,3±1,8*	13,6±2,8*	13,2±2,7*
CD19+	12,4±4,3	13,1±2,2*	10,0±2,9	6,7±2,7*
CD3-16/56+	10,2±0,8	13,3±2,3	5,8±0,9	8,1±1,5
CD3+HLA-DR+	7,8±0,9*	8,8±1,3	4,5±0,7	6,7±1,6
CD3-HLA-DR+	10,9±1,8	10,7±0,8*	7,6±1,9	4,5±0,9*
CD3-8+	4,6±0,3	5,0±1,0	2,8±0,2	3,5±0,9

Примечание. \* – p<0,05 при сравнении показателей первой и второй групп.

пополисахарида – 10,9 и 70,5 соответственно.

Анализ иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови в группах сравнения пациентов с хроническим остеомиелитом показал, что общее число Т-лимфоцитов и основных субпопуляций не имели значимых отличий при сравнении как между группами, так и в процессе лечения (табл. 2).

Количество натуральных киллеров (CD3<sup>+</sup>16<sup>+</sup>-клеток) имело тенденцию к увеличению в первой группе пациентов с повышенным содержанием TLR2<sup>+</sup>-моноцитов в стадии обострения болезни и было максимальным к моменту выписки больных из стационара. Подобная картина прослеживалась в популяции активированных NK-клеток (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоциты). Зарегистрированы достоверные отличия в содержании HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоцитов у пациентов обеих групп. В первой группе больных количество HLA-DR<sup>+</sup>-клеток было выше, чем во второй как до лечения, так и после его завершения. После лечения в первой группе больных численность популяции CD19<sup>+</sup>-лимфоцитов достоверно выше по сравнению с показателем во второй группе.

Анализ клинического течения остеомиелитического процесса показал, что в первой и второй группах пациентов имелись различия в длительности безрецидивного периода. После лечения у больных первой группы обострение хронического процесса не наблюдалось в период всего исследования. Максимальное время наблюдения составило полтора года (17±2 мес). В противоположность этому, у пациентов второй группы период до рецидива был значительно короче и составлял в среднем 3,5 (3±0,5) мес.

У пациентов первой группы при поступлении в стационар выявлено достоверное снижение количества TLR2<sup>+</sup>-моноцитов по сравнению с больными второй группы. Обнаружено, что в этой группе спонтанная и индуцированная пептидгликаном продукция ФНО-α имела отчетливую тенденцию к повышению по сравнению с группой больных с коротким безрецидивным периодом. Количество TLR4<sup>+</sup>-моноцитов в обеих группах практически не отличалось, но продукция ФНО-α, индуцированная липополисахаридом, была выше в первой группе. Можно предположить, что у данной группы больных снижение количества клеток-продуцентов сопровождается сохранением или даже повышением их функциональной активности. Вероятно, именно сохранение функционального потенциала Toll-подобных рецепторов является одним из факторов, способствующих увеличению временного промежутка до очередного обострения хронического остеомиелитического процесса.

Дальнейшее изучение рецепторов врожденного иммунитета при хроническом остеомиелите, в частности, детекция полиморфизмов TLRs, по-видимому, могут прояснить патогенетические процессы течения заболевания и позволят внести коррективы в схемы медикаментозного лечения хронического остеомиелита.

## Выводы

- Обострение хронического остеомиелита стафилококковой этиологии характеризуется высокой экспрессией TLR-4 CD14<sup>+</sup>-клетками периферической крови по сравнению со здоровыми лицами.

- В стадии обострения хронического остеомиелита у одних пациентов наблюдается высокая экспрессия TLR-2 на моноцитах периферической крови (70,7±8,05%), у других – низкая (31,7±17,4%).

- В группе больных с высокой экспрессией TLR-2 на моноцитах периферической крови число HLA-DR<sup>+</sup> и CD19<sup>+</sup>-лимфоцитов достоверно выше по сравнению с больными с низкой экспрессией TLR-2.

- Выявлена связь экспрессии и активности TLR-2 в период обострения болезни и длительности ремиссии у пациентов с хроническим остеомиелитом.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Абатуров А.Е. Молекулярные механизмы неспецифической защиты респираторного тракта: распознавание патоген-ассоциированных молекулярных структур. *Здоровье ребенка*. 2006; (2): 87–92.
2. Лебедев М.Ю., Шолкина М.Н., Живцов О.П. Содержание дубль-позитивных CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов в периферической крови тяжелообожженных и больных с остеомиелитом. *Фундаментальные исследования*. 2013; (12): 45–8.
3. Тевс Д.С., Калущий П.В., Лазаренко В.А. Нарушение иммунного и цитокинового статуса у больных хроническим остеомиелитом костей стопы. *Казанский медицинский журнал*. 2003; (4): 460–3.
4. Глинцбург А.Л., Лиходед В.Г., Бондаренко В.М. Экзогенные и эндогенные факторы в патогенезе атеросклероза. Рецепторная теория атеросклероза. *Российский кардиологический журнал*. 2010; (2): 92–6.
5. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Варивода А.С., Кондратенко И.В. Рецепторы врожденного иммунитета: подходы к количественной и функциональной оценке TOLL-подобных рецепторов человека. *Иммунология*. 2008; 29(4): 223–7.
6. Хаитов Р.М., Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете. *Иммунология*. 2009; 30(1): 66–76.
8. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Никонова А.С., Греченко В.В., Агапов М.А., Индраков В.А. и др. Корректирующее действие ингибитора циклооксигеназы на функциональное состояние мононуклеарных клеток, экспрессирующих TLR. *Микробиология, эпидемиология и иммунология*. 2010; (1): 45–50.
10. Самарканова Д.М., Кожанова С.В., Шортанбаев А.А. Toll-подобные рецепторы, их экспрессия и связь с заболеваниями человека. *Вестник Национальной академии наук Республики Казахстан*. 2012; (1): 20–6.

## REFERENCES

1. Abaturov A.E. Molecular mechanisms of nonspecific respiratory tract protection: recognition of pathogen-associated molecular structures. *Zdorov'e rebenka*. 2006; (2): 87–92. (in Russian)
2. Lebedev M.Yu., Sholkina M.N., Zhivtsov O.P. Content of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive lymphocytes in peripheral blood of patients with severe burns and patients with osteomyelitis. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013; (12): 45–8. (in Russian)
3. Tevs D.S., Kalutskiy P.V., Lazarenko V.A. Disorders of immune and cytokine status in patients with chronic osteomyelitis of foot bones. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2003; (4): 460–3. (in Russian)
4. Glintsburg A.L., Likhoded V.G., Bondarenko V.M. Exogenous and endogenous factors in atherosclerosis pathogenesis. Receptor theory of the atherosclerosis. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2010; (2): 92–6. (in Russian)
5. Koval'chuk L.V., Khoreeva M.V., Varivoda A.S., Kondratenko I.V. Innate immunity receptors: approaches to quantitative and functional evaluation of TOLL-like human receptors. *Immunologiya*. 2008; 29(4): 223–7. (in Russian)
6. Khaïtov R.M., Pashchenkov M.V., Pinegin B.V. Role of pattern recognizing receptors in innate and adaptive immunity. *Immunologiya*. 2009; 30(1): 66–76. (in Russian)
7. Erridge C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J. Leukoc. Biol*. 2010; 87(6): 989–99.
8. Koval'chuk L.V., Khoreeva M.V., Nikonova A.S., Grechenko V.V., Agapov M.A., Indrakov V.A. Corrective effect of cyclooxygenase inhibitor on functional status of mononuclear cells expressing Toll-like receptors. *Mikrobiologiya, epidemiologiya i immunobiologiya*. 2010; (1): 45–50. (in Russian)
9. Montes A.H., Asensi V., Alvares V., Vall E., Ocana M.g., Meana A. et al. The (tlr4 Asp 299Gly) polymorphism is a risk factor for gram-negative and haemathogenous osteomyelitis. *J. Clin. Exp. Immunol*. 2006; 143(3): 404–13.
10. Samarcanova D.M., Kozhanova S.V., Shortanbaev A.A. Toll-like receptors, their expression and connection with human diseases. *Vestnik Natsional'noy akademii nauk Respubliki Kazakhstan*. 2012; (1): 20–6.
11. Kaisho T., Akira S. Toll-like receptor Function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2006; 117(5): 979–87.
12. Lorenz E., Mira J.P., Frees K.L., Schwartz D.A. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch. Intern. Med*. 2002; 162(9): 1028–32.
13. Takeda K., Kaisho T., Akira S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol*. 2003; 21: 335–76.

Поступила 12.09.17

Принята в печать 16.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.132.2-089.819.5-018.1-092:612.017.1

Сизякина Л.П.<sup>1</sup>, Шлык И.Ф.<sup>2</sup>, Сидоров Р.В.<sup>1</sup>, Шлык С.В.<sup>1</sup>

## ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ КОРОНАРНОЕ СТЕНТИРОВАНИЕ

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, 344022, Ростов-на-Дону, Россия;

<sup>2</sup> ГБУ РО «Ростовская областная клиническая больница», 344015, Ростов-на-Дону, Россия

Одним из методов лечения ишемической болезни сердца является коронарное стентирование. При имплантации коронарного стента происходит повреждение интимы сосуда, что приводит к активации врождённого иммунного ответа. Целью настоящей работы явилось изучение клеточного звена врождённого иммунитета у пациентов с ишемической болезнью сердца до операции коронарного стентирования и послеоперационный период. В результате исследования до проведения коронарного стентирования выявлено повышение экспрессии TLR 2 и TLR 9, увеличение количества и снижение цитотоксичности CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов, снижение микробицидного потенциала нейтрофилов. После проведения коронарного стентирования отмечено снижение экспрессии на моноцитах CD284 и CD289, снижение количества и увеличение цитотоксической активности CD16<sup>+</sup>-клеток. Таким образом, пациентам, которым выполнено коронарное стентирование, необходима оценка клеточного звена врождённого иммунитета как до операции, так и после неё.

**Ключевые слова:** коронарное стентирование; врожденный иммунитет; Толл-подобные рецепторы.

**Для цитирования:** Сизякина Л.П., Шлык И.Ф., Сидоров Р.В., Шлык С.В. Характеристика клеточного звена врожденного иммунитета у пациентов, перенесших коронарное стентирование. *Иммунология*. 2018; 39(1): 16-19. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-16-19>

*Sizyakina L.P.1, Shlyk I.F.2, Sidorov R.V.1, Shlyk S.V.1*

### CHARACTERISTICS OF THE CELLULAR LINK OF INNATE IMMUNITY IN PATIENTS UNDERGOING CORONARY STENTING

<sup>1</sup> «Rostov State Medical University», 344022, 29 Nakhichevan Rostov-on-Don, Russia;

<sup>2</sup> «Rostov Regional Hospital», 344015, 170 Blagodathnaja, Rostov-on-Don, Russia

One of the methods of treating ischemic heart disease is coronary stenting. When the coronary stent is implanted, the intima of the vessel is damaged, which leads to activation of the innate immune response. The purpose of this work was to study the cellular link of innate immunity in patients with coronary heart disease before the operation of coronary stenting and at various times of the postoperative period. As a result of the study, before the coronary stenting, an increase in the expression of TLR 2 and TLR 9, an increase in the number and decrease in the cytotoxicity of CD16 + lymphocytes, a decrease in the microbicidal potential of neutrophils was revealed. After coronary stenting, the expression on CD284 and CD289 monocytes decreased, the amount and increase in the cytotoxic activity of CD16 + cells decreased. Thus, patients who underwent coronary stenting need an evaluation of the cellular link of innate immunity both before and after surgery.

**Keywords:** coronary stenting; innate immunity; Toll-like receptors.

**For citation:** Sizyakina L.P., Shlyk I.F., Sidorov R.V., Shlyk S.V. Characteristics of the cellular link of innate immunity in patients undergoing coronary stenting. *Immunologiya*. 2018; 39(1): 16-19. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-16-19>

**For correspondence:** *Sizyakina Lyudmila Petrovna*, Dr Med. Sci., Professor, Head. cafes. Clinical Immunology and Allergology, director of the Institute of Clinical Immunology «Rostov State State Medical University», 344022, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: [sushkina-83@mail.ru](mailto:sushkina-83@mail.ru)

#### Information about authors:

Sizyakina L.P. <http://orcid.org/0000-0001-5716-4397>

Shlyk I.F., <http://orcid.org/0000-0003-2193-7372>

Sidorov R.V., <http://orcid.org/0000-0002-8411-1554>

Shlyk S.V. <http://orcid.org/0000-0003-3070-8424>

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

**Acknowledgments.** *The study had no sponsorship.*

Received 12.05.17

Accepted 16.08.17

В настоящее время заболеваемость и смертность от болезни системы кровообращения несмотря на снижение на 3,15% (по состоянию на 2015 г.), продолжает оставаться глав-

ным вызовом современной медицины. При этом смертность от ишемической болезни сердца (ИБС) с 2014 г. увеличилась на 0,3%. Одним из самых распространённых методов хирургического лечения ИБС является стентирование коронарных артерий (КА). В 2015 г. количество стентирований КА в РФ увеличилось на 18,4% по сравнению с 2014 г. [1]. Однако успешность данного вида лечения снижается в первую очередь за счёт развития рестенозов коронарных стентов, встречающихся у 30-42% больных [2].

Коронарные стенты, несмотря на их биоинертность,

**Для корреспонденции:** *Сизякина Людмила Петровна*, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии, директор Института клинической иммунологии Ростовского государственного медицинского университета, E-mail: [sushkina-83@mail.ru](mailto:sushkina-83@mail.ru)



представляют собой чужеродный агент. При его имплантации возникает повреждение интимы, что приводит к активации моноцитов и развитию острой воспалительной реакции с формированием неинтимы [3–5]. От исхода воспаления зависит функциональная состоятельность коронарного стента. Таким образом, интерес представляет характеристика врожденного звена иммунной системы, так как от него зависит не только исход воспаления, но и запуск адаптивных иммунных реакций, что в свою очередь обуславливает хронизацию воспалительного процесса и формирование рестеноза коронарного стента [6].

В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение клеточного звена врожденного иммунитета у пациентов с ишемической болезнью сердца до операции коронарного стентирования и в различные сроки послеоперационного периода.

## Материал и методы

Исследование проводили на базе кардиохирургического отделения и НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России. В исследование включены 56 участников (27 мужчин и 15 женщин в возрасте 55,5±3 года) с ИБС, и 14 респондентов без клинического проявления ИБС (в возрасте 50,1±2 года), составивших группу контроля. Критериями включения явились: ИБС, стенокардия напряжения III–IV функциональных классов и наличие показаний для стентирования коронарных артерий. Критерии исключения: нестабильная форма стенокардии, острый инфаркт миокарда, постинфарктный кардиосклероз, наличие сопутствующей онкологической и аутоиммунной патологии, заболеваний соединительной ткани. Все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Продолжительность ИБС составила 4,6±2,1 года. Всем пациентам выполнена операция стентирования коронарных артерий с имплантацией стентов Nobori с лекарственным покрытием Biolimus (Бельгия). В 39,9% случаев выполнено стентирование средней трети и в 30,2% – проксимальной трети передней нисходящей ветви левой коронарной артерии. Стентирование правой коронарной артерии проведено в 29,9% случаев. После операции пациенты принимали стандартную двойную антиагрегантную (клопидогрел и ацетилсалициловая кислота), гиполипидемическую, антиангинальную и гипотензивную терапию. Клеточное звено врожденного иммунитета оценивали до стентирования и через 4, 11 и 18 дней после операции. Методом проточной цитофлюориметрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США) проводили фенотипирование CD14<sup>+</sup>CD282<sup>+</sup> (TLR2), CD14<sup>+</sup>CD284<sup>+</sup> (TLR4), CD14<sup>+</sup>CD289<sup>+</sup> (TLR9) моноцитов и CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>Gr<sup>+</sup>-лимфоцитов периферической крови на проточном лазерном цитофлюориметре «FC500». Метаболическую кислородзависимую активность нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте. Для оценки клинического проявления ИБС через 6 мес после проведения коронарного стентирования в 90% случаев пациентам выполнен ЭКГ-стресс-тест с физической нагрузкой на тредмиле.

При статистическом анализе нормальность распределения признака в выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Статистическая обработка полученных результатов основывалась на *t*-критерии Стьюдента и осуществлялась при использовании пакетов программ SPSS Statistics 17.0. Различия показателей считали достоверными при  $p < 0,05$ . Значения показателей представлены в виде среднего значения ( $M$ ) ± стандартная ошибка ( $m$ ).

Таблица 1

## Характеристика клеточного звена врожденного иммунитета пациентов с ИБС в дооперационном периоде

Показатель	Контроль	Больные с ИБС
CD14+CD282+, %	64,0±8,0	79,8±1,6*
CD14+CD282+, 10 <sup>9</sup> /л	0,2±0,03	0,4 ±0,1*
CD14+CD284+, %	20,0±4,0	27,0±4,3
CD14+CD284+, 10 <sup>9</sup> /л	0,1± 0,01	0,2 ±0,01
CD14+CD289+, %	3,0±1,0	87,3±3,5*
CD14+CD289+, 10 <sup>9</sup> /л	0,01±0,005	0,5 ±0,01*
CD16+, %	12,2±0,2	16,5±1,3*
CD16+, 10 <sup>9</sup> /л	0,1 ± 0,01	0,3± 0,1*
CD16+Gr+, %	10,2±1,1	5,3±0,7*
CD16+Gr+, 10 <sup>9</sup> /л	0,14 ±0,02	0,02± 0,01*
НСТ сп, у.е.	90,2±1,2	97,7±2,6*
НСТ ст, у.е.	193,6±2,1	158,9±4,2*
К ст. НСТ	2,1±0,1	1,6±0,1*

Примечание. Здесь и в табл. 2: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с исходными данными до оперативного лечения.

## Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлено сравнение показателей клеточного звена врожденного иммунитета у пациентов с ишемической болезнью сердца и группой контроля. Выявлено статистически значимое повышение экспрессии CD282 на CD14<sup>+</sup>-моноцитах как по относительным, так и по абсолютным значениям. В то же время экспрессия TLR4 не отличалась от группы сравнения. Обращает внимание количество CD289<sup>+</sup>-моноцитарных клеток, которое в несколько раз выше соответствующих данных контрольной группой. Эта закономерность отражена как в абсолютных, так и в относительных значениях. Анализ показателей CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов выявил, что у пациентов с ИБС количество этих клеток статистически значимо выше, чем в контрольной группе, а цитотоксический потенциал ниже, о чём свидетельствует уменьшение количества Гранзим В-содержащих CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов. В фагоцитарном звене отмечено статистически значимое по-

Таблица 2

## Динамика показателей клеточного звена врожденного иммунитета в различные сроки послеоперационного периода

Показатель	До операции	4-е сутки	11-е сутки	18-е сутки
CD14+ CD282+, %	79,8±1,6	78,0±1,4	80,67±6,89	76,0±1,1
CD14+ CD282+, 10 <sup>9</sup> /л	0,4 ±0,1	0,3 ±0,01	0,7± 0,03	0,3± 0,03
CD14+ CD284+, %	27,0±4,3	10,6±1,6*	12,0±1,8*	13,5±1,2*
CD14+ CD284+, 10 <sup>9</sup> /л	0,2 ±0,01	0,05±0,01*	0,1 ±0,09*	0,09±0,04*
CD14+ CD289+, %	87,3±3,5	75,18±5,1*	61,67±2,1*	78,20±3,1*
CD14+ CD289+, 10 <sup>9</sup> /л	0,5 ±0,01	0,3± 0,02*	0,2±0,03*	0,3± 0,01*
CD16+, %	16,5±1,3	13,86±1,1*	14,67±2,4	15,3±2,2
CD16+, 10 <sup>9</sup> /л	0,3± 0,1	0,1±0,03*	0,1 ±0,08	0,4 ±0,1
CD16+Gr+, %	5,3±0,7	5,4±0,9	15,4±1,4*	8,8±1,2
CD16+Gr+, 10 <sup>9</sup> /л	0,02±0,01	0,08±0,05	0,2±0,01*	0,09±0,06
НСТ сп, у.е.	97,7±2,6	95,4 ±1,9	93,0±3,5	98,0±3,4
НСТ ст, у.е.	158,9±4,2	165,20±5,58	152,00±4,37	163,00±5,79
К ст. НСТ	1,6±0,1	1,7±0,03	1,6±0,09	1,6±0,06

вышение значения спонтанного НСТ-теста при уменьшении адаптационного резерва фагоцитов в виде снижения стимулированного НСТ-теста, что проявляется достоверно низким значением коэффициента стимуляции.

Таким образом, из приведённых данных следует, что у пациентов с ИБС в сравнении с группой контроля отмечается усиление экспрессии TLR 2 и 9 моноцитами периферической крови, снижение цитотоксической активности CD16<sup>+</sup>-клеток наряду с повышением их содержания и неадекватной микробицидной активностью нейтрофилов.

При анализе динамики данных показателей у пациентов с ишемической болезнью сердца в различные сроки послеоперационного периода выявлено незначительное колебание экспрессии CD282 на моноцитах, не достигающее статистически значимых изменений (табл. 2). При этом противоположная динамика прослеживается в отношении экспрессии CD284 и CD289 на CD14<sup>+</sup>-клетках и проявляется достоверным снижением отмеченных показателей во все сроки наблюдения, демонстрируя тенденцию к незначительному повышению к 18-м суткам как в относительных, так и в абсолютных значениях. При анализе динамики CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов на 4-е сутки отмечается статистически значимая количественная супрессия с постепенным достижением исходного содержания к 18-м суткам. При этом цитотоксический потенциал в виде внутриклеточного содержания Гранзима В, достоверно повышается к 11-м суткам послеоперационного периода, достигая исходных значений к 18-м суткам. Отмеченная динамика количества CD16<sup>+</sup>-клеток и содержания в них Гранзима В прослеживается как в относительных, так и в абсолютных значениях.

Исследование микробицидной активности нейтрофилов не выявило статистически значимых колебаний значений как спонтанного, так и стимулированного НСТ-теста, была отмечена лишь тенденция к увеличению данных показателей к 18-м суткам. Коэффициент стимуляции оставался на исходно низком уровне (см. табл. 2).

Таким образом, при исследовании динамики показателей клеточного звена врождённого иммунитета после коронарного стентирования выявлено снижение экспрессии моноцитами TLR4 и TLR9 в течение всего послеоперационного периода и уменьшение количества CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов с повышением их цитотоксической активности.

TLR 2 и TLR 4 – трансмембранные белки, расположенные на наружной мембране клетки, а TLR 9 – внутриклеточный белок мембраны эндосом. Воздействие на эти клеточные структуры приводит к активации синтеза провоспалительных цитокинов и индукции адаптивного иммунитета [7].

В наших исследованиях установлено, что у пациентов с коронарным атеросклерозом отмечается повышенная моноцитарная экспрессия CD282 и CD289. Этот факт связан с наличием воспаления в очаге атеросклеротического поражения и согласуется с данными литературы. Так, в работе Lee G. [8] отмечено, что TLR 2 и TLR 4 участвуют в формировании атеросклеротических бляшек. Установлено, что TLR2 способствуют миграции гладко-мышечных клеток в зону атеросклеротического повреждения, вызывают эндотелиальную дисфункцию коронарных артерий за счет активации нейтрофилов и продукции ими активных форм кислорода [8, 9].

В свою очередь, TLR 4 активируется не только бактериальными и вирусными липополисахаридами, но и окисленными липопротеинами низкой плотности. Данный факт способствует поддержанию асептического воспаления в зоне атеросклеротического повреждения [9, 10].

Особого внимания заслуживает факт увеличения количества CD14<sup>+</sup>CD289<sup>+</sup>-моноцитов, в десятки раз превышающих соответствующий показатель контроля. Возможно, это связано с длительно существующим атеросклеротическим повреждением сосудистой стенки. Данный тип рецепторов активируется внутриклеточными патогенами и продуктами

тканевого распада эндогенного происхождения. Согласно литературным данным, в роли паттернов TLR-9 могут выступать последовательности нуклеиновых кислот некротизированной сосудистой стенки в зоне атеросклеротического повреждения, белки теплового шока HSP 60 и 70, которые имеют сходство с бактериальными липополисахаридами, продукты апоптоза макрофагов, фибриноген, фибронектин [10].

Выявленное в нашем исследовании повышенное содержание натуральных киллеров до проведения стентирования, согласно данным литературы, связано с атеросклеротическим повреждением сосудистой стенки. Так, в работе Kotfis K. и соавт. [11] показана прямая корреляционная связь повышенного содержания CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов с обширностью атеросклеротического поражения и длительностью течения атеросклероза.

В экспериментальных моделях также доказано, что чем длительнее существует атеросклероз, тем ниже цитолитическая активность CD16<sup>+</sup>-клеток [12]. Полученные нами данные служат убедительным подтверждением этих выводов: снижение количества CD16<sup>+</sup>ГранзимВ<sup>+</sup>-лимфоцитов свидетельствует об угнетении цитолитической функции этих клеток при ИБС.

Неадекватное изменение значений НСТ-теста как спонтанного, так и стимулированного, может свидетельствовать об истощении микробицидной активности нейтрофилов при коронарном атеросклерозе.

Необходимо отметить результаты динамики изучаемых показателей после проведения коронарного стентирования. На протяжении всего периода наблюдения отмечалось снижение экспрессии всех трёх изученных видов TLR. Что, возможно, обусловлено иммуносупрессивным влиянием лекарственного покрытия стента [13].

Обращает внимание динамика снижения CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов в течение послеоперационного периода, видимо, также связанная с антипролиферативным покрытием коронарного стента. Повышение цитолитической активности CD16<sup>+</sup>-клеток на 11-е сутки может быть обусловлено активацией аутоиммунного ответа. Снижение внутриклеточного содержания Гранзима В к 18-м суткам послеоперационного периода не исключает активацию адаптивного иммунитета в более поздние сроки, проявляющуюся усиленной продукцией провоспалительных цитокинов и хемокинов. Механизм активации CD16<sup>+</sup>-лимфоцитами адаптивного иммунитета связывают с пролиферацией покоящихся аутологических CD4<sup>+</sup>-клеток под воздействием стимулирующих молекул суперсемейства иммуноглобулинов и TNF [14]. Эти медиаторы являются мощным триггером воспалительной реакции в месте имплантации стента [13].

В свою очередь, отсутствие динамики метаболической активности нейтрофилов в течение послеоперационного периода может свидетельствовать как о супрессивной роли лекарственного покрытия стента, так и о недостаточности кислородзависимого механизма фагоцитоза нейтрофилов.

У пациентов, перенесших коронарное стентирование, через 6 мес проведён тредмил-тест. При этом ишемических изменений не выявлено и проба оценена как отрицательная. Данный факт косвенно может свидетельствовать об адекватной работе стентов. Однако, учитывая, что рестенозы коронарных стентов чаще происходят через 12 мес с момента коронарного стентирования, необходимо дальнейшее динамическое наблюдение за данной группой пациентов.

На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что у пациентов с ИБС наблюдается нарушение гомеостаза в клеточном звене врождённого иммунитета до проведения стентирования. Выявленные факты могут быть объяснены длительно текущим атеросклерозом. Изменения компонентов клеточного звена врождённого иммунитета в течение послеоперационного периода являются дискус-

большими и требуют дальнейшего изучения. Учитывая вклад врожденного иммунитета в активацию адаптивного иммунного ответа, выявленные изменения требуют динамического наблюдения в течение раннего послеоперационного периода для отбора пациентов с высоким риском неблагоприятных осложнений в виде тромбоза и рестеноза коронарного стента.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г. Сердечно-сосудистая хирургия–2015. *Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения*. Москва: НЦССХ им. А.Н. Бакулева; 2016.
2. Проскуряков А.И., МIRONENKO С.П., ОСИЕВ А.Г. Клинико-иммунологические аспекты формирования рестеноза после коронарного стентирования при ИБС. *Медицина и образование в Сибири*. 2013; 3: 8.
3. Сушкина И.Ф., Шлык С.В., Сизыкина Л.П., Антонова Е.А. Влияние маркеров воспаления на тяжесть течения острого коронарного синдрома. *Цитокины и воспаление*. 2014; 13(3): 131–2.
4. Хаитов Р.М. *Иммунология: структура и функции иммунной системы*. Москва: Геотар-Медиа; 2013.
5. Осиев А.Г., МIRONENKO С.П., Ёлкина Д.С. Сравнительная характеристика покрытых стентов, использованных при эндоваскулярном лечении больных ишемической болезнью сердца. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2013; 1: 91–5.

## REFERENCES

1. Bokeriya L.A., Gudkova R.G. *Cardiovascular Surgery-2015. Diseases and congenital anomalies of the circulatory system*. [Serdechno-sosudistaya khirurgiya–2015. Bolezni i vrozhdennye anomalii sistemy krovoobrashcheniya]. Moscow: NTSSKh im. A.N. Bakuleva; 2016. (in Russian)
2. Proskuryakov A.I., Mironenko S.P., Osiev A.G. Clinical and immunological aspects of the formation of restenosis after coronary stenting in IHD. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri*. 2013; 3: 8. (in Russian)
3. Nakagawa M.A., Naruko T., Ikura Y. Decline in platelet activation and inflammatory cell infiltration in associated with the phenotypic redifferentiation of neointimal smooth muscle cells after bare-metal stent implantation in acute coronary syndrome. *J. Atheroscler. Thromb.* 2010; 17 (7): 675–87.

4. Fukuda D., Shimada K., Tanaka A., Kawarabayashi T., Yoshiyama M., Yoshikawa J. Circulating monocytes and in-stent neointima after coronary stent implantation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 43: 18–23.
5. Sushkina I.F., Shlyk S.V., Sizyakina L.P., Antonova E.A. Influence of markers of inflammation on the severity of acute coronary syndrome. *Tsitokiny i vospalenie*. 2014; 13(3): 131–2. (in Russian)
6. Khaïtov R.M. Immunology: structure and functions of the immune system. [Immunologiya: struktura i funktsii immunnoy sistemy]. Moscow: Geotar-Media; 2013. (in Russian)
7. Farb A., Weber D. K., Kolodgie F. D., Burke A. P., Virmani R. Morphological predictor of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation*. 2002; 105: 2974–80.
8. Lee G.L., Chang Y.W., Wu J.Y., Wu M.L., Wu K.K., Yet S.F. et al. TLR 2 induces vascular smooth muscle cell migration through cAMP response element-binding protein-mediated interleukin-6 production. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 2012; 32(11): 2751–60. doi: 10.1161/atvbaha.112.300302.
9. Favre J., Musette P., Douin-Echinard V., Laude K., Henry J.P., Arnal J.F. et al. Toll-like receptors 2-deficient mice are protected against postischemic coronary endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 2007; 27(5):1064–71.
10. Mohsin H. K. Roshan, Amos Tambo, Nikolai P. Pace The Role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int. J. Inflamm.* 2016; 2016: 1532832. doi: 10.1155/2016/1532832
11. Kotfis K., Biernawska J., Zegan-Baranska M., Zukowski M. Peripheral Blood Lymphocyte Subsets (CD4+, CD8+ T Cells, NK Cells) in Patients with Cardiovascular and Neurological Complications after Carotid Endarterectomy. *Int. J. Sci.* 2015; 16(5): 10077–94. doi: 10.3390/ijms160510077
12. Parisi L., Bassani B., Tremolati M., Gini E., Farronato G., Bruno A. Natural killer (NK) cells augment atherosclerosis by cytotoxic-dependent mechanisms. *Cardiovasc Res.* 2014; 102 (1): 128–37. DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu016>.
13. Osiev A.G., Mironenko S.P., Elkina D.S. Comparative characteristics of coated stents used in endovascular treatment of patients with ischemic heart disease. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya*. 2013; 1: 91–5. (in Russian)
14. Zingoni A., Sornasse T., Benjamin G. C., Tanaka Y., Santoni A., Lanier L.L. Cross-Talk between Activated Human NK Cells and CD4+ T Cells via OX40-OX40 Ligand Interactions. *J. Immunol.* 2004; 173 (6): 3716–24. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3716>

Поступила 12.05.17  
Принята в печать 16.08.17

## КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.014.017.1:576.32/36.83

Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С.

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ГС-ЦИТОКИНОВ (IL-2, IL-7 И IL-15) НА ЭКСПРЕССИЮ МОЛЕКУЛ ПОЗДНЕЙ АКТИВАЦИИ И АПОПТОЗА (CD95 И HLA-DR) CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Т-ЛИМФОЦИТАМИ В ПОПУЛЯЦИИ CD45RA Т-КЛЕТОК *IN VITRO***

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», 236016, г. Калининград, Россия

**Введение.** Активация Т-лимфоцитов является ключевым событием в развитии адаптивного иммунного ответа, завершение которого характеризуется последовательной экспрессией молекул поздней и длительной активации и клеточной гибели (HLA-DR, CD95).

**Материал и методы.** Методом проточной цитофлюориметрии проанализировано изменение числа клеток, экспрессирующих молекулы поздней активации (HLA-DR) и апоптоза (CD95) в популяциях наивных Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) и терминально-дифференцированных лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) под действием  $\gamma$ -цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) *in vitro*.

**Результаты.** Показано, что действие  $\gamma$ -цитокинов на наивные лимфоциты сопровождалось увеличением числа CD8<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>-клеток, ограничивающих цитокин-индуцированную активацию Т-лимфоцитов посредством запуска Fas-опосредованного апоптоза. В популяции TEMRA-клеток было зафиксировано повышение числа CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоцитов, свидетельствующих о влиянии  $\gamma$ -цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) на процессы дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов, и направленных на подавление антиген-независимой гиперактивации иммунной системы.

**Заключение.**  $\gamma$ -цитокины IL-2, IL-7 и IL-15 могут инициировать активацию T<sub>EMRA</sub>-клеток, а также антигеннезависимую дифференцировку и созревание наивных Т-лимфоцитов. Ограничение патологической активации наивных Т-лимфоцитов реализуется посредством запуска Fas-опосредованного апоптоза при длительном воздействии высоких концентраций цитокинов. Подавление цитокинопосредованной гиперактивации TEMRA-клеток может осуществляться за счёт участия HLA-DR-позитивных лимфоцитов в механизмах супрессии иммунных реакций.

**Ключевые слова:** наивные Т-лимфоциты; терминально-дифференцированные лимфоциты; T<sub>EMRA</sub>  $\gamma$ -цитокины; активация; апоптоз; дифференцировка.

Для цитирования: Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С. Оценка влияния  $\gamma$ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на экспрессию молекул поздней активации и апоптоза (CD95 и HLA-DR) CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами в популяции CD45RA Т-клеток *in vitro*. *Иммунология*. 2018; 39(1): 20-25. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-20-25>

*Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Litvinova L.S.*

**EVALUATION OF THE EFFECT OF  $\gamma$ -CYTOKINES (IL-2, IL-7 AND IL-15) ON EXPRESSION OF THE LATE ACTIVATION MOLECULES AND APOPTOSIS (CD95 AND HLA-DR) CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-LYMPHOCYTES IN A POPULATION OF CD45RA T CELLS *IN VITRO***

Immanuel Kant Baltic Federal University 236041, Kaliningrad, Russia

Change in the expression number of late activation (HLA-DR) and apoptosis (CD95) molecules in populations of naive T cells (CD3 + CD45RA + CD62L +) and terminal differentiated lymphocytes (CD3 + CD45RA + CD62L-) by  $\gamma$ -cytokines (IL-2, IL-7, IL-15) *in vitro* was analyzed by flow cytometry. It was shown that the effect of  $\gamma$ -cytokines on naive lymphocytes was accompanied by an increase in the number of CD8 + CD95 + cells that limit the cytokine-induced activation of T lymphocytes by triggering Fas-mediated apoptosis. In the TEMRA cell population, an increase in the number of CD4 + / CD8 + HLA-DR + cells, indicative of the effect of  $\gamma$ -cytokines (IL-2, IL-7, IL-15) on the differentiation and maturation of T lymphocytes and aimed at suppressing antigen-independent immune activation of the immune system.

**Keywords:** naive T-lymphocytes; terminal differentiated lymphocytes; TEMRA,  $\gamma$ -cytokines; activation; apoptosis; differentiation.

**For citation:** Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Litvinova L.S. Evaluation of the effect of  $\gamma$ -cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15) on expression of the late activation molecules and apoptosis (CD95 AND HLA-DR) CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes in a population of CD45RA T cells *in vitro*. *Immunologiya*. 2018; 39(1): 20-25. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-20-25>

**For correspondence:** Larisa S. Litvinova, Dr. Sci. Med., Head of Laboratory immunology and cells biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University. Tel. 89114820489; 8 (4012) 595–595 add-on 6631. E-mail: [larisalitvinova@yandex.ru](mailto:larisalitvinova@yandex.ru)

**Information about authors:**

Yurova K.A. <http://orcid.org/0000-0001-6146-3330>  
 Khaziakhmatova O.G. <http://orcid.org/0000-0002-5525-3529>  
 Todosenko N.M. <http://orcid.org/0000-0001-7468-4861>  
 Litvinova L.S. <http://orcid.org/0000-0001-5231-6910>

**Conflict of interest.** *The authors state that there is no conflict of interest.*

**Acknowledgment:** *Work is performed under the program of increase of competitiveness ("road maps") and subsidies "Organization of scientific research 20.4986.2017/6.7" Immanuel Kant Baltic Federal University.*

Received 31.05.17

Accepted 16.08.17

**Введение**

Сущность ответной иммунной реакции заключается в эффективной элиминации различных агентов инфекционной и неинфекционной природы. Ключевое событие в развитии адаптивного иммунного ответа – активация Т-лимфоцитов, в результате которой на клеточной мембране последовательно экспрессируются молекулы, характеризующие стадии ранней и поздней активации, пролиферации и апоптоза [1, 2].

Согласно современным представлениям, активационное состояние клеток наиболее полно отражает маркер поздней и длительной активации HLA-DR, осуществляющий взаимодействие иммунокомпетентных клеток человека, распознавание ауто- и экзогенных антигенов, запуск и реализацию иммунного ответа, обеспечивая выживание и адаптацию человека как вида в условиях непрерывного воздействия факторов антигенного окружения [2]. Необходимым завершением эффективного иммунного ответа является программированная гибель (апоптоз) активированных клеток, в индукции которой участвуют сигналы, приводящие к активации специализированных «рецепторов смерти» [1, 2–3]. Акцептором летального сигнала может выступать Fas-рецептор (CD95), активирующийся при взаимодействии с лигандом FasL (CD178) [4], который экспрессируется на НК-клетках и активированных Т-лимфоцитах [5]. Инициация апоптотической гибели может быть опосредована как внеклеточными факторами (цитокины, хемокины, МНС-сигналинг и др.), так и внутриклеточными сигналами [5, 6].

Известно, что цитокины семейства I типа (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21), имеющие общую  $\gamma$ -цепь рецепторов (CD132), способны оказывать комплексное влияние на клеточный гомеостаз Т-лимфоцитов [7], а также на процессы активации и дифференцировки, при этом чувствительность Т-клеток к иммунорегуляторным цитокинам зависит от стадии их развития [8].

Таким образом, целью настоящего исследования явилось определение экспрессии молекул поздней активации (HLA-DR) и апоптотической гибели (CD95) в популяциях наивных Т-клеток и терминально-дифференцированных лимфоцитов под влиянием  $\gamma\delta$ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) в условиях культивирования *in vitro*.

**Материал и методы.**

Исследование проводили согласно протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. и Хельсинской декларации ВМА 2000 г. Разрешение на проведение исследования №5 от 05.11.2013 г. получено в локальном этическом комитете БФУ им. И. Канта (г. Калининград).

Исследование проводили с использованием фракций CD45RA<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных из мононуклеарных лейкоцитов венозной крови у 58 условно здоровых доноров (29 мужчин и 29 женщин 22 – 35 лет) методом иммуномагнитной сепарации с помощью автоматического магнитного сепаратора AutoMACS Pro Separator Instrument (Miltenyi Biotec, Германия). Для сепарации использовали моноклональные антитела (MAT) CD45RA<sup>+</sup> с магнитными частицами (MicroBeads human, Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с протоко-

лом производителя. Критерии исключения из исследования: возраст – моложе 18 и старше 35 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; эндокринные, инфекционные, онкологические, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов осуществляли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина (1.077 г/см<sup>3</sup>; Pharmacia, Швеция). Чистоту CD45RA<sup>+</sup>-популяций определяли с использованием МАТ, конъюгированных с фикоэритрином (PE) или флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) (Abcam, Cambridge, Великобритания). Процентное содержание позитивных клеток выявляли на проточном цитофлуориметре MACSQuantAnalyzer (Miltenyi Biotec, Германия). Содержание целевой CD45RA<sup>+</sup>-фракции в исследуемых образцах составляло не менее 95 %.

Отсутствие В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>) и моноцитов (CD14<sup>+</sup>) в культурах CD45RA<sup>+</sup>-клеток до и после культивирования подтверждено с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием МАТ, конъюгированных с FITC (CD3), PE (CD14) (Abcam, Великобритания) с конъюгатом PE с цианином (PE-Cy7) (CD45RA) или с пиридинхлорофиллом (PerCP) (CD19) (e-Bioscience, США). Анализ поверхностных маркеров проводили на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия) согласно протоколам производителей. В работе использовали культуры клеток, содержание в которых CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup> лимфоцитов составляло в среднем 98,5 ± 1,5%.

Клетки CD45RA<sup>+</sup> (1·10<sup>6</sup> кл/мл) культивировали в 48-луночном планшете в бессывороточной среде Искова (Sigma, США), содержащей 0,5% сывороточного альбумина человека (Микроген, Россия), 5 · 10<sup>-5</sup> М  $\beta$ -меркаптоэтанол (Acros Organics, США) и 30 мкг/мл гентамицина в присутствии рекомбинантных форм цитокинов IL-2, IL-7, IL-15 (Miltenyi Biotec, Германия) в разных концентрациях или без них (контроль) в течение 48 ч при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

Варианты культивирования: 1) интактная проба без добавления цитокинов; 2) пробы с добавлением  $\gamma$ IL-2; 3) пробы с добавлением  $\gamma$ IL-7; 4) пробы с добавлением  $\gamma$ IL-15. Исследованы следующие концентрации  $\gamma\delta$ -цитокинов: 0.1 нг/мл; 0.5 нг/мл; 1.0 нг/мл. По истечении срока инкубации произведён подсчёт числа клеток и зарегистрировано процентное содержание жизнеспособных лимфоцитов в исследуемых клеточных культурах с использованием ViaCount Reagent (Millipore, США) методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре Guava EasyCite Plus (Millipore, США), согласно протоколу производителя.

Количество CD45RA<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD45RA<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, HLA-DR, CD95 определяли с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием коктейля МАТ, (eBioscience, США; Abcam, Великобритания; Miltenyi Biotec, Германия), приготовленных *ex tempore*:

CD3-Viablue/ CD4-PE/CD8- FITC/CD45RA-APC/CD62L-PerCp.

CD3-Viablue/ CD4-PE/CD8- FITC/CD95-APC/ HLA-DR-PerCp.

Результаты регистрировали на проточном цитофлюориметре MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия). Все результаты цитометрического анализа анализировали с помощью программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

Полученные данные анализировали с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). При выборке данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова–Смирнова). Для каждой выборки вычисляли средневывборочные характеристики: медиану (Me), первый и третий квартили (Q1, Q3). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий для зависимых выборок Вилкоксона. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ Спирмена. Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ .

При сравнительном анализе действия  $\gamma$ -цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) на исследуемые характеристики Т-клеток, полученных у условно здоровых лиц, в зависимости от гендерных критериев достоверных различий тестируемых параметров не выявлено.

### Результаты и обсуждение

Принято считать, что экспрессия высокомолекулярной изоформы общелейкоцитарного рецептора CD45 – CD45RA характерна для «наивных» лимфоцитов, которые прошли антиген-независимую дифференцировку в тимусе. Экспрессия наивными клетками молекул CD62L, CCR7 и CXCR4 позволяет им мигрировать в Т-зоны лимфатических узлов, где происходит презентация антигена дендритными клетками, результатом которой является образование лимфоцитов иммунной памяти с фенотипом CD45R0<sup>bright</sup>CD45RA<sup>-</sup> [1, 9].

Однако накопленные к настоящему времени в мировой литературе сведения доказывают, что молекула CD45R0 может замещаться на исходную изоформу – CD45RA [10]. Предполагают, что клетки реэкспрессирующие молекулу CD45RA, – это терминально-дифференцированная популя-

ция лимфоцитов, которые обеспечивают устойчивую иммунологическую память на реинвазию патогенов [9, 10].

На основе дифференциальной экспрессии молекулы L-селектина – CD62L, нами выявлены субпопуляции наивных Т-клеток – CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> и терминально-дифференцированных лимфоцитов TEMRA – CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>.

По окончании срока культивирования (48 ч) общее количество клеток в контрольных пробах CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Т-лимфоцитов составило  $1,08 \pm 0,09 \cdot 10^6$  кл/мл, число жизнеспособных Т-клеток было равным в среднем 75,45 (71,98–78,23)%.

В интактных CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> - культурах Т-клеток число наивных лимфоцитов составило 54,61 (48,18 – 71,66)%, причем количество CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток в 4 раза превышало число CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов ( $p < 0,05$ ) и было равным 40,01 (25,32 – 60,00)% и 11,02 (6,62 – 19,93)% соответственно. Содержание лимфоцитов с фенотипом T<sub>EMRA</sub> 45,39 (28,34 – 51,82)%, из них 6,65 (3,50 – 12,01)% составили CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> лимфоциты, 36,24 (25,64 – 39,02)% – CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> -клетки.

Цитофлюориметрический анализ молекулы поздней активации позволил определить, что в популяции наивных лимфоцитов экспрессия HLA-DR детектировалась на неопределяемом уровне, тогда как в популяции T<sub>EMRA</sub>-клеток почти 18% CD4<sup>+</sup> и 32% CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов экспрессировали на своей поверхности маркер поздней активации (рис. 1). Известно, что экспрессия HLA-DR наиболее характерна для Т-клеток, подвергшихся антигензависимой дифференцировке [1].

Это свидетельствует, что все выявленные нами CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Т-клетки являются терминально-дифференцированными лимфоцитами [12].

Согласно полученным данным, 2,3% CD4<sup>+</sup> и 5,6% CD8<sup>+</sup> наивных лимфоцитов несли на своей поверхности молекулу CD95. В популяции T<sub>EMRA</sub>-клеток 89% CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов экспрессировали маркер апоптоза CD95, тогда как число CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> -клеток составило 10,98% (рис. 2).

Интересен тот факт, что все CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Т-клетки несли на своей поверхности молекулу CD95, однако не все CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>-Т-лимфоциты экспрессировали маркер HLA-

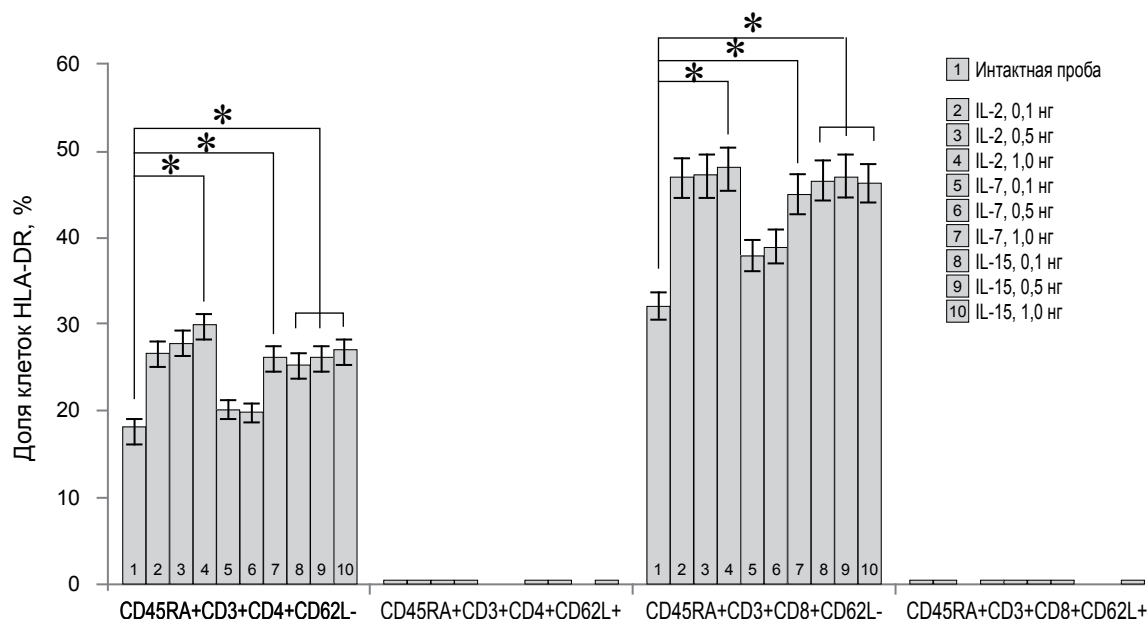


Рис.1. Относительное содержание (%) CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> лимфоцитов в CD62L<sup>+</sup> и CD62L<sup>-</sup> популяциях CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>- культур, в условиях культивирования *in vitro*, с добавлением разных концентраций  $\gamma$ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15).

\* – достоверность результатов по отношению к интактной пробе ( $p \leq 0,05$ ).

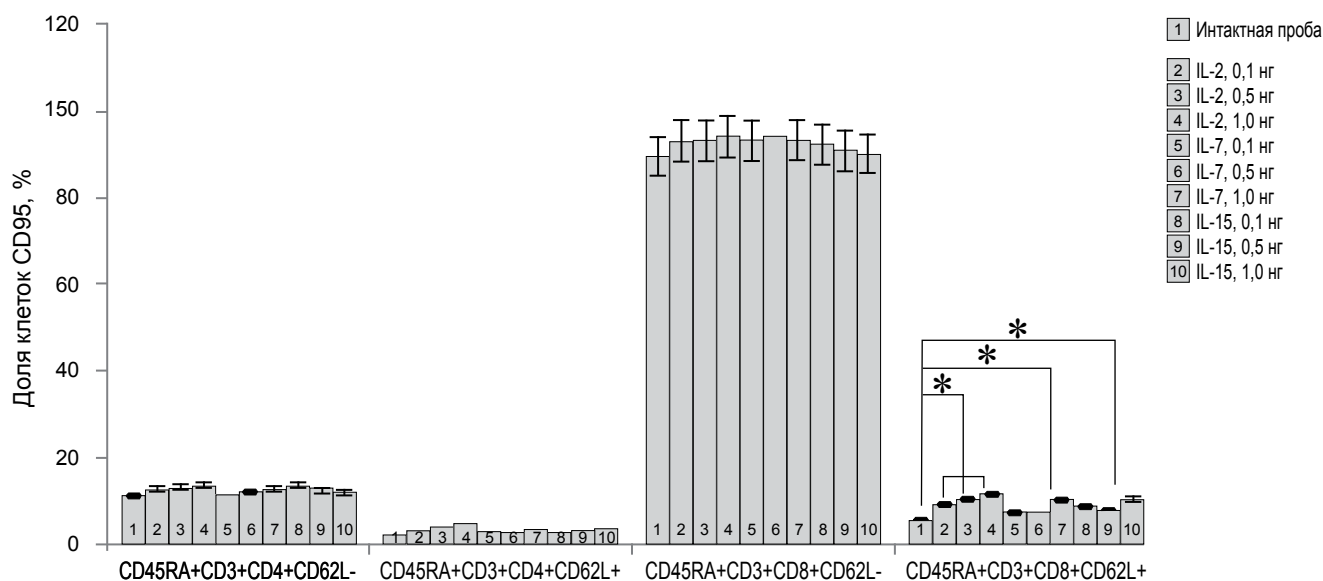


Рис. 2. Относительное содержание (%)  $CD4^+/CD8^+CD95^+$  лимфоцитов в  $CD62L^+$  и  $CD62L^-$  популяциях  $CD3^+CD45RA^+$ - культур, в условиях культивирования *in vitro*, с добавлением разных концентраций ус-цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15).

\* – достоверность результатов по отношению к интактной пробе ( $p \leq 0,05$ ).

$DR^+$ . По мнению Jaleco S. и соавт [13], экспрессия CD95 не всегда является признаком чувствительности Т-клеток к Fas-опосредованной апоптотической гибели. В исследованиях, проведенных Robertson M.J. показано, что периферические Т-клетки иммунной памяти, несмотря на высокий уровень экспрессии CD95, оказались устойчивы к апоптозу, индуцированному добавлением МАК к  $\alpha$ -Fas [14]. Согласно современным представлениям, экспрессия CD95 на клеточной мембране эффекторных клеток и Т-лимфоцитов памяти может служить маркером их созревания и дифференцировки [15]. Вероятно, высокая поверхностная экспрессия маркеров HLA-DR и  $CD95 T_{EMRA}$ -клетками может являться признаком терминальной фазы дифференцировки и созревания лимфоцитов.

Добавление в среду культивирования  $CD3^+CD45RA^+$ -клеток IL-2 (независимо от концентрации) приводило к статистически достоверному увеличению (в среднем, на 20%) числа клеток в мл. Максимальная концентрация цитокина (1,0 нг/мл) снижала количество живых клеток в среднем на 22%.

В популяции наивных лимфоцитов действие IL-2 было направлено преимущественно на цитотоксические лимфоциты: отмечено повышение числа  $CD8^+CD95^+$  Т-клеток на фоне снижения содержания  $CD8^+CD62L^+$ -лимфоцитов (см. рис. 2). Этот тезис подтвержден сильной корреляционной взаимосвязью между числом  $CD62L^+$  Т-клеток и  $CD95^+$  лимфоцитов ( $r = -0,86$ ;  $p < 0,05$ ) при действии максимальной концентрации IL-2 (1,0 нг/мл). Экспрессия маркера поздней активации HLA-DR оставалась на уровне контрольных значений (см. рис. 1).

Снижение содержания жизнеспособных клеток наряду с увеличением числа  $CD8^+CD95^+$  может быть обусловлено способностью IL-2 *in vivo* (в естественных условиях) в отсутствии антигенного стимула инициировать апоптотическую гибель цитотоксических эффекторов [16]. Известно, что IL-2 способен усиливать экспрессию проапоптотических белков: TRAIL, каспаза-3, DAP и STK 17B [17]. Выявлено, что реализация апоптозотического действия IL-2 на лимфоциты крови осуществляется при определенном пороге концентрации цитокина (исследование *in vitro*) [18]. Кроме того, одной из причин гибели Т-лимфоцитов может быть IL-2-опосредованное угнетение экспрессии IL-7Ra (CD127) – ключевого фактора модуляции Т-клеточного гомеостаза

[19]. Система IL-2/IL-7 регулирует поддержание равновесия между иммунитетом и толерантностью, функционируя как переменный цикл подавления и активации Т-клеточных ответов. Нарушение баланса может инициировать развитие иммунопатологических состояний [20].

Отсутствие выраженных эффектов в популяции  $CD4^+$ -наивных Т-клеток в ответ на аппликацию в среду культивирования экзогенного IL-2, вероятно, обусловлено сниженной мембранной экспрессией компонентов рецепторного комплекса: IL-2Ra и IL-2R $\beta$  [21].

Действие IL-2 на  $T_{EMRA}$ -лимфоциты, напротив, сопровождалось увеличением пула цитотоксических  $T_{EMRA}$ -эффекторов и ростом числа HLA-DR-позитивных лимфоцитов в популяциях  $CD8^+/CD4^+CD62L^-$ -клеток (см. рис. 1). Содержание  $CD95^+$ -лимфоцитов статистически достоверно не изменялось (см. рис. 2). Вероятно, IL-2-зависимое увеличение числа  $CD3^+CD45RA^+$  Т-клеток может быть обусловлено пролиферацией цитотоксических  $T_{EMRA}$ -лимфоцитов. Этот тезис согласуется с данными о способности к пролиферации *in vitro*  $CD8^+HLA-DR^+$  лимфоцитов, выделенных из периферической крови взрослых доноров [22].

Снижение числа  $CD8^+CD62L^+$ -лимфоцитов на фоне одновременного увеличения содержания  $CD8^+CD62L^-$  HLA-DR $^+$  Т-клеток может свидетельствовать об участии IL-2 в дифференцировке и созревании наивных лимфоцитов в  $T_{EMRA}$  в условиях *in vitro*. Ранее нами был обнаружен факт IL-2-индуцированной дифференцировки цитотоксических  $CD45RA^+CD27^+CD62L^+$ -Т-клеток в терминально-дифференцированные эффекторы  $CD45RA^+CD27^-CD62L^-$  [23]. В мировой литературе также представлены данные о цитокиноопосредованной дифференцировке наивных Т-лимфоцитов в клетки центральной ( $CD45RA^-CD45R0^+CD62L^+CCR7^+CD27^+CD28^+$ ) и/или эффекторной ( $CD45RA^-CD45R0^+CD62L^-CCR7^-$ ) памяти [24].

Внесение в среду культивирования наивных  $CD3^+CD45RA^+$ -Т-клеток максимальных концентраций (1,0 нг/мл) IL-7 и IL-15 способствовало повышению числа  $CD8^+CD95^+$  лимфоцитов (см. рис. 2), не оказывая при этом значимого влияния на жизнеспособность Т-клеток. IL-7 и IL-15 являются ключевыми медиаторами гомеостатической ре-

гуляции клеток, основная физиологическая роль которых заключается в сохранении жизнеспособности Т-лимфоцитов [1]. В научной периодике представлены данные о способности IL-7 и IL-15 оказывать антиапоптозное действие на Т-клетки через JAK/STAT и PI3K/AKT-сигнальные пути [25] или за счёт поддержания баланса про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [1, 26].

Известно, что IL-7 участвует в рекомбинации локуса  $\gamma$ -цепи TCR [1] и может служить критическим модулятором низкоаффинной пептид-индуцирующей пролиферации [1, 27].

Исследование, проведенное Fluor C. и соавт. [28], показало, что IL-2, IL-7 и IL-15 могут инициировать экспрессию Fas на мембранах наивных лимфоцитов и Т-клеток памяти в условиях культивирования *in vitro*, не сопровождающуюся инициацией дифференцировочного процесса и клеточной гибели. Отсутствие изменений экспрессии Fas на уровне отдельных клеток отвергает идею повышенной продукции маркера апоптоза в ответ на воздействие  $\gamma$ с-цитокинов [28]. Авторы предполагают, что цитокинзависимое увеличение экспрессии CD95 может быть связано с перераспределением молекул Fas из внутриклеточного пространства на поверхность клетки. Таким образом, описанный механизм может способствовать увеличению чувствительности Т-клеток к Fas-опосредованному апоптозу. Однако это возможно только при повышенной экспрессии FasL, наблюдающейся при хронической активации иммунной системы, в частности, в условиях персистирующей вирусной инфекции (ВИЧ) [28].

В популяции TEMRA при действии IL-7 (1,0 нг/мл) и IL-15 (0,1-1,0 нг/мл) наблюдали достоверное увеличение числа CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, экспрессирующих маркер длительной активации HLA-DR<sup>+</sup>, число жизнеспособных клеток оставалось на уровне контрольных значений (см. рис. 1).

Отсутствие корреляционных взаимосвязей между числом наивных и T<sub>EMRA</sub>-лимфоцитов, подвергшихся апоптозу, и цитокин-индуцированным повышением числа CD95<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup>-Т-клеток свидетельствуют о запуске неспецифических активационных механизмов, не приводящих к клеточной гибели Т-лимфоцитов.

Согласно данным научной периодики, экспрессия молекулы HLA-DR является одним из механизмов ограничения иммунного ответа, направленного на инициацию апоптотической гибели активированных Т-лимфоцитов, утративших способность к экспрессии молекулы Fas [29]. Предполагают, что Т-лимфоциты, экспрессирующие молекулу HLA-DR на своей мембране, представляют собой зрелые регуляторные Т-клетки с высокой супрессивной активностью [22, 30], механизмы которой опосредованы контактными взаимодействиями между соседними клетками, включая CTLA-4-сигнализацию [22].

Выявлено, что повышение экспрессии маркера HLA-DR сопровождается многие аутоиммунные заболевания [31]. Природа ассоциаций аутоиммунных процессов с молекулами HLA-DR основана на степени родства пептидсвязывающей щели молекул HLA к иммуногенным пептидам конкретного аутоантигена: чем она больше, тем выше риск развития иммунного ответа [1]. Повышенная экспрессия маркера HLA-DR в ответ на введение высоких концентраций экзогенных цитокинов (IL-7, IL-15) свидетельствует об участии этих медиаторов в активации иммунной системы [32].

Для предотвращения избыточной продукции белка экспрессия IL-7 и IL-15 строго регулируется на уровне транскрипции и трансляции [31], однако многие авторы показали, что IL-7 и/или IL-15 по неизвестным причинам конститутивно экспрессируется при аутоиммунных патологиях (так же как миокардит, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, витилиго и др.), регулируя деструкцию тканей посредством воздействия на дендритные клетки и тканерезидентные эффекторные цитотоксические Т-лимфоциты [2, 31].

IL-15, несмотря на общность строения рецепторов с

IL-2 и схожими биологическими активностями, обладает также и противоположными функциями, подавляя IL-2-опосредованную активацию Treg, контролирующей гиперактивацию иммунной системы, и ингибируя активационный апоптоз [31]. Свойства IL-15, определяющие его защитные эффекты против патогена, вероятно, играют ключевую роль в патогенезе органоспецифических аутоиммунных расстройств, при которых нарушается регуляция его экспрессии. По данным многих исследователей, роль IL-7 и IL-15 в патогенезе аутоиммунных заболеваний ассоциирована с повышенной экспрессией NKG2D на клеточной поверхности Т-лимфоцитов [33].

NKG2D представляет собой костимулирующий рецептор, экспрессирующийся на  $\alpha\beta$ CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-Т-клетках,  $\gamma\delta$ Т-клетках, НК-клетках, NKT-клетках [34], распознающий стрессорные молекулы, которые кодируются генами MHC I класса - MICА, MICВ, ULBP и сигнализируют о нарушениях физиологического состояния клеток [35, 36].

Известно также, что IL-15 на определенном этапе клеточного развития является необходимым фактором, регулирующим образование молекулы NKG2D [1]. Maasho K. и соавт. [36] в исследовании *in vitro* показали, что добавление высоких концентраций гомеостатических цитокинов IL-7 и IL-15 в среду культивирования лимфоцитов, полученных от здоровых доноров, не только усиливает пролиферацию Т-клеток, но также повышает экспрессию корцептора NKG2D.

Хроническое увеличение уровней гомеостатических цитокинов свидетельствует о нарушениях клеточного и/или тканевого гомеостаза, в результате чего повышение экспрессии корцепторной молекулы NKG2D, распознающей трансформированные или подвергшиеся стрессорному воздействию клетки [1], вероятно, является необходимым этапом, приводящим к антигенезависимой активации Т-лимфоцитов, способных обеспечить клиренс изменённых клеток.

Повышенная экспрессия маркера поздней активации HLA-DR на поверхностной мембране T<sub>EMRA</sub>-лимфоцитов в ответ на введение в среду культивирования высоких доз экзогенных IL-7 и IL-15 (1,0 нг/мл) может быть направлена на супрессию иммунного ответа, вызванного цитокин-индуцированным увеличением экспрессии корцептора NKG2D.

**Заключение.** Таким образом, в популяции наивных Т-клеток CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> действие  $\gamma$ с-цитокинов IL-2, IL-7, IL-15 (1,0 нг/мл) направлено преимущественно на цитотоксические лимфоциты и сопровождалось увеличением числа клеток, экспрессирующих рецептор CD95 (Fas) (без изменения содержания мёртвых/живых клеток), что может отражать процессы активации наивных лимфоцитов. Вместе с тем, экспрессия CD95<sup>+</sup> на поверхностной мембране лимфоцитов может ограничивать повышенную пролиферацию лимфоцитов через запуск Fas-опосредованного апоптоза в случае патологической активации иммунной системы при длительном воздействии высоких концентраций гомеостатических цитокинов (IL-7, IL-15). В популяции терминально-дифференцированных CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L-лимфоцитов IL-2 (1,0 нг/мл), IL-7 (1,0 нг/мл) и IL-15 (0,1 – 1,0 нг/мл) способствовали увеличению числа HLA-DR-позитивных лимфоцитов, что может свидетельствовать не только о цитокин-опосредованном запуске процессов дифференцировки и созревания клеток, но также об участии HLA-DR-позитивных лимфоцитов в подавлении гиперактивации иммунной системы.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности («дорожной карты») и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/6.7» Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.



## ЛИТЕРАТУРА ( пп. 3, 6–8, 9–14, 16–17, 19–22, 24–36 см. В REFERENCES)

1. Ярилин А.А. *Иммунология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
2. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Шуплещова В.В., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г. и др. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов. *Медицинская иммунология*. 2014; 6(1): 7–26.
3. Барышников А.Ю., Шишкин А.Ю. *Иммунологические проблемы апоптоза*. М.: Эдитория; 2002.
4. Пекарева Е.В., Никонова Т.В., Смирнова О.В. Роль апоптоза в патогенезе сахарного диабета 1 типа. *Сахарный диабет*. 2010; 1: 45–9.
5. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки. *Российский иммунологический журнал*. 2014; 8(17): 947–64.
6. Хайдуков С.В., Холоденко И.В., Литвинов И.С. Ионмицин-резистентная субпопуляция CD4+ Т-лимфоцитов периферической крови человека. Функциональная характеристика. *Биологические мембраны*. 2003; 20(4): 333–40.
7. Сазонова Е.В., Чечина О.Е., Биктасова А.К., Жукова О.Б. Дозозависимые эффекты IL-2 на программированную гибель лимфоцитарных клеток. *Материалы Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии»*. СПб; 2009: 96–7.
8. Сохоневич Н.А., Литвинова Л.С. Эффекты цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7 и IL-15), на содержание CD3+CD4+/CD8+HLA-DR+ Т-клеток в CD45RA- и CD45RO - культурах in vitro. *Сборник статей по материалам международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация»*. М.; 2015: 31–4.
9. Ярилин А.А. *Immunology [Immunologiya]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
10. Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G. et al. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Meditsinskaya immunologiya*. 2014; 6(1): 7-26. (in Russian)
11. Krampe B., Al-Rubeai M. Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology*. 2010; 62(3): 175–88.
12. Baryshnikov A.Yu., Shishkin A.Yu. *Immunological problems of apoptosis. [Immunologicheskie problemy apoptoza]*. Moscow: Editoriya; 2002. (in Russian)
13. Pekareva E.V., Nikonova T.V., Smirnova O.M. The role of apoptosis in pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Sakharnyy diabet*. 2010; 1: 45–9. (in Russian)
14. Prabhu S.B., Khalsa J.K., Banerjee H., Das A., Srivastava S., Mattoo H.R. et al. Role of apoptosis-inducing factor (Aif) in the T cell lineage. *Indian J. Med. Res*. 2013; 138(5): 577–90.
15. Lee B., Hong C. The role of soluble common gamma chain in autoimmunity. *Anat. Cell Biol*. 2015; 48(1): 10–5.
16. Geginat J., Campagnaro S., Sallusto F., Lanzavecchia A. TCR-independent proliferation and differentiation of human CD4+ T cell subsets induced by cytokines. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2002; (512): 107–12.
17. Kudryavtsev I.V. T cells: major populations and stages of differentiation. *Russkiy immunologicheskii zhurnal*. 2014; 8(17): 947–64. (in Russian)
18. Carrasco J., Godelaine D., Van Pel A., Boon T., van der Bruggen P. CD45RA on human CD8 T cells is sensitive to the time elapsed since the last antigenic. *Blood*. 2006; 108: 2897–905.
19. Corneau A., Cosma A., Even S., Katlama C., Le Grand R., Frachet V. et al. Comprehensive Mass Cytometry Analysis of Cell Cycle, Activation, and Coinhibitory Receptors Expression in CD4 T Cells from Healthy and HIV-Infected Individuals. *Cytometry B Clin. Cytom*. 2017; 92(1): 21–32.
20. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Ann. Rev. Immunol*. 2004; 22: 745–63.
21. Jaleco S., Swainson L., Dardalhon V., Burjanadze M., Kinet S., Taylor N. Homeostasis of naive and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol*. 2003; 171(1): 61–8.
22. Robertson M.J., Manley T.J., Pichert G., Cameron C., Cochran K.J., Levine H. et al. Functional consequences of APO-1/Fas (CD95) antigen expression by normal and neoplastic hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma*. 1995; 17(1-2): 51–61.
23. Khaidukov S.V., Kholodenko I.V., Litvinov I.S. The Ionomycin-resistant Subset of CD4 + T Cells Within Human Peripheral Blood. A functional Features. *Biologicheskie membrany*. 2003; 20(4): 333–40. (in Russian)
24. Kamimura D., Ueda N., Sawa Y., Hachida S., Atsumi T., Nakagawa T. et al. Evidence of a novel IL-2/15R beta-targeted cytokine involved in homeostatic proliferation of memory CD8+ T cells. *J. Immunol*. 2004; 173(10): 6041–9.
25. Kovanen P.E., Leonard W.J. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev*. 2004; 202: 67–83.
26. Sazonova E.V., Chechina O.E., Biktasova A.K., Zhukova O.B. Dose-dependent effects of IL-2 on the programmed death of lymphocytic cells. *Materials of intercity conference of young scientists «Actual problems of pathophysiology»*. [Materialy Mezhorodskoy konferentsii molodykh uchennykh «Aktual'nye problemy patofiziologii»]. St. Petersburg; 2009: 96–7. (in Russian)
27. Cai Z., Liu H., Wu X. Forkhead-box transcription factor 1 affects the apoptosis of natural regulatory T cells by controlling Aven expression. *BMC Immunol*. 2017; 18(1):16.
28. Katzman S.D., Hoyer K.K., Dooms H., Gratz I.K., Rosenblum M.D., Paw J.S. et al. Opposing functions of IL-2 and IL-7 in the regulation of immune responses. *Cytokine*. 2011; 56: 116–21.
29. Moses C.T., Thorstenson K.M., Jameson S.C., Khoruts A. Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naive CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100: 1185–90.
30. Arruvito L., Payaslián F., Baz P., Podhorzer A., Billordo A., Pandolfi J. et al. Identification and clinical relevance of naturally occurring human CD8+HLA-DR+ regulatory T cells. *J. Immunol*. 2014; 193(9): 4469–76.
31. Sokhnevich N.A., Litvinova L.S. Effects of cytokines with a common  $\gamma$ -chain of receptors (IL-2, IL-7 and IL-15) on CD3 + CD4 + / CD8 + HLA-DR + T cell content in CD45RA and CD45RO cultures in vitro. International Conference on «Receptors and Intracellular Signaling». [Sbornik statey po materialam mezhdunarodnaya konferentsiya "Retseptory i vnutrikletchnaya signalizatsiya"]. Moscow; 2015: 31–4. (in Russian)
32. Surh C.D., Sprent J. Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunology*. 2008; 29 (6): 848–62.
33. Shenoy A.R., Kirschnek S., Häcker G. IL-15 regulates Bcl-2 family members Bim and Mcl-1 through JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in T cells. *Eur. J. Immunol*. 2014; 44(8): 2500–7.
34. Cai K., Wei R. Interleukin-7 expression in tears and orbital tissues of patients with Graves' ophthalmopathy. *Endocrine*. 2013; 44(1): 140–4.
35. Fry T.J., Mackall C.L. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood*. 2002; 99(11): 3892–904.
36. Fluor C., De Milito A., Fry T.J., Vivar N., Eidsmo L., Atlas A. et al. Potential role for IL-7 in Fas-mediated T cell apoptosis during HIV infection. *J. Immunol*. 2007; 178(8): 5340–50.
37. Bertho N., Drénou B., Laupeze B., Berre C.L., Amiot L., Grosset J.M. et al. HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC. *J. Immunol*. 2000; 164: 2379–85.
38. Imamichi H., Lempicki R.A., Adelsberger J.W., Hasley R.B., Rosenberg A., Roby G. et al. The CD8+ HLA-DR+ T cells expanded in HIV-1 infection are qualitatively identical to those from healthy controls. *Eur. J. Immunol*. 2012; 42(10): 2608–20.
39. Jabri B., Abadie V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nat. Rev. Immunol*. 2015; 15(12): 771–83.
40. Amu S., Lantto G.R., Bekele Y., Nasi A., Bengtsson C., Rethi B. et al. Rethi BDysfunctional phenotypes of CD4+ and CD8+ T cells are comparable in patients initiating ART during early or chronic HIV-1 infection. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(23). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4907649/>
41. Xing L., Dai Z., Jabbari A., Cerise J.E., Higgins C.A., Gong W., et al. Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition. *Nat. Med*. 2014; 20: 1043–9.
42. Talebian L., Fischer D.A., Wu J., Channon J.Y., Sentman C.L., Ernstoff M.S., et al. The natural killer-activating receptor, NKG2D, on CD3+CD8+ T cells plays a critical role in identifying and killing autologous myeloma cells. *Transfusion*. 2014; 54(6): 1515–21.
43. Bratanic N., Smigoc Schweiger D., Mendez A., Bratina N., Battelino T., Vidan-Jeras B. An influence of HLA-A, B, DR, DQ, and MICA on the occurrence of Celiac disease in patients with type 1 diabetes. *Tissue Antigens*. 2010; 76(3): 208–15.
44. Maasho K., Opoku-Anane J., Marusina A.I., Coligan J.E., Borrego F. NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8+ T cells. *J. Immunol*. 2005; 174(8): 4480–4.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-018.1-092.612.017.1

Вольский Н.Н., Перминова О.М., Гойман Е.В., Гаврилова Е.Д.

**ВЛИЯНИЕ ТН1/ТН2-СООТНОШЕНИЯ НА РАЗВИТИЕ ОСТРОЙ РТПХ В ПОЛУАЛЛОГЕННОЙ СИСТЕМЕ C57BL/6 → (C57BL/6 X DBA/2)F1**

НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, 630099, Новосибирск, Россия

В работе исследовали влияние агентов, сдвигающих Th1/Th2-баланс, на клиническую картину острой реакции трансплантат против хозяина (РТПХ), индуцированной в стандартной полуаллогенной системе C57Bl/6 → (C57Bl/6 x DBA/2)F1. В экспериментах оценивали интенсивность Th1-зависимых (степень деструкции тимуса) и Th2-зависимых (выраженность спленомегалии) иммунных реакций. Также определяли динамику смертности в контрольных и опытных группах мышей. Обнаружено, что агент, сдвигающий Th1/Th2-баланс в сторону Th1 (поллоксамер 407), увеличивает смертность животных и повышает степень деструкции тимуса в поздние сроки развития иммунопатологического процесса. Пентоксифиллин, который сдвигает Th1/Th2-баланс в сторону Th2, уменьшал смертность мышей и степень деструкции тимуса, но увеличивал выраженность спленомегалии в ранний период острой РТПХ и замедлял наблюдаемую впоследствии инволюцию селезёнки. В то же время агент, обладающий цитостатической активностью (5-азациитидин), существенно снижал смертность животных, но вызывал выраженную инволюцию тимуса и селезёнки в ранний период острой РТПХ.

Полученные результаты подтверждают представление о параллельном развитии Th1- и Th2-зависимых иммунных процессов при острой РТПХ. Кроме того, показано, что эта экспериментальная модель может быть использована в качестве простой тест-системы для выявления агентов, сдвигающих Th1/Th2-соотношение.

**Ключевые слова:** острая реакция трансплантат против хозяина; Th1/Th2-баланс; деструкция тимуса; спленомегалия.

**Для цитирования:** Вольский Н.Н., Перминова О.М., Гойман Е.В., Гаврилова Е.Д. Влияние Th1/Th2-соотношения на развитие острой РТПХ в полуаллогенной системе C57Bl/6 → (C57Bl/6 x DBA/2)F1. *Иммунология*. 2017; 38(6): DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-26-31>

*Volsky N.N., Perminova O.M., Goiman E.V., Gavrilova E.D.*

**EFFECT OF THE TH1/TH2 RATIO ON THE DEVELOPMENT OF ACUTE GVHD IN THE SEMIALLOGENEIC SYSTEM C57BL/6 → (C57BL/6 X DBA/2)F1**

Institute of Fundamental and Clinical Immunology, 630099, Novosibirsk, Russia

The effects of Th1/Th2 ratio shifting agents on the clinical picture of acute GvHD induced in standard semiallogeneic system C57Bl/6 → (C57Bl/6 x DBA/2)F1 were studied. It was established that the intensity of Th1-dependent (the degree of thymic destruction) and Th2-dependent (the extent of splenomegaly) immune reactions was evaluated. The value of the experimental and control groups of mice mortality rate was also determined. It has been found that Th1/Th2 ratio towards Th1 (poloxamer 407) shifting agent increases the mortality rate of mice and augments the degree of thymic destruction in late periods of disease. Pentoxifylline that shifts the Th1/Th2 ratio towards Th2, it decreases the mortality rate of mice and reduces the degree of thymic destruction. However, it increases the severity of splenomegaly in early period of acute GvHD and slows down the subsequent involution of the spleen. While the administration of agent with cytostatic effect (5-azacytidine), the markedly decreasing of the mortality rate of experimental animals has been found, but at the same time it leads to the both thymus and spleen involution at the early stage of acute GvHD.

The obtained results confirm the assumption of both Th1- and Th2-dependent immune processes parallel development in acute GvHD. Furthermore it was shown that this experimental model can be used as a simple test system for identifying of agents that shifting Th1/Th2 ratio.

**Key words:** acute graft versus host disease; Th1/Th2 ratio; thymic destruction; splenomegaly.

**For citation:** Volsky N.N., Perminova O.M., Goiman E.V., Gavrilova E.D. Effect of the Th1/Th2 ratio on the development of acute GVHD in the semiallogeneic system C57Bl/6 → (C57Bl/6 x DBA/2)F1. *Immunologiya*. 2017; 38(6): 26-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-26-31>

**For correspondence:** Olga M. Perminova, PhD, Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, E-mail: [pom.57@yandex.com](mailto:pom.57@yandex.com)

**Information about authors:**Volsky N.N., <http://orcid.org/0000-0002-9341-1997>Perminova O.M., <http://orcid.org/0000-0003-0142-019X>Goiman E.V., <http://orcid.org/0000-0002-6443-6917>Gavrilova E.D., <http://orcid.org/0000-0002-2014-3397>

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

Received 06.06.17

Accepted 16.08.17

**Для корреспонденции:** Перминова Ольга Михайловна, канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, E-mail: [pom.57@yandex.com](mailto:pom.57@yandex.com).

На сегодняшний день большинство исследователей придерживается хорошо обоснованного мнения о том, что реакция трансплантат против хозяина (РТПХ), индуцируемая введением мышам-гибридам первого поколения лимфоидных

донорских клеток одной из родительских линий, может проявляться в виде двух клинических вариантов этой патологии: при доминировании Th1-зависимых процессов развивается острая РТПХ, в то время как преобладание Th2-зависимых иммунологических реакций приводит к развитию хронической РТПХ [1, 2]. Этот устоявшийся взгляд на иммунопатологические процессы, возникающие в такой полуаллогенной системе, базируется на результатах экспериментов, которые однозначно свидетельствуют, что в развитии острой РТПХ (oРТПХ), протекающей с высокой смертностью животных в первые 3 – 4 нед после переноса донорских клеток, главную роль играют цитотоксические CD8<sup>+</sup>-клетки, формирующиеся под контролем Th1-лимфоцитов, в случаях же развития хронической РТПХ (xРТПХ) её основные клинические проявления связаны с поликлональной активацией В-клеток и генерацией больших количеств аутоантител, т. е. с процессами, прямо зависящими от активности Th2-лимфоцитов [3]. В пользу такого воззрения на роль Th1/Th2-соотношения в индукции того или иного варианта РТПХ в обсуждаемой здесь экспериментальной модели говорят и результаты тех исследований, в которых генерация и активность Th1-лимфоцитов подавлялась с помощью различных экзогенных воздействий. Так было установлено, что ингибирование продукции IFN- $\gamma$  или IL-12, играющих определяющую роль в развитии Th1-зависимых иммунных реакций, ведет к заметному снижению интенсивности клинических проявлений oРТПХ и к уменьшению смертности животных [4, 5].

Однако за последние десятилетия накопились разнообразные данные, которые позволяют, не оспаривая принципиальной верности вышеописанного взгляда на патогенез острой и хронической РТПХ, поставить вопрос о влиянии Th1/Th2-баланса и степени поляризации этого соотношения хелперных клеток на процессы развития как oРТПХ, так и xРТПХ. В частности, давно было обнаружено, что ранние стадии индукции обоих вариантов РТПХ характеризуются яркими проявлениями активности как Th1-, так и Th2-лимфоцитов [6]. При этом в первые дни после переноса донорских клеток, индуцирующих oРТПХ, наблюдалось преобладание в сыворотке мышей-реципиентов цитокинов, продуцируемых Th2-клетками, и лишь затем (к седьмому дню от начала реакции) было обнаружено резкое возрастание сывороточной концентрации IFN- $\gamma$  – основного маркера сдвига Th1/Th2-баланса в сторону Th1 [6]. В работах, выполненных в нашей лаборатории ранее, показано, что процесс xРТПХ, индуцированный в полуаллогенной системе переносом родительских лимфоидных клеток от мышей линии DBA, также зависит от обоих типов хелперных клеток и протекает по двум вариантам: Th1-зависимому, приводящему к развитию выраженного иммунодефицита, и Th2-зависимому, имеющему исходом формирование иммунокомплексного гломерулонефрита. При этом соотношение между этими клиническими формами xРТПХ может быть изменено благодаря воздействиям, сдвигающим Th1/Th2-баланс в сторону преобладания хелперов первого или второго типов [7, 8]. Естественно предположить, что и при развитии oРТПХ сдвиги Th1/Th2-соотношения в организме мышей-реципиентов могут играть аналогичную роль.

Цель настоящей работы – исследование динамики показателей, зависящих от активности Th1- и Th2-лимфоцитов, во время развития oРТПХ в полуаллогенной системе C57Bl/6 → (C57Bl/6 x DBA/2)F1 и оценка влияния на эти процессы веществ, способных сдвигать Th1/Th2-баланс в ту или иную сторону.

## Материал и методы

Эксперименты выполнены на 670 мышках-самках линии C57Bl/6 и гибридах (C57Bl/6 x DBA/2)F1, полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных НИИФКИ (Новосибирск) в возрасте 2,5 – 3 мес.

Мыши получали комбикорм, сбалансированный по потребностям в белках, жирах, углеводах, витаминах, минеральных веществах и микроэлементах. Все эксперименты проводили в стандартных условиях содержания животных, соблюдения температурного режима, освещенности. Экспериментальные исследования выполнены в полном соответствии с требованиями Международной конвенции по гуманному обращению с подопытными животными (Страсбург, 1986), а также Приказом МЗ РФ № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики» от 19.06.2003 г.

Исследуемые препараты, способные изменять Th1/Th2-соотношение в организме животных, вводили в соответствии со следующими схемами:

Полоксамер 407 (Pluronic F-127; Sigma) вводили внутривенно в дозе 7,5 мг/мышь через сутки в течение двух недель, как это было описано ранее [9]. Такой курс из семи инъекций препарата заканчивался за сутки до индукции oРТПХ.

Пентоксифиллин (Трентал; Aventis Pharma, Индия) вводили внутривенно в дозе 1 мг/мышь трехкратно: в день переноса донорских клеток и два последующих дня.

5-азациитидин (Sigma) вводили подкожно в дозе 50 мкг/мышь. Курс введения препарата состоял из 7 ежедневных инъекций, начиная со дня, следующего за переносом донорских лимфоцитов.

Животным в контрольных группах вводили соответствующее количество растворителя.

Острую РТПХ индуцировали внутривенным введением мышам-гибридам (C57Bl/6 x DBA/2)F1 спленоцитов, полученных от родительской линии C57Bl/6, в дозе 100 млн клеток/мышь. Индукцию oРТПХ у контрольных животных и у мышей, подвергавшихся воздействию используемых препаратов, выполняли во всех экспериментах в один и тот же день.

В части экспериментов после введения препаратов и индукции oРТПХ животных как контрольных, так и опытных групп наблюдались в течение 50 дней для оценки динамики их выживания. В другой части экспериментов у животных на 5, 12 и 20-й дни (считая день переноса донорских спленоцитов за нулевой день) определяли (в группах по 4 – 5 мышей) массу и клеточность лимфоидных органов – тимуса и селезенки.

Полученные данные приводятся в виде средних величин параметров, измеренных в нескольких (двух – трех) независимых экспериментах. Статистическую значимость различий между исследуемыми показателями оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни.

## Результаты

Данные, полученные в экспериментах, представлены на рис. 1, 2 и в таблице. Они убедительно подтверждают вывод, сделанный V. Rus [6] о том, что начальный период oРТПХ характеризуется преобладанием активности Th2-клеток. Действительно, на 5-е сутки после переноса лимфоцитов донора единственным признаком развивающегося процесса (как в контрольных группах, так и в группах мышей с воздействием полоксамера 407 и пентоксифиллина) является резко выраженная спленомегалия, т. е. показатель В-клеточной пролиферации, контролируемой активностью Th2. Этот, на первый взгляд кажущийся парадоксальным, факт был ранее хорошо известен, и в ту пору, когда модели xРТПХ были ещё не разработаны, выраженность спленомегалии считалась самым ярким и надёжным показателем интенсивности иммунопатологического процесса, развивающегося при oРТПХ [9].

В более поздние сроки на первый план в клинической картине oРТПХ выходит деструкция тимуса (Th1-зависимый показатель, связанный с активностью цитотоксических кле-

ток), а спленомегалия постепенно уменьшается вследствие общего опустошения лимфоидных органов, и на 20-й день величина селезенки у мышей с оРТПХ приближается к значению, наблюдающимся у интактных мышей, которые не подвергались никаким экспериментальным воздействиям.

Таким образом, данные, представленные на рисунках и в таблице, свидетельствуют о том, что картина оРТПХ складывается из двух параллельно идущих процессов: деструкции тканей (включая лимфоидную ткань) и поликлональной активации В-клеток, приводящей к увеличению селезенки на ранних этапах развития оРТПХ.

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что воздействие Р407, сдвигающего баланс хелперов в сторону Th1 [10], приводит к заметной интенсификации деструктивных процессов в организме мышей с оРТПХ: масса тимуса, характеризующая степень активности цитотоксических CD8<sup>+</sup>-клеток, оказалась на все сроки измерения существенно меньше в группе с введением Р407, нежели в контрольной группе с оРТПХ (см. рис. 1, а). О том же свидетельствует и сравнение динамики смертности мышей в контроле и опыте: средний срок жизни мышей, подвергавшихся воздействию Р407, уменьшился с 34 до 23 дней (см. таблицу, серия 1). В то же время полученные данные не позволяют говорить о том, что данный препарат стимулирует развитие оРТПХ в целом, поскольку выраженность спленомегалии, являющейся другим показателем интенсивности этого процесса, оказалась после воздействия Р407 сниженной по сравнению с контрольной группой (см. рис. 2, а).

Аналогичным образом пентоксифиллин – препарат, вызывающий сдвиг соотношения хелперов в сторону Th2 [11, 12], не только уменьшает интенсивность деструктивных процессов в организме мышей с оРТПХ, что выражается как в уменьшении эффектов цитотоксических клеток в тимусе (см. рис. 1, б), так и в увеличении срока жизни мышей, которым вводили этот препарат (см. таблицу, серия 2), но и увеличивает у них степень развития спленомегалии (сма. рис. 2, б). Таким образом, общий эффект действия этого препарата нельзя – как и в случае Р407 – считать тормозящим процесс развития оРТПХ. Пентоксифиллин, как свидетельствуют полученные нами данные, подавляет Th1-зависимые реакции, участвующие в этом процессе, но одновременно стимулирует его Th2-зависимые компоненты, что хорошо согласуется с его давно известным действием на Th1/Th2-баланс.

**Влияние исследуемых веществ на среднюю продолжительность жизни мышей и на динамику Th1- и Th2-зависимых показателей интенсивности острой РТПХ**

Серия экспериментов	Средний срок жизни, сут	Срок после индукции оРТПХ, сутки					
		5-е		12-е		20-е	
		Т	С	Т	С	Т	С
<b>Серия 1</b>							
оРТПХ	34	98	162	59	187	30	142
оРТПХ + Р407	23	82	160	34*	145	11*	79*
<b>Серия 2</b>							
оРТПХ	19	102	169	43	179	14	123
оРТПХ + ПОФ	27	104	196*	55	199	27*	112
<b>Серия 3</b>							
оРТПХ	20	104	162	57	185	34	129
оРТПХ + 5-АЗА	44	32*	80*	27*	132*	73*	108

Примечание. Т – тимус, С – селезенка; Р407 – полноксамер 407, ПОФ – пентоксифиллин, 5-АЗА – 5-азацитидин. Размеры тимуса и селезенки выражены в процентах от средней величины этих показателей у интактных (т. е. не подвергавшихся никаким воздействиям) животных. \* – Достоверное отличие от соответствующего контроля (p < 0,05).

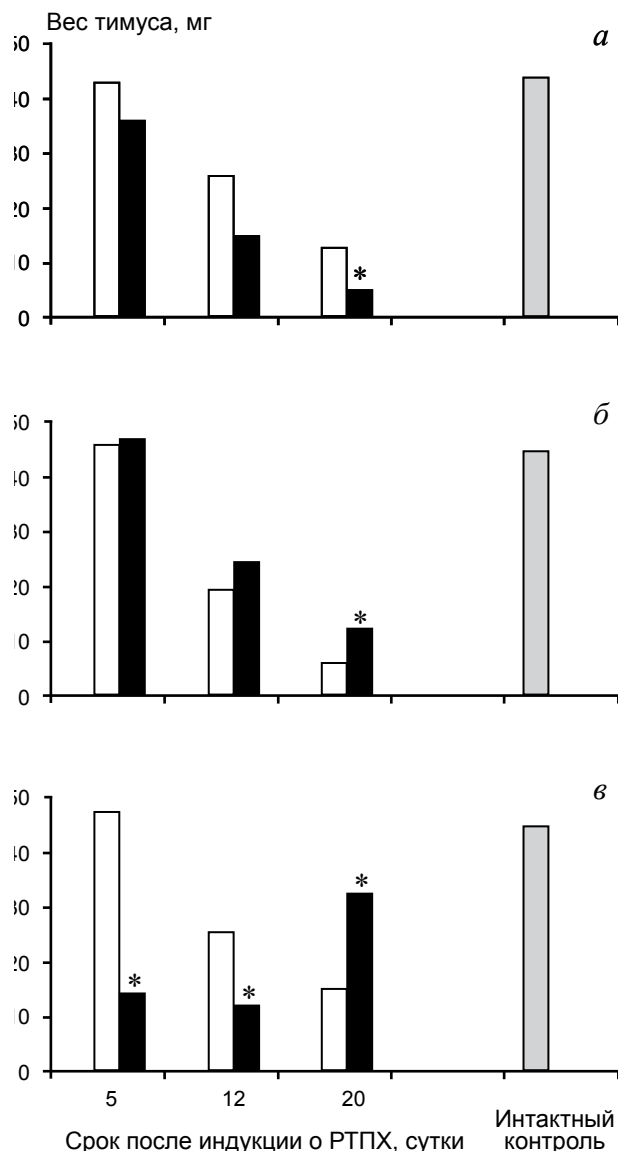


Рис. 1. Влияние использованных препаратов на степень деструкции тимуса в динамике острой РТПХ.

По оси абсцисс – срок после индукции оРТПХ, сутки; по оси ординат – масса тимуса, мг. Здесь и на рис. 2: светлые столбики – оРТПХ (контроль), темные столбики – оРТПХ + препарат, серые столбики – интактный контроль (животные, не подвергавшиеся никаким воздействиям). а – оРТПХ + полноксамер 407, б – оРТПХ + пентоксифиллин, в – оРТПХ + 5-азацитидин. \* - достоверное отличие от контроля (p < 0,05).

Совершенно другой тип воздействия на развитие оРТПХ – явно отличающийся от эффектов Р407 и пентоксифиллина – был обнаружен в опытах с 5-азацитидином. Несмотря на имеющиеся в литературе указания о возможности сдвига хелперов в сторону Th2 под влиянием этого вещества [13], данные наших экспериментов не могут быть объяснены с этой точки зрения. В отличие от вышеописанных препаратов, влияющих на относительную роль Th1- и Th2-зависимых реакций в развитии оРТПХ у конкретных животных, эффект 5-азацитидина заключается в резком подавлении всех типов иммунных реакций при оРТПХ, что легко объяснимо его цитостатическим действием на клетки иммунной системы (именно как цитостатик, данный лекарственный препарат довольно широко использовался в клинике [14]). Как видно

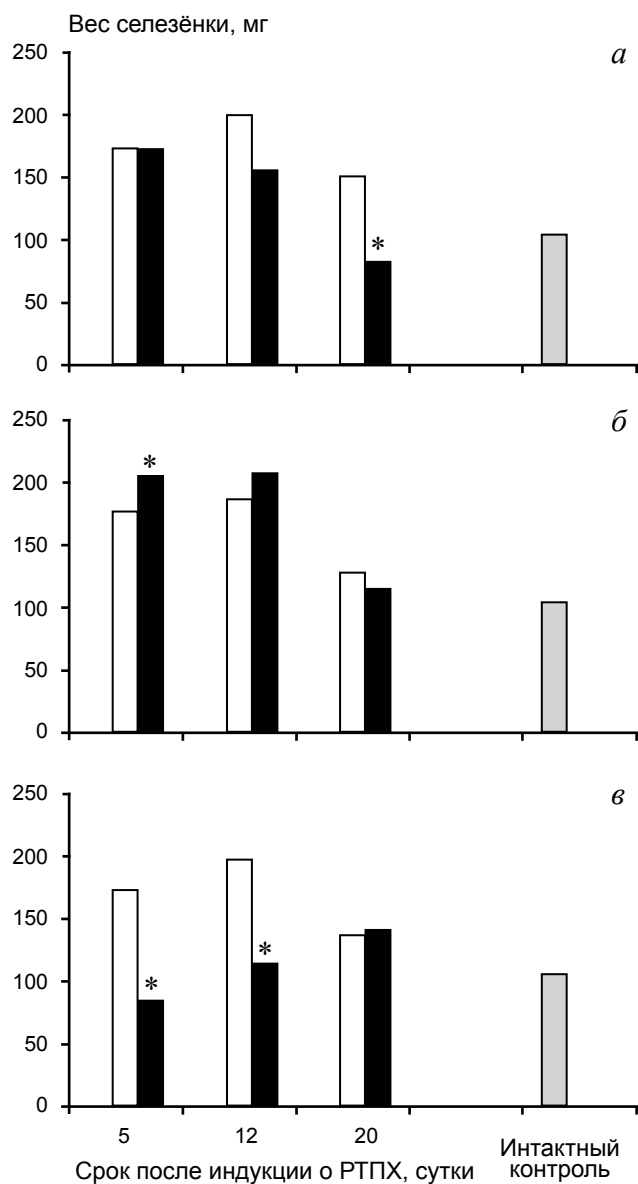


Рис. 2. Влияние использованных препаратов на выраженность спленомегалии в динамике острой РТПХ.

По оси абсцисс – срок после индукции оРТПХ, сутки; по оси ординат – масса селезенки, мг.

из рис. 1, в и 2, в и таблицы, введение 5-азациитидина приводит к значительному уменьшению лимфоидных органов (как тимуса, так и селезенки) уже на 5-й день после индукции оРТПХ. В последующие сроки наблюдается постепенное восстановление лимфоидной ткани и не обнаруживаются никаких характерных для развития оРТПХ признаков. Давно известные иммуносупрессивные свойства 5-азациитидина объясняют и его выраженный защитный эффект при исследуемом иммунопатологическом процессе (срок жизни мышей увеличивается более чем вдвое на фоне введения 5-азациитидина – см. таблицу, серия 3).

### Обсуждение

Из данных, приведенных в таблице, видно, что средний срок выживания мышей-реципиентов в контрольных группах (без каких-либо иных воздействий кроме переноса лим-

фоцитов доноров) колеблется от одной серии экспериментов к другой. Точно так же колеблется и количество контрольных животных, выживших в течение 50 дней с момента индукции оРТПХ (за период наблюдения), – этот показатель варьирует от 10 до 50% от исходного количества животных в группе. В группах мышей, на которых (в тех же экспериментах) воздействовали вещества, сдвигающие соотношение хелперов в сторону Th1 или Th2, эти показатели либо закономерно увеличивались (по сравнению с соответствующим контролем), либо уменьшались, в зависимости от направления Th1/Th2-сдвига. Исходя из такой динамики процесса, можно предположить, что наблюдаемые в контрольных группах мышей различия в течении (и, соответственно, исходах) оРТПХ в существенной мере определяются теми индивидуальными значениями Th1/Th2-соотношения, которые складываются в организме конкретных животных к моменту индукции оРТПХ.

По аналогии с уже изученной картиной хРТПХ, развивающейся в сходной полуаллогенной системе по двум клинически различным вариантам, можно сказать, что генетически идентичные мыши-гибриды, входящие в состав контрольной группы и не подвергавшиеся до того никаким экспериментальным воздействиям, функционально вовсе не однородны и различаются по ряду параметров, значения которых складываются в предшествующей индивидуальной жизни животных и закрепляются с помощью широко понимаемых эпигенетических механизмов, поддерживающих их на определенном уровне. Одним из таких эпигенетически закреплённых параметров может быть величина Th1/Th2-соотношения. Поэтому при ответе на одно и то же экспериментальное воздействие (всем реципиентам вводится одна и та же аликвота из общей суспензии родительских клеток) у генетически однородных мышей-гибридов развиваются различные варианты оРТПХ: у мышей с исходным сдвигом Th1/Th2-соотношения в сторону Th1 – интенсивно протекающая оРТПХ с выраженной деструкцией тканей хозяина (в том числе, клеток лимфоидных органов и костного мозга) и гибелью в течение 3–4 нед, в то время как у мышей, исходно имевших сдвиг хелперного соотношения в сторону относительного преобладания Th2, развитие популяции клеток-киллеров (зависящее от активности Th1-лимфоцитов) в определённой степени тормозится и формируется более мягкий вариант развития оРТПХ – с меньшей деструкцией лимфоидной и гемопоэтической систем и их последующим восстановлением (у выживших животных с 20-го дня после момента индукции наблюдается постепенное восстановление содержания лейкоцитов в периферической крови). Именно эти животные – с Th2-зависимым вариантом развития

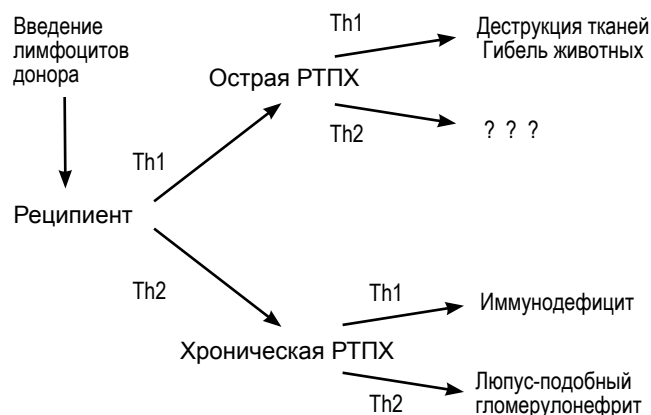


Рис. 3. Влияние Th1/Th2-соотношения на развитие клинических вариантов острой и хронической РТПХ.

оРТПХ – и составляют, как можно предположить, основную массу тех реципиентов, которые остались живыми в течение всего срока наблюдения.

Вышеизложенный взгляд на различные клинические варианты развития РТПХ в полуаллогенных системах наглядно представлен на рис. 3. Исходя из этой схемы, можно сделать вывод, что, несмотря на постулируемую сегодня полярную противоположность между острой и хронической формами РТПХ, эти, казалось бы, совершенно различные типы аутоиммунных процессов обладают и определенным структурным сходством. Основное их подобие можно увидеть в том, что как хроническая, так и острая форма иммунного конфликта, индуцируемого введением в организм хозяина донорских лимфоцитов, не ведут к возникновению однородной клинической картины заболевания, а распадаются – каждая внутри себя и без какого-либо воздействия извне – на различные клинические варианты, со своей симптоматикой и прогнозом заболевания. Здесь можно также заметить, что такой «спонтанный», т. е. не обусловленный какими-либо манипуляциями экспериментатора, выбор патологическим процессом направления своего дальнейшего развития весьма схож с той пёстрой картиной многочисленных вариантов течения аутоиммунных заболеваний, которая наблюдается у индивидуальных больных в клинике, и это делает используемую нами модель особенно интересной и перспективной в плане изучения внутренних механизмов аутоиммунитета и «срывов» толерантности к собственным антигенам организма.

На иллюстрирующей вышеизложенное предположение схеме (см рис. 3) показано, что первичное разделение на острую и хроническую форму РТПХ обусловлено генетическими различиями между родительскими линиями мышей, которые, как известно, играют решающую роль в развитии данного иммунопатологического состояния [2]. Давно установлено [15], что неспособность клеток линии DBA/2 продуцировать значительное количество активных цитотоксических лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>), распознающих антигены реципиента, и, следовательно, приводить к развитию острой формы РТПХ связана с неким генетическим дефектом, имеющимся у этой линии мышей. Сущность этого дефекта остается до конца не выясненной. Однако относительно недавно обнаружено [16], что линия DBA/2 (в отличие от линии C57Bl/6) несёт в своём геноме мутантный ген клеточного рецептора GPR84, эндогенными лигандами которого считаются жирные кислоты со средней длиной цепи (от C9 до C14) и который экспрессируется в больших количествах на клетках лимфоидных органов (в основном на макрофагах и нейтрофильных лейкоцитах). Поскольку основная (выясненная на сегодняшний день) функция этого рецептора заключается в стимуляции экспрессии белка p40, вызванной действием провоспалительных факторов [17], и поскольку этот белок представляет собой одну из субъединиц IL-12 – важнейшего стимулятора пролиферации Th1-клеток, – можно предположить, что именно отсутствие у линии DBA/2 функционально активного белка GPR84 мешает лимфоцитам этой родительской линии формировать достаточное количество цитотоксических клеток, вызывающих массивную деструкцию тканей в организме реципиента. Однако вопрос о возможной роли такого механизма в развитии РТПХ ещё не разрешён и требует дальнейшего исследования.

Разделение хРТПХ на два клинических варианта течения и симптомы, им соответствующие, исследованы нами ранее [7, 8]. Что же касается Th1- и Th2-зависимых вариантов развития оРТПХ, то достаточно полно изучен лишь первый из этих вариантов, который и отождествляется с острой формой заболевания в целом. Те же мыши, которые выживают после индукции оРТПХ (и, по нашему предположению, представляют собой индивидуумов с развитием Th2-зависимого варианта заболевания), не привлекали внимания экспериментаторов, и про них мало что известно. Единственное, что

можно про них утверждать, – это отсутствие в картине их заболевания классических признаков хРТПХ: иммунокомплексного гломерулонефрита с массивной протеинурией и гиперхолестеринемией. Клиническая картина этого варианта оРТПХ требует детального изучения, и на сегодняшний день можно лишь предполагать, основываясь на соображениях определенной симметрии в развитии острой и хронической форм РТПХ, что некоторые симптомы, характерные для Th2-зависимого варианта оРТПХ, могут быть сходны с теми, которые обнаруживаются у Th1-зависимого варианта хРТПХ (выраженное подавление гуморального иммунного ответа на антигенную стимуляцию и т.п.)

Кроме того, можно с достаточной степенью уверенности утверждать, что выживание части животных после переноса им клеток от линии C57Bl/6 нельзя объяснить простым предположением о том, что развитие оРТПХ у этих индивидов идёт тем же самым путём, что и у их погибших сородичей, но лишь с меньшей интенсивностью, а потому им удаётся избежать гибели в обычные сроки. Против этого говорят данные, полученные нами в экспериментах с 5-азациитидином – препаратом, который благодаря своей цитостатической активности снижает интенсивность проявлений аутоиммунного заболевания, развивающегося в ответ на введение лимфоцитов донора. Введение мышам-реципиентам 5-азациитидина значительно снижает смертность животных и увеличивает среднюю продолжительность жизни в экспериментальных группах с индукцией оРТПХ. И в этом препарат оказывается даже более эффективным, чем вещества, сдвигающие баланс хелперов в сторону Th2. Однако динамика состояния лимфоидных органов у мышей, получавших инъекции этого цитостатика, резко отличается от их стандартных изменений в ходе развития оРТПХ и показывает, что его влияние на выживаемость мышей-реципиентов связано с подавлением пролиферации лимфоцитов: это вещество снижает интенсивность проявлений оРТПХ за счёт торможения всех иммунных реакций. В то же время вещества, воздействующие на Th1/Th2-баланс, не отменяют естественного развития этих реакций, а влияют лишь на соотношение между их относительной интенсивностью, направляя тем самым развитие целостного иммунопатологического процесса в ту или иную сторону.

Суммируя изложенное, можно сказать, что полученные результаты экспериментов хорошо согласуются с представлением о том, что как в случае развития хронической формы заболевания, вызванного введением мышам-гибридам лимфоцитов одной из родительских линий, так и при развитии острой формы того же иммунопатологического процесса иммунные реакции, находящиеся под контролем Th1- и Th2-клеток, протекают одновременно и параллельно друг другу. При этом клинические проявления аутоиммунного процесса в целом зависят от соотношения интенсивностей этих видов иммунных реакций и в конечном итоге от ранее сложившегося в организме Th1/Th2-соотношения. Именно это соотношение, создавшееся в организме мышей-реципиентов до индукции РТПХ или складывающееся на самой ранней стадии этого процесса и затем поддерживаемое благодаря ещё не вполне расшифрованным эпигенетическим механизмам, оказывает решающее влияние на развитие у генетически однородных реципиентов того или иного варианта иммунопатологического процесса и, следовательно, того или иного исхода заболевания – не только в случае хронической формы РТПХ (что было показано нами ранее), но и в случае развития острой формы этого заболевания.

Следует также упомянуть, что с практической точки зрения результаты описанных выше опытов свидетельствуют о возможности использования модели оРТПХ как простой тест-системы, в которой можно оценивать способность различных веществ влиять на баланс Th1- и Th2-лимфоцитов в организме. Эта модель для первичного скрининга иммуноактивных

препаратов может иметь определённое преимущество в сравнении с ранее описанной нами моделью на базе хРТПХ [7], поскольку результаты оценки могут быть получены в более краткие сроки (эксперименты занимают не три месяца – как в случае использования хРТПХ, – а лишь три – четыре недели).

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

7. Козлов В.А., Кудяева О.Т., Колесникова О.П., Сафронова И.В., Лактионов П.П., Рыкова Е.Ю., Обухова Л.А. Th1- и Th2-зависимые варианты хронической реакции трансплантат против хозяина. *Иммунология*. 2002; 23(3): 143–6.
10. Перминова О.М., Вольский Н.Н., Кудяева О.Т., Гойман Е.В., Козлов В.А. Дислипидемия и Th1/Th2-соотношение на разных этапах развития хронической реакции “трансплантат против хозяина”. *Иммунология*. 2009; 6: 341–5.
12. Кудяева О.Т., Гойман Е.В., Лыков А.П., Колесникова О.П., Козлов В.А. Влияние препаратов, изменяющих соотношение Th1/Th2, на частоту развития клинических вариантов хронической реакции трансплантат против хозяина. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2005; 140(3): 325–7.

## REFERENCES

1. Allen R.D., Staley T.A., Sidman C.L. Differential cytokine expression in acute and chronic murine graft-versus-host-disease. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23 (2): 333–7.
2. Schroeder M.A., DiPersio J.F. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis. Model. Mech.* 2011; 4 (3): 318–33.
3. Via C.S. Advances in lupus stemming from the parent-into-F1 model. *Trends Immunol.* 2010; 31(6): 236–45.
4. Ellison C.A., Fischer J.M., HayGlass K.T., Gartner J.G. Murine graft-versus-host disease in an F1-hybrid model using IFN-gamma gene knockout donors. *J. Immunol.* 1998; 161(2): 631–40.
5. Williamson E, Garside P, Bradley J.A., More IA, Mowat A.M. Neutralizing IL-12 during induction of murine acute graft-versus-host disease polarizes the cytokine profile toward a Th2-type alloimmune response and confers long term protection from disease. *J. Immunol.* 1997; 159(3): 1208–15.
6. Rus V., Svetic A., Nguyen P., Gause W.C., Via C.S. Kinetics of Th1

- and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD8+ T cells. *J. Immunol.* 1995; 155(5): 2396–406.
7. Kozlov V.A., Kudaeva O.T., Kolesnikova O.P., Saphronova I.V., Laktionov P.P., Rykova E.Yu., Obukhova L.A. Th1- and Th2-dependent variants of chronic graft-versus-host reaction. *Immunologiya*. 2002; 23(3): 143–6. (in Russian)
  8. Kudaeva O.T., Kolesnikova O.P., Goiman E.V., Tkachev V.O., Volsky N.N., Perminova O.M. et al. The experimental model of the autoimmune glomerulonephritis induced by the chronic graft versus host reaction. In: Prabhakar S.S., ed. An update on glomerulopathies - Etiology and pathogenesis. Rijeka: In Tech; 2011: 49–86.
  9. Simonsen M. Graft versus host reactions. Their natural history, and applicability as tools of research. *Prog. Allergy*. 1962; 6: 349–467.
  10. Perminova O.M., Volsky N.N., Kudaeva O.T., Goiman E.V., Kozlov V.A. Dyslipidemia and Th1/Th2 relationship at different stages of chronic “graft-versus-host” reaction. *Immunologiya*. 2009; 6: 341–5. (in Russian)
  11. Laurat E., Poirier B., Tupin E., Caligiuri G., Hansson G.K., Bariéty J., Nicoletti A. In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. 2001; 104(2): 197–202.
  12. Kudaeva O.T., Goiman E.V., Lykov A.P., Kolesnikova O.P., Kozlov V.A. Effects of preparations modifying Th1/Th2 ratio on the incidence of clinical variants of chronic graft-versus-host reaction. *Byulleten'eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2005; 140(3): 325–7. (in Russian)
  13. Qudus J., Johnson K.J., Gavalchin J., Amento E.P., Chrisp C.E., Yung R.L., Richardson B.C. Treating activated CD4+ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice. *J. Clin. Invest.* 1993; 92(1): 38–53.
  14. Wang C., McCulloch E.A. Sensitivity to 5-azacytidine of blast progenitors in acute myeloblastic leukemia. *Blood*. 1987; 69(2): 553–9.
  15. Chu Y.W., Gress R.E. Murine models of chronic graft-versus-host disease: insights and unresolved issues. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2008; 14(4): 365–78.
  16. Perez C.J., Dumas A., Vallières L., Guénet J.L., Benavides F. Several classical mouse inbred strains, including DBA/2, NOD/Lt, FVB/N, and SJL/J, carry a putative loss-of-function allele of Gpr84. *J. Hered.* 2013; 104(4): 565–71.
  17. Alvarez-Curto E., Milligan G. Metabolism meets immunity: The role of free fatty acid receptors in the immune system. *Biochem. Pharmacol.* 2016; 114: 3–13.

Поступила 06.06.17  
Принята в печать 16.08.17

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ИММУНОПАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.348-002.44-036.12-078.33-092.9

Гао Ю.<sup>1</sup>, Постовалова Е.А.<sup>1,2</sup>, Добрынина М.Т.<sup>1</sup>, Макарова О.В.<sup>1,2</sup>**ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ И ОБОДОЧНОЙ КИШКЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ**<sup>1</sup>Кафедра клеточной биологии и гистологии МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва;<sup>2</sup>ФГБНУ «НИИ морфологии человека», 117418, Москва

На модели хронического язвенного колита, индуцированного 1% водным раствором декстрансульфата натрия у мышей линии C57Bl/6, изучали половые различия воспалительного процесса и субпопуляционного состава лимфоцитов. С помощью морфологических методов оценивали выраженность язвенного и воспалительного процессов, определяли субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови, брыжеечных лимфатических узлов и ободочной кишки методом проточной цитофлюориметрии. Показано, что по сравнению с самцами у самок мышей C57Bl/6 хронический язвенный колит протекает тяжелее, у самок более выражен язвенный и воспалительный процессы. Меньшая выраженность воспалительного процесса у самцов сочетается со снижением в ободочной кишке числа лимфоидных узелков. В периферической крови и брыжеечных лимфатических узлах по сравнению с самцами у самок выше относительное содержание CD3+CD8+ цитотоксических и FoxP3+ регуляторных Т-лимфоцитов и в периферической крови CD3+CD4+ Т-хелперов. В отличие от самцов у самок содержание В-лимфоцитов ниже в брыжеечных лимфатических узлах, но выше в ободочной кишке. При хроническом язвенном колите содержание FoxP3+ CD4+CD25+ регуляторных Т-лимфоцитов в ободочной кишке у самок снижается, а у самцов повышается в периферической крови в 3,6 и брыжеечных лимфатических узлах в 2,8 раза, а в ободочной кишке не изменяется. В ободочной кишке у самцов относительное количество CD3+CD4+ Т-хелперов снижается. Относительный показатель субпопуляции CD3-CD19+ В-лимфоцитов при хроническом язвенном колите у животных обоего пола в периферической крови снижается, а в ободочной кишке повышается. В брыжеечных лимфатических узлах этот показатель у самцов повышается.

**Ключевые слова:** половые различия; хронический язвенный колит; морфология; мыши C57Bl/6; субпопуляционный состав лимфоцитов.

**Для цитирования:** Гао Ю., Постовалова Е.А., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Половые различия субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови, брыжеечных лимфатических узлах и ободочной кишке при экспериментальном хроническом язвенном колите. *Иммунология*. 2017; 38(6): 32-38. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-6-32-38>

Gao Y<sup>1</sup>, Postovalova E.A.<sup>1,2</sup>, Dobrynina M.T.<sup>1</sup>, Makarova O.V.<sup>1,2</sup>**SEX DIFFERENCES OF SUBPOPULATION COMPOSITION OF LYMPHOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD, MESENTERIC LYMPH NODES AND COLON IN EXPERIMENTAL CHRONIC ULCERATIVE COLITIS**<sup>1</sup>Department of Cell biology and histology, The biological faculty of Lomonosov Moscow State University, 119234, Moscow;<sup>2</sup>Research institute of human morphology, 117418, Moscow

We studied sex differences of the inflammatory process and the subpopulation composition of lymphocytes in chronic ulcerative colitis, induced with 1% aquatic solution in C57Bl/6 mice. We showed that chronic ulcerative colitis was more severe in female C57Bl/6 mice, in comparison with males, with more pronounced ulceration and inflammation. Female mice had higher relative content of CD3+CD8 cytotoxic and FoxP3+ regulatory T-lymphocytes in the peripheral blood and lymph nodes and CD3+CD4+ T-helpers in the peripheral blood. Unlike males the B-lymphocytic content of female mice was lower in the mesenteric lymph nodes but higher in the colon. In female mice with chronic ulcerative colitis the content of FoxP3+ CD4+CD25+ regulatory T-lymphocytes decreased, but in male mice it increased 3.6 fold in the peripheral blood, 2.8 fold in mesenteric lymph nodes and did not change in the colon. Male mice also had a decrease in the relative number of CD3+CD4+ T-helpers. During chronic ulcerative colitis, both sexes had a decrease in the level of the CD3-CD19+ B-lymphocytic subpopulation in the peripheral blood and an increase in the colon

**Keywords:** Sex differences; chronic ulcerative colitis; morphology; C57Bl/6 mouse; subpopulation composition of lymphocytes.

**For citation:** Gao Y., Postovalova E.A., Dobrynina M.T., Makarova O.V. Sex differences of subpopulation composition of lymphocytes in the peripheral blood, mesenteric lymph nodes and colon in experimental chronic ulcerative colitis. *Immunologiya*. 2018; 39(1): 32-38. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-32-38>

**For correspondence:** Postovalova Ekaterina Andreevna, E-mail: [e.a.postovalova@gmail.com](mailto:e.a.postovalova@gmail.com)

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

Received 15.06.15  
Accepted 16.08.17



## Введение

Проблема гендерных различий клинического течения и механизмов развития воспалительных заболеваний интенсивно изучается и является актуальной, так как лечение больных с учётом пола позволит повысить его эффективность [1]. По данным литературы, показатели частоты развития большинства воспалительных инфекционных заболеваний, а также смертность выше у мужчин, чем у женщин [1]. Половые гистофизиологические различия иммунной системы, играющей ключевую роль в развитии воспалительных заболеваний, определяются кариотипом и уровнем стероидных половых гормонов – эстрогенов, прогестерона, андрогенов и экспрессией клеточных рецепторов к ним [2 – 6]. Половой диморфизм частоты развития и тяжести течения инфекционно-воспалительных и аутоиммунных заболеваний у человека особенно ярко проявляется после полового созревания, что, вероятно, обусловлено влиянием половых гормонов на морфофункциональное состояние иммунной системы и метаболические процессы [2, 3, 6]. Показано, что у женщин репродуктивного возраста выраженность реакций клеточно-опосредованного и гуморального иммунного ответа выше, чем у мужчин [2, 7, 8]. По сравнению с мужчинами у женщин выше содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови и уровень продукции противовоспалительных цитокинов [3, 9, 10].

Гендерные различия воспалительных заболеваний кишечника представлены в литературе, главным образом, клиническими и статистическими данными. В литературе [11] I.K. Kim и соавт. показали, что распространённость язвенного колита составляет 0,16 случаев на 100 тыс. человек. Половых различий в частоте развития язвенного колита не выявлено [12]. Известно, что при длительном течении язвенного колита у мужчин в 5 раз чаще, чем у женщин развивается колоректальный рак [13, 14].

К сожалению, во многих работах, посвящённых инфекционно-воспалительным заболеваниям и, в частности, язвенному колиту, исследования проводятся без учёта пола больных и их репродуктивного статуса [11]. Пол и уровень стероидных гормонов в значительной мере модифицируют иммунный ответ и, соответственно, течение воспалительных процессов при язвенном колите. Изучение половых различий течения язвенного колита особенно актуально, так как полученные результаты позволят проводить более успешную терапию.

В литературе данные о половых различиях клинического течения и морфологических проявлений хронического язвенного колита отсутствуют, что связано с трудностями в формировании репрезентативных групп наблюдения по длительности течения заболевания, его активности и проводимой лекарственной терапии.

Цель работы – изучение половых различий морфологических изменений и субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови, брыжеечных лимфатических узлах и ободочной кишке при экспериментальном хроническом язвенном колите, индуцированном декстрансульфатом натрия у половозрелых мышей линии C57Bl/6.

## Материал и методы

Работа выполнена на половозрелых самках ( $n = 20$ ) и самцах ( $n = 20$ ) мышей C57Bl/6, полученных из питомника филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Методом случайного отбора были сформированы контрольные и опытные группы, по 10 животных в каждой. Возраст мышей составлял 6 – 8 недель, масса тела – 18 – 22 г. Животные получали свободный доступ к питьевой воде и брикетированному корму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб»). При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.

С целью моделирования хронического язвенного колита мыши опытной группы обоего пола получали 1%

водный раствор декстрансульфата натрия (ДСН) (M<sub>r</sub> ~40,000, BioChemica, Германия) в течение первых четырёх суток эксперимента и повторно с 10-х по 12-е и с 21-х по 25-е сутки. Мыши контрольной группы получали питьевую воду. Животных с хроническим колитом и контрольных групп выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира на 60-е сутки.

Лимфоидные узелки подсчитывали в макропрепаратах ободочной кишки, фиксированных в 2% водном растворе уксусной кислоты. Для гистологического исследования проводили забор дистального отдела ободочной кишки, материал фиксировали в жидкости Буэна. Образцы тканей проводили по спиртовым растворам возрастающих концентраций, заливали в парафин, изготавливали гистологические препараты. Проводку материала осуществляли в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, США). Обезвоженные образцы заливали в гистомикс на аппарате Tissue-Tek TEC (Sakura, США), изготавливали срезы толщиной 4 – 6 мкм на микротоме модели Microm HM340E (Thermo Scientific, США), монтировали их на предметные стёкла, проводили стандартную гистологическую обработку препаратов и окрашивали их гематоксилином и эозином. Анализ и съёмку гистологических препаратов проводили на микроскопе AxioPlan 2 Imaging (Carl Zeiss, Германия) с цифровой камерой AxioCam RHC (Carl Zeiss, Германия).

Для морфометрической оценки распространённости гиперемии и язв макропрепараты продольно рассечённой ободочной кишки мышей с хроническим язвенным колитом фотографировали и на фотографиях оценивали их площадь с помощью морфометрической программы Image-Pro Plus 6.0.

С целью иммунофенотипического анализа лимфоцитов получали суспензию клеток из брыжеечных лимфатических узлов с помощью гомогенизатора Поттера в культуральной среде 199 с солями Хэнкса и глутамином (ПанЭко). Выделение суспензии клеток из ободочной кишки проводили по В. Weigmann и соавт. (2007). Фрагменты медиального отдела ободочной кишки инкубировали в растворе культуральной среды RPMI Medium 1640 (Gibco, UK) с этилендиаминтетрауксусной кислотой (Sigma Aldrich, USA) и дитиотрейтолом, затем в культуральной среде RPMI Medium 1640 (Gibco, UK), содержащей коллагеназу Д (Roche, Switzerland), выделенную из Clostridium histolyticum, диспазу 2 (Roche, Швейцария), полученную из Bacillus polymyxa, ДНКазу 1 (Thermo Scientific, США). Проводили забор крови из шейных вен, в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА (5 мг/мл).

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и суспензии клеток брыжеечных лимфатических узлов и стенки ободочной кишки определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США), использовали антитела CD3e-FITC, CD4-PE-Cy5, CD8a-PE-Cy7, CD19-PE, F4/80-PE (eBioscience, США). Выявление субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов проводили согласно протоколу с помощью наборов Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #3 (eBioscience, США). Абсолютное количество лейкоцитов и лимфоцитов в крови оценивали на гематологическом анализаторе Celltac alpha MEK-6400 (Nihon Kohden, Япония), абсолютное количество клеток в суспензиях клеток подсчитывали в камере Горяева.

Статистическую обработку показателей проводили с учётом характера распределения непараметрическими методами ( $U$ -критерий Манна – Уитни) в программе Statistica 8.0. Вычисляли медиану и интерквартильный размах – 25 – 75%. Различия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

При сравнительной макроскопической оценке относительной площади распространённости очагов – гиперемии и язв в слизистой оболочке ободочной кишки – установлено, что у самок с хроническим язвенным колитом показатели статистически значимо выше, чем у самцов (рис. 1).

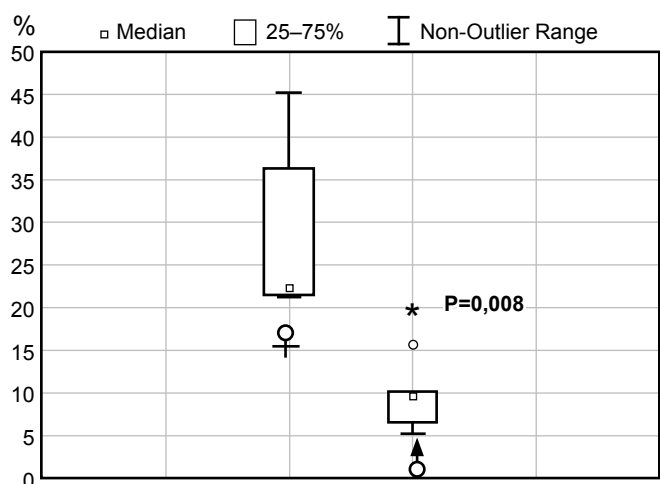


Рис. 1. Относительная площадь язв в слизистой оболочке ободочной кишки у самок и самцов мышей C57Bl/6 при хроническом язвенном колите ( $p < 0,05$ ).

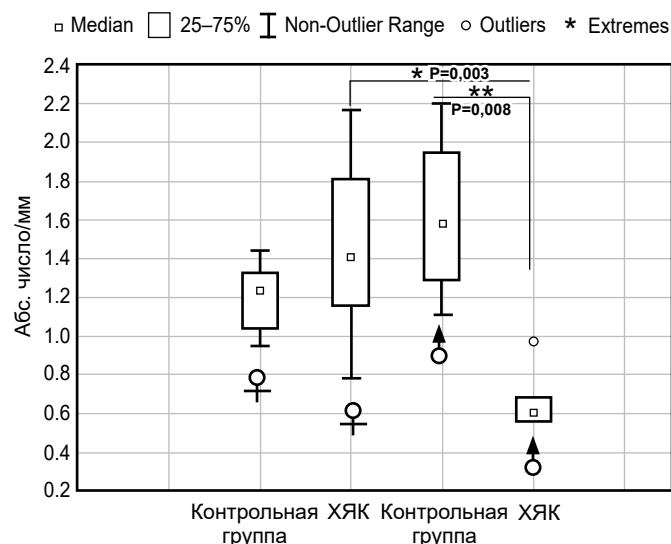


Рис. 2. Абсолютное количество лимфоидных узелков в ободочной кишке у самок и самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и при хроническом язвенном колите (ХЯК).

При гистологическом исследовании продольных срезов дистального отдела ободочной кишки у самцов и самок мышей C57Bl/6 с хроническим язвенным колитом картина была сходной и мозаичной. Отмечалось небольшое количество эпителизирующихся язв. Язвы были узкие, щелевидной или пирамидальной формы, их поверхность была выстлана однорядным уплощённым эпителием. Дно язв образовано грануляционной тканью с частично упорядоченным ходом коллагеновых волокон, со слабо- и умеренно выраженной инфильтрацией лимфоцитами, плазмощитами, гистиоцитами. В краях язв выявлялись деформированные крипты, выстланные высоким призматическим эпителием с наличием митозов и отсутствием бокаловидных клеток.

На всём протяжении ободочной кишки наблюдалась воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки, особенно её базального отдела, и подслизистой основы плазмощитами, лимфоцитами, единичными нейтрофила-

ми и макрофагами, была видна деформация крипт, заполнение их просветов слизью. Встречались небольшие участки слизистой оболочки без выраженных воспалительных изменений. Отмечался очаговый фиброз базального отдела собственной пластинки слизистой и мышечной оболочек. По сравнению с самцами у самок показатель объёмной доли воспалительного инфильтрата был выше и составил, соответственно, 19,55 (17,93, 21,37) и 30,23 (27,93, 31,35). На всём протяжении ободочной кишки в слизистой оболочке, преимущественно в её собственной пластинке, выявлялись лимфоидные узелки, часть их была со светлыми центрами. По данным макроскопической оценки, число лимфоидных узелков у самок с хроническим колитом по сравнению с контрольной группой не изменялось, а у самцов снижалось (рис. 2).

Таким образом, при хроническом язвенном колите в отличие от самцов у самок отмечалась большая распространённость язвенного процесса, более выраженная воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы. Менее выраженный язвенно-воспалительный процесс у самцов сочетался со снижением числа лимфоидных узелков в стенке ободочной кишки.

В контрольной группе по сравнению с самками у самцов в периферической крови относительное содержание CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов и FoxP3+CD4+CD25+ регуляторных Т-лимфоцитов было ниже. В брыжеечных лимфатических узлах у самцов было ниже процентное содержание CD3+CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов и FoxP3+CD4+CD25+ регуляторных Т-лимфоцитов, а в ободочной кишке – регуляторных Т-лимфоцитов (рис. 3). Относительное количество В-лимфоцитов в периферической крови у самок и самцов не различалось. По сравнению с самками у самцов в брыжеечных лимфатических узлах содержание В-лимфоцитов было выше в 1,6 раза, а в ободочной кишке – в 6,5 раза ниже (рис. 3).

При хроническом язвенном колите, по сравнению с контрольной группой, у самок в периферической крови снижались показатели относительного количества В-лимфоцитов (табл. 1). В брыжеечных лимфатических узлах у самок (в отличие от контроля) повышались показатели абсолютного количества лейкоцитов и лимфоцитов (табл. 2). В суспензии клеток, выделенных из ободочной кишки, при хроническом колите у самок отмечалось увеличение показателей процентного содержания В-лимфоцитов, а относительное содержание регуляторных Т-лимфоцитов было выше у животных контрольной группы (табл. 3).

В периферической крови у самцов с хроническим колитом по сравнению с контролем были ниже показатели относительного количества Т-хелперов (14,84 (14,40,16,00) – контрольная группа; 11,75 (6,90, 14,20) – хронический язвенный колит;  $p < 0,02$ ) и В-лимфоцитов, а регуляторных Т-лимфоцитов – выше (см. табл. 1). В брыжеечных лимфатических узлах по сравнению с контролем при хроническом колите у самцов снижалось процентное содержание Т-лимфоцитов хелперов (34,18 (29,00, 37,60) – контрольная группа; 25,80 (21,00, 30,00) – хронический язвенный колит;  $p < 0,01$ ), но повышалось процентное содержание В-лимфоцитов и регуляторных Т-лимфоцитов (см. табл. 2). В суспензии клеток из ободочной кишки при хроническом колите у самцов увеличивались показатели относительного количества Т-хелперов (2,90 (1,60, 3,50) – контрольная группа; 7,40 (4,60, 12,20) – хронический язвенный колит;  $p < 0,003$ ) и В-лимфоцитов (см. табл. 3).

### Обсуждение результатов исследования

В работе Ю. Гао и соавт. [15] на модели острого язвенного колита, индуцированного ДСН, показано, что у самцов мышей C57Bl/6 его клинические и морфологические проявления более выражены, чем у самок. В отличие от экспериментального острого язвенного колита, при ко-

Таблица 1

**Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у самок и самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и при хроническом язвенном колите (ХЯК)**

Параметры	Контр., самки	ХЯК, самки	<i>p</i>	Контр., самцы	ХЯК, самцы	<i>p</i>
Лейкоциты, млн/мл	7.80 (6.70, 8.80)	5.40 (5.20, 5.40)	0,006	9.38 (8.80, 9.60)	6.75 (4.40, 11.70)	0,08
Лимфоциты, млн/мл	5.30 (4.70, 7.80)	3.50 (3.30, 3.50)	0,03	7.50 (7.06, 8.10)	7.80 (6.50, 9.40)	0,35
Т-хелперы (CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ), %	16.760 (14.80, 17.70)	17.00 (16.40, 18.10)	0,62	14,84 (14,14; 16,0)	11.75 (6.90, 14.20)	0,02
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ), %	16.00 (13.80, 17.65)	16.90 (14.80, 17.90)	0,72	12.88 (11.20, 14.60)	10.95 (9.30, 19.40)	0,35
В-лимфоциты (CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> ), %	58.10 (53.70, 60.35)	42.95 (39.60, 50.85)	0,03	65.80 (57.90, 66.80)	44.20 (30.00, 54.00)	0,001
Регуляторные Т-лимфоциты (Foxp3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ), % от Т-хелперов	6.80 (5.40, 10.20)	7.60 (6.75, 8.00)	0,86	2.80 (2.40, 3.60)	9.95 (7.30, 11.50)	0,0001

Таблица 2

**Субпопуляционный состав лимфоцитов брыжеечных лимфатических узлов у самок и самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и при хроническом язвенном колите (ХЯК)**

Параметры	Контр., самки	ХЯК, самки	<i>p</i>	Контр., самцы	ХЯК, самцы	<i>p</i>
Лейкоциты, млн/мл	28.8 (22.30, 33.90)	38.90 (32.85, 43.40)	0.045	27.24 (22.80, 27.50)	22.90 (11.75, 43.15)	0.85
Лимфоциты, млн/мл	24.70 (19.13, 29.07)	33.57 (28.35, 37.46)	0.045	19.39 (15.61, 20.48)	19.09 (9.80, 35.98)	0.95
Т-хелперы (CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ), %	35.10 (33.70, 35.30)	33.75 (32.95, 35.45)	0.52	34.18 (29.00, 37.60)	25.80 (21.00, 30.00)	0.01
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ), %	36.60 (35.60, 37.10)	33.45 (32.25, 38.10)	0.28	25.37 (21.70, 26.40)	27.10 (23.90, 27.80)	0.30
В-лимфоциты (CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> ), %	22.80 (20.80, 25.60)	25.85 (20.75, 27.05)	0.35	36.46 (36.10, 37.10)	40.20 (37.90, 47.80)	0.03
Регуляторные Т-лимфоциты (Foxp3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ), % от Т-хелперов	17.10 (12.60, 18.80)	17.75 (15.85, 21.20)	0.95	5.41 (5.40, 5.52)	14.95 (13.80, 17.65)	0.002

Таблица 3

**Субпопуляционный состав лимфоцитов в суспензии клеток, выделенных из ободочной кишки у самок и самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и при хроническом язвенном колите (ХЯК)**

Параметры	Контр., самки	ХЯК, самки	<i>p</i>	Контр., самцы	ХЯК, самцы	<i>p</i>
Лейкоциты, млн/мл	1.00 (0.60, 1.10)	0.80 (0.60, 1.10)	0,58	1.10 (0.40, 1.10)	1.10 (0.40, 1.30)	0,44
Лимфоциты, млн/мл	0.40 (0.25, 0.50)	0.25 (0.21, 0.30)	0,09	0.60 (0.50, 0.67)	0.50 (0.16, 0.50)	0,19
Т-хелперы (CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ), %	12.60 (10.10, 13.90)	13.90 (9.10, 23.60)	0,32	2.90 (1.60, 3.50)	7.40 (4.60, 12.20)	0,003
В-лимфоциты (CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> ), %	9.10 (7.90, 9.38)	34.80 (18.20, 51.90)	0,0005	1.40 (0.40, 1.80)	14.60 (7.70, 30.50)	0,001
Регуляторные Т-лимфоциты (Foxp3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ), % от Т-хелперов	57.40 (32.90, 63.00)	19.30 (15.70, 26.40)	0,004	15.40 (14.50, 16.40)	29.55 (9.60, 61.00)	0,44

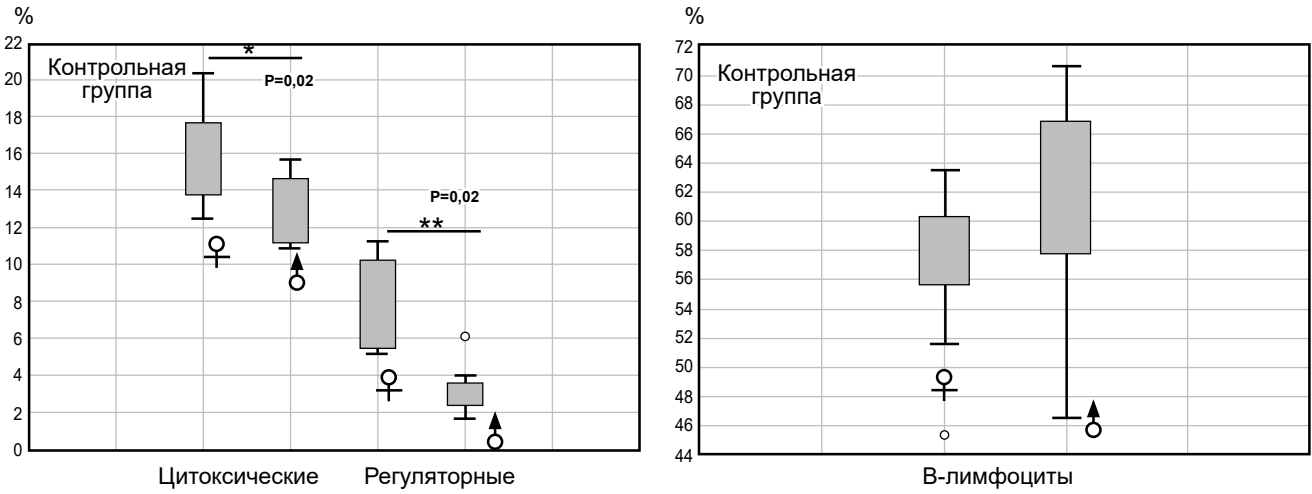
тором воспалительный процесс более выражен у самцов, при хроническом язвенном колите тяжесть воспалительного процесса оказалась выше у самок. По данным проведенной нами оценки выраженности в ободочной кишке язвенно-воспалительного процесса у мышей C57Bl/6 с ДСН-индуцированным хроническим язвенным колитом распространённость очагов гиперемии и язв в слизистой оболочке у самок в 2,5 раза выше, чем у самцов. В литературе отсутствуют данные о взаимосвязи половых различий и тяжести воспалительного процесса с изменениями субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, брыжеечных лимфатических узлов и стенки ободочной кишки.

Сведения, посвящённые половым различиям субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови у лабораторных животных в норме, противоречивы. По нашим данным, в периферической крови у самцов мышей C57Bl/6 в отличие от самок в контрольной группе показатели FoxP3<sup>+</sup> регуляторных и CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов

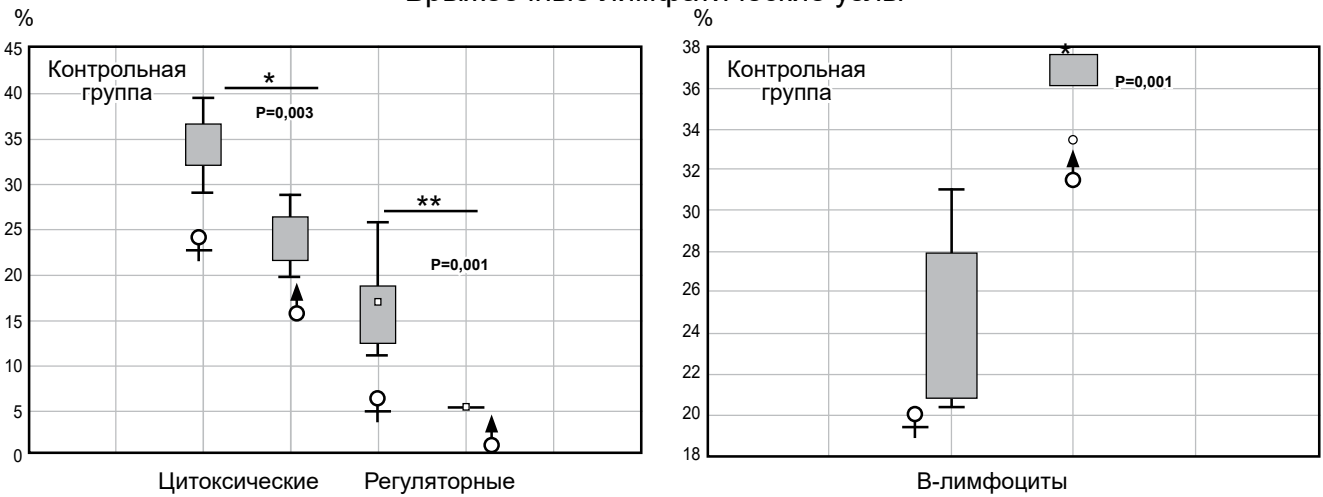
ниже. В брыжеечных лимфатических узлах самок в отличие от самцов выше показатели CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов и ниже CD3<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитов, что является для самок нормой. В ободочной кишке у самок выше содержание В-лимфоцитов.

Содержание субпопуляций лимфоцитов в периферической крови является интегративным показателем, отражающим на организменном уровне процессы пролиферации, дифференцировки и миграции иммунокомпетентных клеток. Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах и стенке ободочной кишки характеризуют состояние локального компартмента иммунной системы. Одной из основных субпопуляций лимфоцитов, модулирующих иммунологические реакции, являются регуляторные Т-лимфоциты. Они представлены двумя популяциями: натуральными, имеющими тимическое происхождение, и индуцированными, которые дифференцируются в периферических органах и компартментах иммунной системы [16].

### Периферическая кровь



### Брыжеечные лимфатические узлы



### Ободочная кишка



□ Median ■ 25–75% I Non-Outlier Range ○ Outliers \* Extremes

регуляторных Т-лимфоцитов и CD3-CD19+ В-лимфоцитов в периферической крови, брыжеечных лимфатических узлах и ободочной кишке у самок и самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы

Содержание FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регуляторных Т-лимфоцитов у самок считается нормой по сравнению с самцами, у которых эти показатели выше как в крови и брыжеечных лимфатических узлах, так и в ободочной кишке. Эти половые различия, видимо, во-многом определяют особенности течения экспериментального хронического язвенного колита. Известно, что в механизмах развития язвенного колита наряду с изменениями слизистого барьера и состава микрофлоры играют роль нарушения реакций иммунного ответа и, в первую очередь, дисбаланс супрессорно-цитотоксических и Т-регуляторных лимфоцитов [17]. Т-регуляторные лимфоциты оказывают супрессорное действие и снижают выраженность воспалительных реакций. Этот механизм опосредуется подавлением популяции супрессорно-цитотоксических Т-лимфоцитов. В ряде исследований показано, что при язвенном колите у человека снижено содержание регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови, но увеличено в стенке ободочной кишки [16, 18 – 21]. Процентное содержание регуляторных Т-лимфоцитов находится в обратной зависимости от активности заболевания: чем выше активность колита, тем ниже содержание регуляторных Т-лимфоцитов [22]. Так, Brandhorst G. и др. [23] оценивали в периферической крови у больных язвенным колитом содержание регуляторных Т-лимфоцитов и показали, что содержание этой субпопуляции низкое и что показатели у мужчин и женщин не различаются. Однако следует отметить, что все пациенты получали иммуносупрессорные препараты – азатиоприн и системные глюкокортикоиды, которые влияют на дифференцировку регуляторных Т-лимфоцитов. Реакция лимфатических узлов при хроническом язвенном колите у самок более выражена, чем у самцов, и характеризуется повышением содержания Т-хелперов лимфоцитов, супрессорно-цитотоксических и регуляторных Т-лимфоцитов, но в отличие от самцов у самок выше содержание В-лимфоцитов.

При хроническом колите в ободочной кишке самок в 3,8 раза повышается содержание В-лимфоцитов, а регуляторных Т-лимфоцитов в 2,9 раза снижается. Тогда как у самцов при хроническом язвенном колите повышаются в 2,6 раза показатели содержания лимфоцитов Т-хелперов и В-лимфоцитов. Показатели содержания в ободочной кишке В-лимфоцитов и регуляторных Т-лимфоцитов у них самцов характеризуются высокой вариабельностью, и статистических значимых различий их содержания не выявлено.

Морфологические проявления хронического язвенного колита у самок более выражены, чем у самцов, а содержание ключевой иммуносупрессорной субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови и брыжеечных лимфатических узлах у них не изменяется, а в ободочной кишке снижается.

Сравнительный анализ относительного количества регуляторных Т-лимфоцитов позволяет предположить, что процессы дифференцировки и миграции этих субпопуляций клеток при хроническом язвенном колите интенсифицируются. В ободочной кишке у самок при хроническом язвенном колите снижено содержание регуляторных Т-лимфоцитов, что обуславливает более выраженную локальную иммунную воспалительную реакцию и косвенно свидетельствует о недостаточной дифференцировке индуцированных регуляторных Т-лимфоцитов.

## Выводы

- По сравнению с самцами у самок мышей C57BL/6 хронический язвенный колит характеризуется более выраженным язвенным и воспалительным процессами. Меньшая выраженность воспалительного процесса у самцов сочетается со снижением в ободочной кишке числа лимфоидных узлов.

- В контрольной группе у самцов и самок мышей C57BL/6 баланс субпопуляций лимфоцитов во всех иссле-

дованных компартаментах иммунной системы различается. В периферической крови и брыжеечных лимфатических узлах по сравнению с самцами у самок выше относительное содержание CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> цитотоксических и FoxP3<sup>+</sup> регуляторных Т-лимфоцитов и в периферической крови – CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-хелперов. В отличие от самцов у самок содержание В-лимфоцитов ниже в брыжеечных лимфатических узлах, но выше в ободочной кишке.

- При хроническом язвенном колите статистических значимых различий показателей содержания CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови, брыжеечных лимфатических узлах и ободочной кишке не выявлено, но у самцов снижено относительное количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-хелперов. Содержание FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регуляторных Т-лимфоцитов в ободочной кишке у самок снижается, а у самцов повышается в периферической крови в 3,6 и брыжеечных лимфатических узлах в 2,8 раза, а в ободочной кишке не изменяется. В ободочной кишке у самцов относительное количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-хелперов снижается.

- Относительный показатель субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитов при хроническом язвенном колите у животных обоего пола в периферической крови снижается, а в ободочной кишке повышается. В брыжеечных лимфатических узлах у самок показатель содержания этой субпопуляции не изменяется, а у самцов повышается.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-14, 16—23 см. в REFERENCES)

15. Гао Ю., Постовалова Е.А., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Половые различия морфологических изменений и иммунологических нарушений при экспериментальном остром язвенном колите. *Клиническая и экспериментальная морфология*. М. 2016; 1(17): 37–42.

## REFERENCES

1. Giefing-Kröll C., Berger P., Lepperdinger G., Grubeck-Loebenstern B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*. 2015; 14(3): 309–21.
2. Angele M.K., Frantz M.C., Chaudy I.H. Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches. *Clinics*. 2006; 61(5): 479–88.
3. Bouman A., Heineman M.J., Faas M.M. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update*. 2005; 11(4): 411–23.
4. Klein S.L. Immune Cells Have Sex and So Should Journal Articles. *Nat. Rev. Immunol.* 2012; 15(6): 2544–50.
5. Olsen N.J., Kovacs W.J. Gonadal steroids and immunity. *Endocrine Reviews*. 1996; 17(4): 369.
6. Roberts C.W. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Rev. Clin. Microbiol.* 2010; 14: 476–88.
7. Fish E.N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8(9): 737–44.
8. Knöferl M.W., Angele M.K., Schwacha M.G., Bland K.L., Chaudry I.H. Preservation of splenic immune functions by female sex hormones after trauma-hemorrhage. *Crit. Care Med.* 2002; 30: 888–93.
9. Latham K.A., Zamora A., Drought H., Subramanian S., Matejuk A. et al. Estradiol treatment redirects the isotype of the autoantibody response and prevents the development of autoimmune arthritis. *Hum. Reprod. Update*. 2003; 171: 5820–7.
10. Mullen A.C., High F.A., Hutchins A.S., Lee H.W., Villarino A.V., Livingston D.M. et al. Role of T-bet in commitment of Th1 cells before IL-2-dependent selection. *Science*. 2001; 292: 1907–10.
11. Kim I.K., Park K.J., Kang G.H., Im J.P., Kim S.G. et al. Risk factors for complications after total colectomy in ulcerative colitis. *Turk. J. Gastroenterol.* 2012; 23(5): 515–22.
12. Glickman R.M. Inflammatory bowel disease: ulcerative colitis and Crohn's disease. Harrison's principles of internal medicine. 1991; 1268–81.

13. Murphy G., Devesa S.S., Cross A.J., Inskip P.D., McGlynn K.A. et al. Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *Int. J. Cancer*. 2010; 128: 1668–75.
14. Loftus C.G., Loftus E.V. Jr, Harmsen W.S., Zinsmeister A.R., Tremaine W.J. et al. Updated Incidence and Prevalence of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in Olmsted County, Minnesota (1970–2011). *Inflamm. Bowel Dis.* 2007; 13(3): 254–61.
15. Gao Y., Postovalova E.A., Dobrynina M.T., Makarova O.V. Sex-related differences in morphological changes and immune disorders during experimental acute ulcerative colitis. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya*. 2016; 1(17): 37–42. (in Russian)
16. Maul J., Loddenkemper C., Mundt P., Berg E., Giese T. et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868–78.
17. Vignali D.A.A., Collison L.W., Workman C.J. How regulatory T cells work. *Nat.Rev. Immunol.* 2008; 7(8): 523–32.
18. Wang Y., Liu X.P., Zhao Z.B., Chen J.H., Yu C.G. Expression of CD4+ forkhead box P3 (FOXP3)+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *J. Dig. Dis.* 2011; 12: 286–94.
19. Makita S., Kanai T., Oshima S., Uraushihara K., Totsuka T. et al. CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J. Immunol.* 2004; 173: 3119–30.
20. Holmén N., Lundgren A., Lundin S., Bergin A.M., Rudin A. et al. Functional CD4+CD25high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflamm. Bowel Dis.* 2006; 12: 447–56.
21. Dige A., Hvas C.L., Deleuran B., Kelsen J., Bendix-Struve M. et al. Adalimumab treatment in Crohn's disease does not induce early changes in regulatory T cells. *Scand. J. Gastroenterol.* 2011; 46: 1206–14.
22. Saruta M., Yu Q.T., Fleshner P.R., Mantel P.Y., Schmidt-Weber C.B. et al. Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin. Immunol.* 2007; 125: 281–90.
23. Brandhorst G., Petrova D.T., Weigand S., Eberle C., Nicolas von Ahsen et al. Lack of correlation between Treg quantification assays in inflammatory bowel disease patients. *World J. Gastroenterol.* 2015; 21(11): 3325–9.

Поступила 15.06.17  
Принята в печать 16.08.17

## КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616-002-092:612.015.1.017.1

Кулебякина М.А.<sup>1</sup>, Дыйканов Д.Т.<sup>1</sup>, Рубцов Ю.П.<sup>1</sup>, Семина Е.В.<sup>1,2</sup>, Ткачук В.А.<sup>1,2</sup>

### КОМПОНЕНТЫ УРОКИНАЗНОЙ СИСТЕМЫ ОКАЗЫВАЮТ РЕЦИПРОКНОЕ ВЛИЯНИЕ НА НАКОПЛЕНИЕ АНТИВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ В СЕЛЕЗЕНКЕ

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ МГУ им. М.В. Ломоносова, 119192, г. Москва, Россия;

<sup>2</sup> Лаборатория молекулярной эндокринологии ФГБУ «НМИЦК» Минздрава РФ, 121552, г. Москва, Россия

При ряде аутоиммунных заболеваний выявляется взаимосвязь с нарушением функции регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), выполняющих в организме функцию иммуносупрессии. Существуют свидетельства того, что в функционировании регуляторных Т-лимфоцитов участвует урокиназа (uPA), сериновая протеаза крови и межклеточного матрикса, стимулирующая процессы фибринолиза, а также способная запускать внутриклеточную сигнализацию, регулируемую миграцию, пролиферацию и выживаемость клеток. Несмотря на имеющиеся данные, на сегодняшний день до конца не установлено, является ли влияние uPA на функционирование Treg физиологически значимым в регуляции иммунного ответа. Кроме того, также остается неизвестным, участвует ли в uPA-зависимой регуляции функционирования этой субпопуляции лимфоцитов специфический мембранный рецептор uPA, uPAR (CD87), представляющий собой гликозилфосфатидилинозитол- (GPI-) заякоренный белок. Мы провели оценку влияния урокиназы и её рецептора на содержание различных субпопуляций лимфоцитов в селезенке мышей. Для этого мы использовали мышей, нокаутных по урокиназе, а также мышей, нокаутных по урокиназному рецептору. Обнаружено, что выключение урокиназной системы приводит к двукратному снижению в селезенке количества Т-регуляторных лимфоцитов, подавляющих активацию иммунной системы. Более того, в селезенке нокаутных мышей обеих линий увеличивается содержание цитотоксических (CD8+) Т-лимфоцитов и активированных (CD25+) лимфоцитов, что может являться свидетельством избыточной лимфопрлиферации. Тот факт, что наблюдаемые изменения происходят как у животных, лишенных uPA, так и у лишённых uPAR, позволяет нам предположить, что все эти эффекты опосредованы зависимым от uPAR механизмом действия uPA, а не её протеолитической активностью.

**Ключевые слова:** урокиназа; рецептор урокиназы; Т-лимфоциты; цитотоксические Т-лимфоциты; регуляторные Т-лимфоциты.

**Для цитирования:** Кулебякина М.А., Дыйканов Д.Т., Рубцов Ю.П., Семина Е.В., Ткачук В.А. Компоненты урокиназной системы оказывают реципрокное влияние на накопление противовоспалительных регуляторных и провоспалительных цитотоксических Т-лимфоцитов в селезенке. *Иммунология*. 2018; 39(1): 38-43. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-38-43>

**Для корреспонденции:** Семина Екатерина В., канд. биол. аукн, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории генных и клеточных технологий кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии», E-mail: e-semina@yandex.ru

Список сокращений: Treg – регуляторные Т-лимфоциты, uPA – активатор плазминогена урокиназного типа (урокиназа), CD87 или uPAR – рецептор урокиназы, WT – животные дикого типа, uPA-/- – мыши, нокаутные по гену урокиназы, uPAR-/- – мыши, нокаутные по гену урокиназного рецептора.

Kulebiakina M.A.<sup>1</sup>, Dyikanov D.T.<sup>1</sup>, Rubtsov Yu.P.<sup>1</sup>, Semina E.V.,<sup>2</sup> Tkachuk V.A.<sup>1,2</sup>

## UROKINASE SYSTEM COMPONENTS HAVE RECIPROCAL EFFECTS ON REGULATORY AND CYTOTOXIC T-CELLS ACCUMULATION IN SPLEEN

<sup>1</sup>Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119192, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Endocrinology, National medical research center of cardiology of the Ministry of healthcare of the Russian Federation 121552, Moscow, Russia

Plenty of autoimmune diseases correlates with dysfunction of regulatory T-cells (Treg) responsible for immunosuppression. There is evidence that a specific protease found in blood and extracellular matrix - urokinase (uPA) - plays an important role in Treg function. It is known that urokinase stimulates fibrinolysis and triggers intracellular signaling, affecting cell migration, proliferation and survival. Despite the available data, the physiological effect of uPA/uPAR on Treg function still has not been discovered. Besides, it is still unknown whether uPA-dependent regulation of Treg functioning requires presence of its specific membrane receptor uPAR (CD87), a membrane glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein. We evaluated the effect of uPA and uPAR on content of different lymphocyte subpopulations in mouse spleen. We used mice carrying uPA knockout and mice carrying uPAR knockout. We discovered that downregulation of urokinase system leads to two-fold decrease in immunosuppressive Treg content in spleen. Moreover, both mice lines demonstrated an increased quantity of cytotoxic (CD-8+) T-cells and activated (CD25+) lymphocytes in spleen. It can be an evidence of excess lymphoproliferation. The fact that these changes observed in both mice lacking uPA and mice lacking uPAR suggest these effects to be mediated by uPAR-dependent mechanism, but not by proteolytic action of uPA.

**Key words:** *Urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor, T-lymphocytes, CD8-positive T-lymphocytes, regulatory T-lymphocytes.*

**For citation:** Kulebiakina M.A., Dyikanov D.T., Rubtsov Yu.P., Semina E.V., Tkachuk V.A. Urokinase system components have reciprocal effects on regulatory and CYTOTOXIC T-cells accumulation in spleen. *Immunologiya*. 2018; 39(1): 38-43. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-38-43>

**For correspondence:** *Semina Ekaterina V.*, senior researcher at Laboratory of gene and cell technologies, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Lomonosov Moscow State University; leading researcher at Laboratory of Molecular Endocrinology, National medical research center of cardiology of the Ministry of healthcare of the Russian Federation, E-mail: [e-semina@yandex.ru](mailto:e-semina@yandex.ru)

Information about authors:

Mariia A. Kulebiakina, <http://orcid.org/0000-0003-1300-9250>

Daniyar T. Dyikanov, <http://orcid.org/0000-0003-3159-6620>

Yury P. Rubtsov, <http://orcid.org/0000-0001-9175-3013>

Ekaterina V. Semina, <http://orcid.org/0000-0002-3927-9286>

Vsevolod A. Tkachuk, <http://orcid.org/0000-0002-7492-747X>

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

**Acknowledgments. The study had no sponsorship.**

Received 15.10.17

Accepted 16.12.15

## Введение

Патогенез ряда аутоиммунных заболеваний связан с нарушением функционирования регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) – субпопуляции Т-лимфоцитов, способных подавлять активацию и пролиферацию лимфоцитов других субпопуляций (эффекторных) [1]. Регуляторные Т-лимфоциты относятся к CD4+ лимфоцитам и развиваются при обязательном участии транскрипционного фактора FOXP3, специфичного для Treg [2]. При реакции организма на инфекцию, опухоль, а также при аутоиммунных процессах Treg играют важную роль в сдерживании иммунного ответа [3]. Эффекторные Т-лимфоциты представлены двумя основными субпопуляциями – CD4+ (так называемые Т-хелперы, отвечающие за активацию гуморального и клеточного иммунного ответа), и CD8+ (так называемые Т-киллеры, или цитотоксические Т-лимфоциты), которые осуществляют клеточный цитотоксический иммунный ответ. Обе эти субпопуляции Т-лимфоцитов подвергаются иммуносупрессии в результате функциональной активности Treg [1, 3, 4]. В последнее время появляются данные о том, что особую роль в функционировании регуляторных Т-лимфоцитов играет активатор плазминогена урокиназного типа, или урокиназа.

Урокиназа (uPA) представляет собой сериновую протеазу, экспрессируемую клетками в межклеточное пространство и обнаруживаемую в крови. В норме синтезируемая клетками урокиназа неактивна и присутствует в крови в наномолярных концентрациях, однако при её активации

запускается каскад протеолитических реакций [5]. В результате этого процесса активируется плазминоген, переходя при этом в активное состояние плазмин, который в свою очередь запускает каскад внеклеточного протеолиза, активируя далее матриксные металлопротеиназы и проангиогенные и нейротрофные факторы роста, задепонированные в матриксе [5, 6]. Помимо активации внеклеточного протеолиза, uPA также запускает внутриклеточную сигнализацию, регулирующую миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток. Активация uPA-зависимых внутриклеточных сигнальных путей осуществляется с участием её специфичного рецептора uPAR, который представляет собой GPI-заякоренный белок [6, 7]. Высокая латеральная подвижность uPAR делает возможным его взаимодействие с мембранными адаптерными белками, обеспечивая векторность процессов протеолиза за счёт мобилизации сигнального комплекса uPA/uPAR на активированном полюсе клетки [8].

В отношении иммунной системы показано, что как uPA, так и uPAR опосредуют процессы миграции и пролиферации лимфоцитов [9-13]. В некоторых работах были исследования эффектов uPA, специфичных в отношении регуляторных Т-лимфоцитов [14, 15]. Так, в работе He F. и соавт. [15] показано, что при активации Treg экспрессия uPAR в них возрастала в сотни раз, а при экспериментальном подавлении uPA экспрессия специфичного для Treg транскрипционного фактора FOXP3 существенно снижалась. Известно, что нокаут

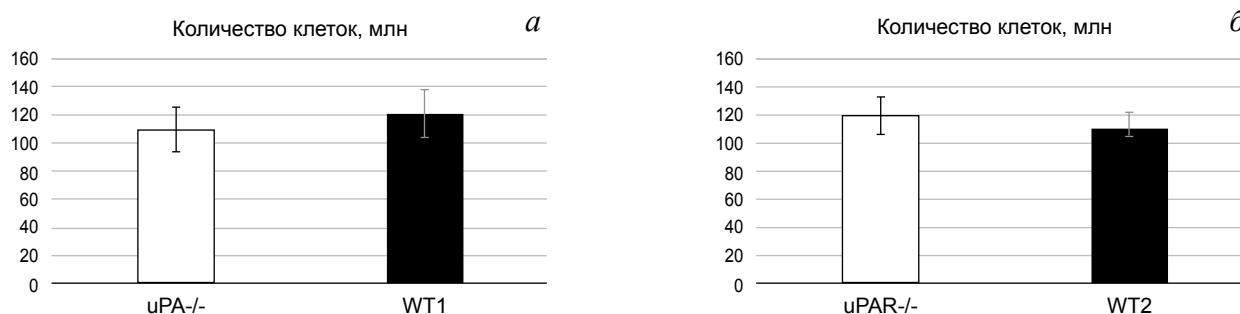


Рис. 1, а, б – отсутствие uPA и uPAR не влияет на общее число спленоцитов.

Общее количество спленоцитов у мышей, нокаутных по гену урокиназы (uPA<sup>-/-</sup>, слева), по гену рецептора урокиназы (uPAR<sup>-/-</sup>, справа), и в селезенках мышей соответствующего им дикого типа (WT1 или WT2). \* –  $p < 0.01$  ( $n=3$ )

генов, необходимых для нормального развития и функционирования Treg, например, гена транскрипционного фактора FOXP3, приводит к развитию тяжелого генерализованного аутоиммунного заболевания, характеризуемого избыточной лимфопролиферацией и мультиорганным воспалением [16].

Несмотря на имеющиеся данные, на сегодняшний день до конца не установлено является ли влияние uPA/uPAR на функционирование Treg физиологически значимым в регуляции иммунного ответа. Кроме того, также неизвестен молекулярный механизм участия uPA и uPAR в развитии и функционировании Treg, в частности, участвует ли uPAR в uPA-зависимой регуляции функционирования этой субпопуляции лимфоцитов. В данной работе, используя трансгенных мышей, лишенных генов uPA и uPAR, мы оценили влияние uPA и uPAR на количество различных субпопуляций T-лимфоцитов в селезенке, в том числе на субпопуляцию Treg.

## Материал и методы

### Лабораторные животные

В работе использованы мыши, нокаутные по гену урокиназы (uPA<sup>-/-</sup>), полученные на основе мышей инбредной линии C57BL6 [17], контрольные к ним мыши дикого типа WT1 (инбредная линия C57BL6); мыши, нокаутные по гену урокиназного рецептора (uPAR<sup>-/-</sup>), полученные на основе мышей C57BL6xSV129 [18], а также контрольные к ним мыши дикого типа WT2 (инбредная линия C57BL6xSV129). При проведении экспериментов соблюдали «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», приказ Министерства среднего и высшего специального образования СССР №742 от 13.11.1984 и нормы, утвержденные Комиссией по биоэтике факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова. В работе использовали самцов в возрасте 8–10 нед, число мышей в каждой экспериментальной группе равнялось трём. Было поставлено по 3 независимых эксперимента. Все манипуляции проводили в стерильных условиях. Мышей наркотизировали изофлураном (IsoFlo® USP), умерщвляли методом цервикальной дислокации и далее извлекали селезенку.

### Методика получения суспензии спленоцитов мыши

Суспензию клеток селезенки получали путём механического измельчения в среде RPMI (HyClone), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone), 2mM L-глутамин (HyClone) и 50  $\mu$ M  $\beta$ -меркаптоэтанол, используя сито с размером ячейки 40 мкм. Лизис эритроцитов проводили с помощью буфера, содержащего 150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA. Клетки считали в камере Горяева, предварительно окрасив трипановым синим для выявления мёртвых клеток.

## Имунофлуоресцентное окрашивание и проточная цитометрия спленоцитов мыши

Перед окрашиванием на внутриклеточные антигены (FOXP3) спленоциты фиксировали с применением набора BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) по протоколу, предложенному производителем: клетки инкубировали в буфере для фиксации/пермеабиллизации в течение 20 мин при температуре 4°C, затем подвергали отмывке в буфере (BD Perm/Wash™) в течение 15 мин. Окрашивание на мембранные маркеры T-лимфоцитов CD4, CD8, CD25 проводили без предварительной фиксации спленоцитов. Иммунофлуоресцентное окрашивание выполняли с использованием флуоресцентно меченых антител, специфичных к CD8a (BD-PharMingen), к FOXP3 (Sony), к CD4 (Sony), к CD25 (Sony). Анализ окрашивания делали методом проточной цитометрии (FACSCanto II, BD Biosciences). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием программы FlowJo.

### Статистическая обработка результатов

Статистический анализ данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. Для оценки достоверности различий между экспериментальными группами нами использован двухвыборочный *t*-тест Стьюдента. На гистограммах представлены значения среднего и среднеквадратичное отклонение. Различия между данными считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### 1. Нокаут по генам uPA и uPAR не влияет на общее количество лимфоцитов в селезенке мышей.

Одной из основных функций Treg в организме является сдерживание избыточной пролиферации эффекторных T-лимфоцитов (T-хелперов и T-киллеров). Изменение количества спленоцитов может свидетельствовать об избыточной или недостаточной лимфопролиферации. В связи с этим на первом этапе наших исследований мы проанализировали общее содержание спленоцитов у мышей линий uPA<sup>-/-</sup>, uPAR<sup>-/-</sup>, а также у диких мышей соответствующих линий (WT1 и WT2). Согласно полученным результатам, нокаутные по гену uPA и uPAR мыши (uPA<sup>-/-</sup> и uPAR<sup>-/-</sup> на рис. 1) не демонстрировали существенных отличий в общем количестве спленоцитов по сравнению с мышами дикого типа WT1 и WT2 соответственно. Таким образом, отсутствие экспрессии белков uPA и uPAR не влияет на общую численность лимфоцитов в селезенке.

### 2. uPA и uPAR участвуют в поддержании численности регуляторных T-лимфоцитов.

Есть данные, свидетельствующие в пользу участия uPA и uPAR в регуляции функции иммунной системы через контроль созревания и активации T-регуляторных лимфоцитов



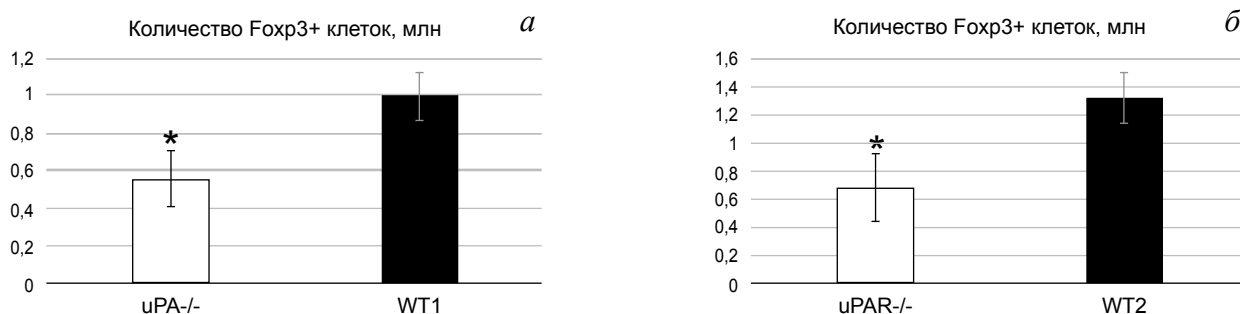


Рис. 2. Отсутствие uPA и uPAR приводит к снижению числа Treg (FOXP3+) в селезенке.

*a* - количество FOXP3+ клеток в селезенках мышей, нокаутных по гену урокиназы (uPA<sup>-/-</sup>) и мышей дикого типа (WT1), *б* – количество FOXP3+ клеток в селезенках мышей, нокаутных по гену рецептора урокиназы (uPAR<sup>-/-</sup>) и мышей дикого типа (WT2). \* –  $p < 0,05$  ( $n=3$ ).

(Treg). Характеристическим маркером Treg является транскрипционный фактор FOXP3, который необходим для развития и поддержания фенотипа данной субпопуляции лимфоцитов [2]. Мы сравнили содержание FOXP3+ клеток у мышей линий uPA<sup>-/-</sup> и WT1 и uPAR<sup>-/-</sup> и WT2 (рис. 2). Нами обнаружено, что у мышей линии uPA<sup>-/-</sup> число FOXP3+ клеток в селезенке заметно снижено по сравнению с мышами дикого типа (0,56 ± 0,15 млн у uPA<sup>-/-</sup> и 1,0 ± 0,129 млн у WT1 соответственно) (рис. 2, *a*). Аналогичные результаты получены для мышей, нокаутных по гену uPAR (0,684 ± 0,24 млн у uPAR<sup>-/-</sup> и 1,32 ± 0,18 млн у WT2 соответственно) (рис. 2, *б*). Таким образом, отсутствие экспрессии uPA и uPAR приводит к двукратному уменьшению количества Treg в селезенке.

### 3. Нокаут по генам uPA и uPAR приводит к увеличению числа цитотоксических T-лимфоцитов (Т-киллеров) в селезенке.

Для оценки функциональной активности регуляторных T-лимфоцитов важны данные не только об общем количестве лимфоцитов, но и об изменении уровня конкретных субпопуляций T-лимфоцитов: хелперных и цитотоксических. Известно, что снижение функции Treg может приводить к избыточной пролиферации эффекторных T-лимфоцитов. В связи с этим мы проанализировали содержание основных субпопуляций эффекторных T-лимфоцитов: CD4+ (T-хелперов) и CD8+ (T-киллеров) в селезенках экспериментальных животных.

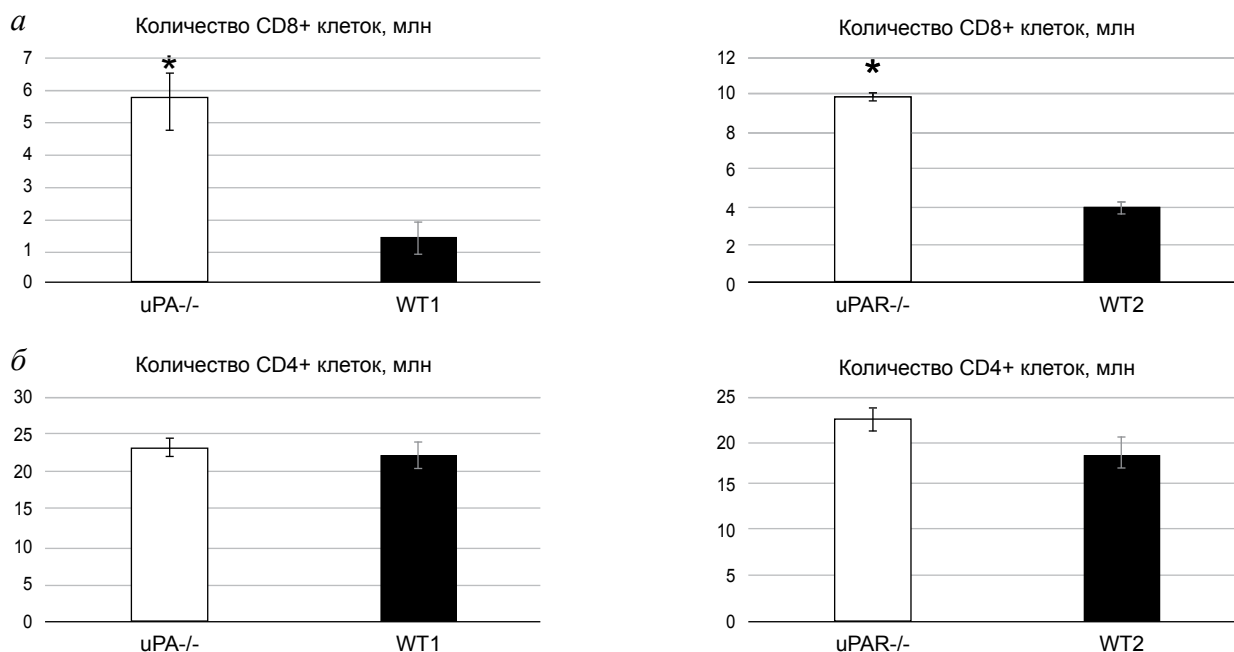


Рис. 3. Отсутствие uPA и uPAR не влияет на число T-хелперов (CD4+), но приводит к значительному увеличению количества цитотоксических T-лимфоцитов (CD8+) в селезенке мышей по сравнению с мышами дикого типа.

*a* – количество CD8+ клеток в селезенках мышей линий uPA<sup>-/-</sup>, uPAR<sup>-/-</sup>, а также в селезенках мышей линий соответствующего им дикого типа (WT1 или WT2), *б* – количество CD4+ клеток в селезенках мышей линий uPA<sup>-/-</sup>, uPAR<sup>-/-</sup>, а также в селезенках мышей линий соответствующего дикого типа (WT1 или WT2). \* –  $p < 0,01$  ( $n=3$ ).

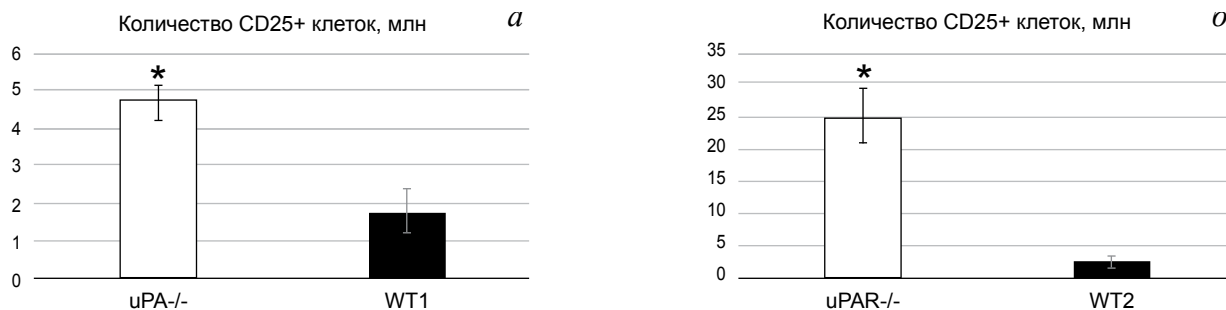


Рис. 4. Отсутствие uPA и uPAR приводит к значительному увеличению числа активированных Т-лимфоцитов (CD25+) в селезенке мышей. *a* – количество CD25+ клеток в селезенках мышей, нокаутных по гену урокиназы (uPA<sup>-/-</sup>) и в селезенках мышей дикого типа (WT1), *б* – количество CD25+ клеток в селезенках мышей, нокаутных по гену рецептора урокиназы (uPAR<sup>-/-</sup>) и в селезенках мышей дикого типа (WT2). \* –  $p < 0,01$  ( $n=3$ ).

Обнаружено, что число CD8+ Т-лимфоцитов в селезенке мышей линии uPA<sup>-/-</sup>, как и линии uPAR<sup>-/-</sup>, значительно повышено по сравнению с мышами дикого типа (5,72±0,89 млн у uPA<sup>-/-</sup> и 1,46±0,44 млн у WT1 соответственно; 9,84±0,2 млн у uPAR<sup>-/-</sup> и 4,07±0,28 млн у WT2 соответственно) (рис. 3, *a*). Количество же CD4+ Т-лимфоцитов у мышей линий uPA<sup>-/-</sup> и uPAR<sup>-/-</sup> достоверно не изменялось по сравнению с мышами WT1 и WT2 соответственно (рис. 3, *б*).

#### 4. Нокаут по генам uPA и uPAR приводит к увеличению в селезенке числа активированных CD25+ Т-лимфоцитов.

Наблюдаемое нами увеличение числа цитотоксических CD8 Т-лимфоцитов в селезенке может быть следствием повышенной их активации. Ключевым маркером активации Т-лимфоцитов является мембранная молекула CD25, представляющая собой альфа-субъединицу рецептора интерлейкина-2. Экспонирование CD25 на мембране способствует пролиферации (клональной экспансии) Т-лимфоцитов [19]. Мы проанализировали содержание активированных Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности CD25 в селезенках мышей линий uPA<sup>-/-</sup>, uPAR<sup>-/-</sup> и соответствующих линий диких мышей (WT1 и WT2; см. рис. 3). Как видно из представленных данных, в селезенке мышей линии uPA<sup>-/-</sup> (4,73±0,04 млн у uPA<sup>-/-</sup> и 1,76±0,55 млн у WT1, рис. 4, *a*) и мышей линии uPAR<sup>-/-</sup> (25,2±3,6 млн у uPAR<sup>-/-</sup> и 2,75±0,88 млн у WT2, рис. 4, *б*) наблюдается значительное повышение CD25-положительных лимфоцитов по сравнению с мышами дикого типа.

#### Обсуждение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что нокаут по гену uPA, как и по гену uPAR, приводит к почти к двукратному снижению количества Treg. Возможно, поддержание нормального числа Treg в селезенке требует достаточного уровня экспрессии как uPA, так и uPAR, поэтому отсутствие экспрессии этих белков может приводить к снижению способности к миграции и/или пролиферации этой субпопуляции лимфоцитов.

Наши результаты показывают, что отсутствие экспрессии белков uPA или uPAR не влияет на общую численность лимфоцитов в селезенке молодых (8–10 нед) мышей. Можно говорить о том, что заметной избыточной лимфопролиферации у исследуемых нокаутных животных не наблюдается. Однако вместе с этим нами впервые получены данные об увеличении содержания Т-киллеров и активированных (CD25+) лимфоцитов в селезенке экспериментальных мышей. Поскольку экспонирование CD25 способствует пролиферации Т-лимфоцитов [19], то увеличение в селезенке числа клеток, несущих этот маркер, может свидетельствовать об избыточной лимфопролиферации. Не исключено, что с возрастом у мышей, нокаутных по uPA или uPAR, признаки аутоиммунных процессов могут стать более выражены.

Кроме того, обнаруженное нами увеличение CD8+

Т-лимфоцитов у животных, несущих нокаут по генам uPA и uPAR, может быть свидетельством влияния урокиназы и её рецептора на созревание и/или пролиферацию/выживаемость Т-киллеров в селезенке. Наблюдаемое нами существенное увеличение числа CD25+ активированных спленоцитов позволяет предположить, что увеличение содержания CD8+ лимфоцитов в селезенке напрямую может быть следствием их пролиферации в результате активации. Следует отметить, что количество CD4+ лимфоцитов в селезенках нокаутных мышей (uPA<sup>-/-</sup> и uPAR<sup>-/-</sup>) существенно не менялось по сравнению с мышами дикого типа (WT1 и WT2). Это может объясняться тем, что у CD4+ и CD8+ лимфоцитов имеются различия в молекулярных механизмах активации. В частности, CD4+ лимфоциты сами экспрессируют IL-2, который стимулирует выход Т-лимфоцитов из покоящегося состояния и их клональную экспансию, в то время как пролиферация активированных CD8+ лимфоцитов в большей степени зависит от присутствия экзогенного IL-2 [19, 20].

Тот факт, что нокаутные по uPA и по uPAR мыши характеризуются значительным (в разы) повышением числа CD25+ спленоцитов, говорит о значимом влиянии урокиназы и её рецептора на процессы активации Т-лимфоцитов, и может быть обусловлено наличием специфического механизма воздействия uPA и uPAR на 1) экспрессию/презентацию CD25 в мембране Т-лимфоцитов, на 2) миграцию активированных Т-лимфоцитов, а также на 3) повышение уровня активации Т-лимфоцитов из-за снижения иммунносупрессии, в частности, за счёт обнаруженного в данном исследовании снижения содержания Treg в тканях uPA<sup>-/-</sup> и uPAR<sup>-/-</sup> мышей.

#### Заключение

Проанализировав численность различных субпопуляций Т-лимфоцитов в селезенках мышей, нокаутных по генам uPA и uPAR, мы впервые получили данные, позволяющие предполагать существование новых механизмов регуляции функций иммунной системы *in vivo*. Установлена важная роль uPA и uPAR в поддержании численности Treg в организме. Генетический нокаут uPA и uPAR приводит к снижению в селезенке количества Treg, которые способны ограничивать возможный аутореактивный иммунный ответ, сдерживая пролиферацию эффекторных Т-лимфоцитов. При нокауте генов uPA и uPAR в разы возрастает число активированных Т-лимфоцитов и происходит значительное увеличение числа цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+) в селезенках мышей; причем эти явления, вероятно, могут быть опосредованы снижением количества регуляторных Т-лимфоцитов. Обнаруженные эффекты делают перспективным дальнейшее изучение влияния урокиназной системы на активацию клеток иммунной системы, в частности, при аутоиммунных заболеваниях.

**Финансирование:** Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект №14-24-00086)

и оборудования, приобретённого за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

- Goodnow C.C., Sprent J., Fazekas de St Groth B., and Vinuesa C.G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*. 2005; 435: 590–7.
- Fontenot J.D., Rudensky A.Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol.* 2005; 6: 331–7.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 2005; 6(4): 345–52.
- Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133: 775–87.
- Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost.* 1999; 82(2): 259–70.
- Tkachuk V., Stepanova V., Little P.J., Bobik A. Regulation and role of urokinase plasminogen activator in vascular remodelling. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1996; 23(9): 759–65.
- Ploug M., Rønne E., Behrendt N., Jensen A.L., Blasi F., Danø K. Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* 1991; 266(3): 1926–33.
- Blasi F., Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3(12): 932–43.
- Gyetko M.R., Chen G.H., McDonald R.A., Goodman R., Huffnagle G.B., Wilkinson C.C., et al. Urokinase is required for the pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*. A murine transgenic model. *J. Clin. Invest.* 1996; 97(8): 1818–26.
- Gyetko M.R., Libre E.A., Fuller J.A., Chen G.H., Toews G. Urokinase is required for T lymphocyte proliferation and activation in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 1999; 133(3): 274–88.
- Gyetko M.R., Sud S., Sonstein J., Polak T., Sud A., Curtis J.L. Antigen-driven lymphocyte recruitment to the lung is diminished in the absence of urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor, but is independent of uPA. *J. Immunol.* 2001; 167(10): 5539–42.
- Gyetko M.R., Sud S., Chensue S.W. Urokinase-deficient mice fail to generate a type 2 immune response following schistosomal antigen challenge. *Infect. Immun.* 2004; 72(1): 461–7.
- Gur-Wahnon D., Mizrahi T., Maaravi-Pinto F.Y., Lourbopoulos A., Grigoriadis N., Higazi A.A. et al. The plasminogen activator system: involvement in central nervous system inflammation and a potential site for therapeutic intervention. *J. Neuroinflammation*. 2013; 10: 124.
- Karamanavi E., Angelopoulou K., Lavrentiadou S., Tsingotjidou A., Abas Z., Taitzoglou I. et al. Urokinase-type plasminogen activator deficiency promotes neoplasmatogenesis in the colon of mice. *Transl Oncol.* 2014; 7(2): 174–87.
- He F., Chen H., Probst-Kepper M., Geffers R., Eifes S., Del Sol A. et al. PLAU inferred from a correlation network is critical for suppressor function of regulatory T cells. *Mol. Syst. Biol.* 2012; 8: 624.
- Wildin R.S., Ramsdell F., Peake J., Faravelli F., Casanova J.L., Buist N. et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 2001; 27(1): 18–20.
- Herbert J.M., Lamarche I., Carmeliet P. Urokinase and tissue-type plasminogen activator are required for the mitogenic and chemotactic effects of bovine fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-BB for vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(38): 23585–91.
- Dewerchin M., Nuffelen A.V., Wallays G., Bouché A., Moons L., Carmeliet P. et al. Generation and characterization of urokinase receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 1996; 97(3): 870–8.
- Boyman O., Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2012; 12(3): 180–90.
- Wiesel M., Oxenius A. From crucial to negligible: functional CD8<sup>+</sup> T-cell responses and their dependence on CD4<sup>+</sup> T-cell help. *Eur. J. Immunol.* 2012; 42(5): 1080–8.

Поступила 15.10.17  
Принята в печать 16.12.17

## ИММУНОПАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.12-009.72-06:616.127-005.8]-008.9-036.11-078.33

Саидов М.З., Маммаев С.Н., Абдуллаев А.А., Алиева М.Г.

### ИММУНОМАРКЁРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ МИОКАРДА КАК ПРЕДИКТОРЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИСХОДА ОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМА В СТЕНОКАРДИО НАПРЯЖЕНИЯ III ФУНКЦИОНАЛЬНОГО КЛАССА

ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет», 367000, г. Махачкала, Республика Дагестан

Изучено прогностическое значение иммуномаркёров гипоксического повреждения миокарда, показателей неспецифического субклинического воспаления и эндотелиальной дисфункции при клиническом исходе острого коронарного синдрома (ОКС) в стенокардию напряжения III функционального класса (ФК). Показано, что при клиническом исходе ОКС в стенокардию напряжения III ФК наиболее информативными интервалами концентраций в сыворотке крови (точки разделения) являются: для иммуномаркёров НР от 24 до 43 нмоль/л и в 60% случаев встречаются АТ к миокардиальным клеткам, а также BNP-32 – от 30 до 80 пг/мл; для маркёров воспаления ИЛ-1β от 0 до 0,5 пг/мл и ТНФ-α от 0 до 0,5 пг/мл; для маркёров эндотелиальной дисфункции NO от 20 до 30 мкмоль/л, ГЦ от 17 до 18 мкмоль/л, TIMP-1 от 90 до 150 нг/мл; На основании полученных данных рассчитаны значения относительного риска исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК и сформирована блок-схема персонализированного прогноза клинического исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК на госпитальном этапе. Пациенты, имеющие показатели, попадающие в интервалы концентраций, представленных в прогностической блок-схеме при поступлении в стационар (точка отсчёта), являются группой высокого риска в отношении клинического исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК (конечная точка).

Для корреспонденции: Саидов Марат Зияудинович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патологической физиологии Дагестанского государственного медицинского университета, E-mail: marat2002@pochta.ru.

**Ключевые слова:** острый коронарный синдром; стенокардия напряжения III ФК; иммуномаркёры; воспаление; эндотелиальная дисфункция; клинический исход ОКС; относительный риск; прогностическая блок-схема.

**Для цитирования:** Саидов М.З., Маммаев С.Н., Абдуллаев А.А., Алиева М.Г. Иммуномаркёры повреждения миокарда как предикторы клинического исхода острого коронарного синдрома в стенокардию напряжения III функционального класса. *Иммунология*. 2018; 39(1): 43-49. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-43-49>

*Saidov M.Z., Mammaev S.N., Abdulaev A.A., Alieva M.G.*

#### IMMUNOMARKERS OF MYOCARDIAL INJURY AS A PREDICTOR OF CLINICAL ISSUE ACUTE CORONARY SYNDROME TO STABLE ANGINA OF III FUNCTIONAL CLASS

Dagestan State Medical University, 367000, Makhachkala

Prognostic value of immunomarkers of hypoxic myocardial damage, indicators of non-specific subclinical inflammation and endothelial dysfunction in clinical outcome of acute coronary syndrome (ACS) in functional class III stress angina (FC) was studied. It is shown that the clinical outcome of ACS in angina FC III the most informative intervals of the concentrations in the blood serum (the split point) are: for immunomarkers NP from 24 to 43 nmol/l and in 60% of cases occur at the myocardial cells, and BNP-32 – 30 to 80 PG/ml; for inflammatory markers IL-1 $\beta$  from 0 to 0.5 PG / ml and TNF- $\alpha$  from 0 to 0.5 PG / ml; for markers of endothelial dysfunction NO from 20 to 30  $\mu$ mol/ l, HZ from 17 to 18  $\mu$ mol/ l, TIMP -1 from 90 to 150 ng / ml; based on the data obtained, the values of the relative risk of the outcome of OXUS in angina FC were calculated and a block diagram of the personalized outcome of clinical stress in stenocardia was formed III FC on hospital stage. Patients having indicators falling in the interval of concentrations, is presented to a predictive block diagram for admission to hospital (reference) are a group at high risk of clinical outcome of ACS in angina FC III (the end point).

**Key words:** acute coronary syndrome; angina pectoris of III FC; immunomarkers; inflammation; endothelial dysfunction; clinical outcome of ACS; relative risk; prognostic flowchart.

**For citation:** Saidov M.Z., Mammaev S.N., Abdulaev A.A., Alieva M.G. Immunomarkers of myocardial injury as a predictor of clinical issue acute coronary syndrome to stable angina of III functional class. *Immunologiya*. 2018; 39(1): 43-49. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-41-49>

**For correspondence:** Saidov Marat Ziavdinovich, Dr. Med. Sci., Professor, head. Department of pathological physiology of Dagestan state medical University, E-mail: [marat2002@pochta.ru](mailto:marat2002@pochta.ru)

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

Received 09.11.17

Accepted 16.12.17

Современные представления о патогенезе острого коронарного синдрома (ОКС) не оставляют сомнений в актуальности персонализированного прогноза клинических исходов ОКС на госпитальном этапе. Степень окклюзии коронарных артерий обуславливает формирование либо некрозов соответствующего бассейна васкуляризации миокарда, представленных в виде Q- или не-Q-инфаркта миокарда, либо достижение такой компенсации коронарного кровотока, которая позволяет избежать некроза кардиомиоцитов. В последнем случае происходит формирование стабильных или нестабильных форм стенокардии как клинических исходов ОКС на госпитальном этапе. Прогрессирование стабильной стенокардии связано с большей выраженностью патофизиологических механизмов, ответственных за дестабилизацию атеросклеротической бляшки, из которых наиболее важными являются усиление продукции системных провоспалительных цитокинов, появления иммуномаркёров гипоксического повреждения миокарда, эндотелиальной дисфункции (ЭД) и кардиоспецифических изменений в системе иммунитета.

Многочисленные работы по изучению признаков гипоксического повреждения миокарда при ОКС свидетельствуют о том, что наиболее результативной является стратегия «point of care» (РОС-стратегия, или мультимаркёрное тестирование при ОКС), подразумевающая одновременный анализ различных по своему функциональному предназначению параметров, в том числе и иммуномаркёров. Показано, что одновременное серийное определение тропонина Т, миоглобина и фракции МВ креатинфосфокиназы при поступлении пациента в стационар, а также через 1–3 ч после поступления, существенно повышало чувствительность диагностики и прогноза острого инфаркта миокарда [1–3]. Аналогичные данные, касающиеся таких показателей, как тропонины I и T, КФК, Na-уретические пептиды, матриксные металлопротеиназы, СРБ, гомоцистеин, ИЛ-1, ИЛ-10, ИЛ-18, TNF- $\alpha$  и др. представлены в публикациях [4–8]. Эффективность

стратегии «point of care» и оценка динамики показателей кардиомаркёров также отражена в работах ряда авторов [9–13].

«Триггером» кардиоспецифических изменений в системе иммунитета при ОКС являются, прежде всего, активированные клетки продуктивного воспаления *in situ* (лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, кардиофибробласты), инфильтрирующие зону повреждения миокарда, а также соединения и клетки, попадающие в кровь из этой зоны и лежащие в основе резорбционно-некротического синдрома при ИМ [14, 15]. Трансэндотелиальная миграция моноцитов в бляшку, фагоцитоз этими клетками липидов, трансформации их в активированные «пенистые» макрофаги, а также миграция активированных лимфоцитов являются источником гиперпродукции провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-18, ИНФ- $\gamma$ ), матрикс-расщепляющих протеиназ (MMP-1, MMP-3, MMP-9), прокоагулянтных факторов [16–19].

В контексте проблемы ОКС из показателей воспаления и иммуномаркёров повреждения миокарда патогенетически значимыми являются сывороточные уровни СРБ, фибриногена, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-18, экспрессия L-, P- и E-селектинов и др. Определение указанных параметров с учётом фазности патологического процесса при ишемии и некрозе миокарда имеет несомненное диагностическое и прогностическое значение [14].

Из показателей ЭД прогностически значимыми при ОКС являются продукция оксида азота (NO), эндотелинов, в том числе и Big-эндотелина, ангиотензина II, простаглицлина, тромбомодулина (CD141), фактора Виллебранда, гипергомоцистеинемии, активности группы матриксных металлопротеиназ (ММП) и их ингибиторов [1, 9].

Не менее патогенетически и прогностически значимы в клинических исходах ОКС кардиоспецифические изменения в системе иммунитета. Речь идёт, прежде всего, об индукции антиген-специфического иммунного ответа к антигенным

детерминантам ишемизированных и некротизированных кардиомиоцитов. Отмечено, что уровень антител к атерогенным липопротеидам у больных ИБС является одним из показателей выраженности атеросклеротического процесса в коронарных артериях [20]. Уровень антимиокардиальных антител определяется у 25% пациентов с дилатационной кардиомиопатией, а антитела к кардиолипину (АКА) – у 70% пациентов с коронарной недостаточностью [21]. При ОКС аутоантитела к сульфатированным гликозаминогликанам, коллагену и гиалуроновой кислоте были достоверно выше по сравнению с группой контроля [22]. Большое внимание уделяется значениям неоптерина (НП) в сыворотке крови, являющимся маркером активации клеточного иммунитета. Показано, в частности, что уровень неоптерина (более 10 нг/мл) коррелирует с выраженностью атеросклеротического поражения коронарных артерий и с другими маркерами воспаления [23].

Очевидно, что поиск прогностических критериев исходов ОКС на госпитальном этапе, основывающийся на упомянутых выше патогенетических механизмах, является обоснованным и достаточно перспективным. Усилия в этом направлении предпринимались и они продолжаются до настоящего времени. Показано, что при ОКС с повышением сегмента S-T прогностически значимым в отношении развития сердечно-сосудистых осложнений через 1 год оказался уровень ИЛ-12 > 108,7 пг/мл, при оценке по шкале TIMI > 3 балла при поступлении больного в стационар (чувствительность – 76%; специфичность – 89%). Практически аналогичными характеристиками в отношении неблагоприятного прогноза ОКС с повышением сегмента S-T обладал уровень неоптерина (>10,45 нмоль/л) [24]. При ОКС с повышением сегмента S-T исходный уровень ИЛ-6 и СРБ был ниже по сравнению с группой пациентов с ОКС с понижением сегмента S-T, в то время как уровень ИЛ-10 и NT-proBNP претерпевал противоположные изменения [25]. При ИБС с хронической сердечной недостаточностью I–IV функциональных классов (классификация NYHA) определена достоверная корреляция между уровнями СРБ и провоспалительного цитокина – ИЛ-8 как показателей системного воспаления, а также уровня NT-proBNP как показателя декомпенсации кровообращения. Высокие сывороточные уровни указанных факторов рассматриваются авторами как неблагоприятные предикторы смерти [26].

Цель настоящего исследования – оценка возможностей формирования прогностических критериев клинического исхода ОКС в стенокардию напряжения III функционального класса (ФК) на госпитальном этапе, основывающихся на индукции иммуномаркеров гипоксического повреждения миокарда, показателях неспецифического субклинического воспаления и эндотелиальной дисфункции и разработка на этой основе персонализированной прогностической блок-схемы.

## Материал и методы

В работу включены 68 пациентов, поступивших в инфарктное отделение Республиканской больницы № 2 Центра специализированной экстренной медицинской помощи (ЦСЭМП) г. Махачкалы. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. У всех пациентов, включённых в исследование, было получено письменное информированное согласие. Протоколы обследования больных одобрены Этическим комитетом Дагестанского государственного медицинского университета.

Критериями включения в исследование явились пациенты с диагнозом «ОКС» при поступлении в инфарктное отделение ЦСЭМП г. Махачкалы, а также пациенты с верифицированным клиническим исходом ОКС в стенокардию напряжения III ФК, у которых на фоне клинических прояв-

лений ОКС констатировали нарушения реполяризации желудочков на ЭКГ: депрессия сегмента S-T, инвертированные или ревертированные зубцы T по сравнению с предшествующими показателями ЭКГ.

Критерии исключения из исследования явились клинические исходы ОКС в другие формы кардиальной патологии, пациенты с сопутствующей патологией других органов и систем, патогенетически не связанных с ОКС, которые могут повлиять на результаты исследования, а также участие пациентов в любом другом исследовании.

Настоящая работа относится к исследованиям типа «случай–контроль», поскольку в ней сравнивается распространённость предполагаемого фактора риска (интервалы концентраций показателей) клинического исхода ОКС в основной и контрольной группах. Соответственно пациенты с верифицированным клиническим исходом ОКС в стенокардию напряжения III ФК составили основную группу, а пациенты при поступлении в инфарктное отделение с диагнозом «ОКС» – контрольную группу (группу сравнения). При сравнительном анализе в работе также использовалась контрольная группа здоровых доноров ( $n=19$ ).

В качестве прогностических факторов выступали наиболее информативные интервалы концентраций показателей иммуномаркеров гипоксического повреждения миокарда, субклинического неспецифического воспаления и эндотелиальной дисфункции. Рассчитывалась величина относительного риска (ОР) с доверительными интервалами (ДИ) исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК в связи с изучаемым фактором риска (интервалы концентраций показателей). Показатель ОР считался достоверным ( $p<0,05$ ), если ДИ не включал единицу.

Для оценки динамики изучаемых показателей использовался принцип «до – после». Больные с верифицированным клиническим исходом ОКС в стенокардию напряжения III ФК составили группу «после». Эти же больные, но при поступлении в инфарктное отделение, составили группу «до». Показатели замерялись у больных на этапах, как «до», так и «после».

Больные получали этиотропную и патогенетическую терапию в соответствии с принятыми стандартами ургентной кардиологии.

Наиболее часто встречающийся интервал концентраций в сыворотке крови исследуемых показателей в конкретной группе больных выводился с использованием сводных таблиц (Microsoft Excel 2007).

Из иммуномаркеров гипоксического повреждения миокарда определяли сывороточные уровни неоптерина (НП) методом конкурентного ИФА на наборах «Neopterin ELISA» компании «IBL International GmbH», Germany, кат. № RE59321.

Сывороточные аутоантитела к кардиолипину (КЛ) определялись с помощью набора непрямого твёрдофазного ИФА «Anti-Cardiolipin IgG/IgM Orgentec» Germany, кат. № 416-5150 (ORG515).

Антитела к кардиомиоцитам определяли на наборах для полуколичественного определения антител к кардиомиоцитам в сыворотке крови методом непрямого иммунофлуоресценции «Anti-Heart Antibody IFA» «IMMCO Diagnostics, Inc.» USA, кат. № 1101H. на 6-луночных слайдах со срезами ткани сердца крыс. Результат анализировался в люминесцентном микроскопе и выражался полуколичественно. В случае яркого свечения препарата результат обозначался в 3 креста, средней интенсивности в 2 креста и слабое свечение обозначалось в 1 крест.

Из показателей неспецифического субклинического воспаления определяли уровень СРБ на наборах «С-реактивный белок, латекс тест», ООО «Ольвекс Диагностикум», а также хемиллюминесцентным методом на анализаторе PATHFAST, USA.

ИЛ-1β определяли твёрдофазным ИФА, «сэндвич» вариант, с применением моно- и поликлональных АТ к ИЛ-1β (ЗАО «Вектор-Бест», набор реагентов А-8766).

ТНФ-α определяли ИФА на наборах «Human TNF-α Platinum ELISA» компании Bioscience, Австрия, кат. № BMS223.

Эндотелиальную дисфункцию тестировали по сывороточному уровню оксида азота (NO) на наборах реагентов «Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite» компании R&D Systems, Inc., кат. № KGE001 и эндотелина-1 (ЭТ-1) на наборах ИФА «Endothelin (1–21) Biomedica Gruppe, Австрия, кат. № BI-20052.

Уровни гомоцистеина (ГЦ) в сыворотке крови определяли твёрдофазным конкурентным ИФА «Homocysteine EIA» компании Axis-Shield Diagnostics Ltd., кат. № 414-8880 и матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) набором ИФА «Quantikine ELISA, Human MMP-9» компании R&D Systems, Inc., кат. № DMP900.

Уровень тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 (TIMP-1) определяли количественным твёрдофазным ИФА «Human TIMP-1 Platinum ELISA» компании Bioscience, Австрия, кат. № BMS2018.

Количественный анализ на тропонин I проводился хемилюминесцентным методом на анализаторе PATHFAST, США.

Уровень мозгового натрийуретического пептида (BNP-32) определяли на наборах ИФА «Peptide Enzyme Immunoassay (EIA), BNP-32», Peninsula Laboratories, LLC, калифорния, США, кат. № S-1194.

Статистическая обработка полученных результатов

Обработку данных проводили с помощью статистического пакета Statistica (версия 6,0), а также Biostat 4.03. База данных создавалась с использованием редактора электронных таблиц Microsoft Excel 2007.

Непрерывные переменные в исследуемых выборках представлены в виде медианы (Me) с 25;75 процентилями. Для определения достоверности различий между двумя сравниваемыми выборками использовали Т-критерий Манна–Уитни. При множественных сравнениях применяли критерий Крускала–Уолеса и Данна. Корреляционную взаимосвязь между изученными параметрами определяли с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (*r*).

Операционные характеристики использованных методов представлены показателями диагностической чувствительности (Se), специфичности (Sp), прогностичности положительного результата (PVP), прогностичности отрицательного результата (PVN) и диагностической эффективности (ДЭ).

Различия считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Верификация клинического исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК основывалась на таких дифференциально-диагностических признаках, как остро возникший ангинозный загрудинный болевой синдром и констатация на этом фоне нарушений реполяризации желудочков на ЭКГ: депрессии сегмента S-T, инвертированные или ревертированные зубцы Т по сравнению с предшествующими показателями ЭКГ, а также показатели нагрузочных велоэргометрических тестов.

Результаты изучения иммуномаркёров гипоксического повреждения миокарда, показателей неспецифического субклинического

воспаления и эндотелиальной дисфункции в общей группе пациентов с ОКС при поступлении (точка отсчёта) и в группе больных с клиническим исходом ОКС в стенокардию напряжения III ФК (конечная точка) отражены в табл.1.

Из блока иммуномаркёров гипоксического повреждения миокарда видно, что достоверного увеличения в исследуемой группе больных достигали показатели НП ( $p < 0,05$ ). Изменения уровня аутоиммунного ответа на кардиолипин и антигенные субстанции кардиомиоцитов в сравниваемых группах были незначительными. Больные ОКС с клиническим исходом в стенокардию напряжения III ФК были тропонин-I-негативными. Что же касается BNP-32, то видно, что у больных ОКС с исходом в стенокардию напряжения III ФК этот показатель достоверно выше по сравнению с общей группой больных ОКС при поступлении: 80(30; 150) против 150(90; 635);  $p < 0,05$ .

Из блока маркёров воспаления колебания уровней СРБ в двух исследованных группах больных не достигали статистически значимого уровня. Но уровень сывороточного ИЛ-1β при исходе ОКС в стенокардию напряжения III ФК достоверно снижался по сравнению с общей группой больных ОКС при поступлении ( $p < 0,01$ ). Тенденция к снижению определялась и в отношении ТНФ-α. Факты примечательные, свидетельствующие о том, что продукция провоспалительных цитокинов при стабилизации коронарной патологии существенно понижается.

Из маркеров эндотелиальной дисфункции статистически достоверные изменения коснулись только сывороточного уровня NO: 12,08(7,08; 16) в общей группе больных ОКС при поступлении против 20,7(12; 33) в группе больных с исходом ОКС в стенокардию напряжения III ФК,  $p < 0,05$ . Изменения, свидетельствующие о том, что продукция ведущего вазоди-

Таблица 1

#### Показатели воспаления, эндотелиальной дисфункции и иммуномаркёры гипоксического повреждения миокарда у больных с ОКС при поступлении стационар и у больных ОКС с исходом в стенокардию напряжения III ФК

Показатель	Больные ОКС при поступлении в стационар Me (25;75 процентиля), n = 46	Больные ОКС с исходом в стенокардию напряжения III ФК Me (25;75 процентиля), n = 22
<b>ИММУНОМАРКЁРЫ</b>		
НП, нмоль/л	25,4 (19,3; 33,5)*	31,4 (27,4; 34)
Ат к кардиолипину, ЕД/мл	5,8 (4,5; 7,1)	4,6 (4; 6)
Ат к миокардиальным клеткам	в 59% случаев	в 60% случаев
<b>МАРКЁРЫ ВОСПАЛЕНИЯ И КАРДИОМАРКЁРЫ</b>		
СРБ, мг/л	15 (15; 25)	20 (15; 25)
ИЛ-1β, пг/мл	2,12 (0,95; 3,34)**	0,48 (0; 0,76)
ТНФ-α, пг/мл	1 (1; 1,4)	0,6 (0,4; 1,84)
Тропонин I, нг/мл	1,9 (1,2; 1,8)	отр
BNP-32, пг/мл	80 (30; 150)*	150 (90; 635)
<b>МАРКЁРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ</b>		
NO, мкмоль/л	12,08 (7,08;16)*	20,7 (12;33)
ЭТ, фмоль/мл	2,21 (1,4;3,4)	2,8 (1,4;6)
ГЦ, мкмоль/л	16 (14,2;19)	16,4 (15,3;17)
MMP – 9, нг/мл	450 (290;690)	600 (440;740)
TIMP -1, нг/мл	106,2 (96,2;116,5)	111 (102;115)

Примечание. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  по сравнению с больными ОКС с исходом в стенокардию напряжения III ФК (Т-критерий Манна–Уитни).

**Показатели воспаления, эндотелиальной дисфункции и иммуномаркёры гипоксического повреждения миокарда у больных ОКС с исходом в стенокардию напряжения III ФК («до – после»)**

Показатель	Больные с исходом ОКС в стенокардию напряжения III ФК при поступлении в стационар («до») Me (25; 75 процентиля), n = 22	Больные с исходом ОКС в стенокардию напряжения III ФК после выписки из стационара («после») Me (25; 75 процентиля), n = 22	Контрольная группа Me (25; 75 процентиля), n = 19
<b>ИММУНОМАРКЁРЫ</b>			
НП, нмоль/л	27,8 (24,5; 33,5)*	31,4 (27,4; 34)*	17 (16; 20)
Ат к кардиолипину, ЕД/мл	5,9 (4,6; 6,8)	4,6 (4; 6)	5 (5; 5)
Ат к миокардиальным клеткам	в 60%	в 60%	Отр.
<b>МАРКЁРЫ ВОСПАЛЕНИЯ И КАРДИОМАРКЁРЫ</b>			
СРБ, мг/л	15 (25; 35)	20 (15; 25)	отр
ИЛ-1β, пг/мл	0,9 (0; 2,5)	0,48 (0; 0,76)*	1,1 (0,95; 3,3)
ТНФ-α, пг/мл	0,8 (0,6; 1)*	0,6 (0,4; 1,84)*	2,2 (1,8; 2,6)
Тропонин I, нг/мл	Отр.	Отр.	Отр.
BNP-32, пг/мл	100 (30; 160)*	150 (90; 635)*	30 (30; 50)
<b>МАРКЁРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ</b>			
NO, мкмоль/л	15 (10,8; 20,9)	20,7 (12; 33)	19,7 (10,9; 29)
ЭТ, фмоль/мл	2,4 (1,1; 3,7)	2,8 (1; 4,6)	2,08 (1,6; 2,6)
ГЦ, мкмоль/л	16,3 (15,5; 17,3)	16,4 (15,3; 17)	1,56 (1,4; 1,73)
ММР – 9, нг/мл	380 (205; 495) <sup>x</sup>	600 (440; 740)*	370 (320; 420)
ТИМР -1, нг/мл	88,5 (71; 108,5) <sup>x</sup> , *	111 (102; 115)*	60 (60; 79,5)

Примечание. \* –  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  по сравнению с контрольной группой (критерии Крускала–Уоллиса и Данна); <sup>x</sup> –  $p < 0,05$  по сравнению с больными из группы «после» (критерии Крускала–Уоллиса и Данна).

лятатора обратно пропорциональна степени тяжести заболевания патологического процесса в коронарных сосудах. Что же касается других показателей эндотелиальной дисфункции, то значения ЭТ и ГЦ практически не отличались друг от друга, а показатели ММР-9 и ТИМР -1 имели лишь тенденцию к повышению у больных с исходом ОКС в стенокардию напряжения III ФК.

Результаты сравнительного анализа изученных показателей в группе больных со стенокардией напряжения III ФК при поступлении («до») и после выписки («после») из стационара представлены в табл. 2. Эти данные отражают динамику изменений показателей воспаления, эндотелиальной дисфункции и иммуномаркёров гипоксического повреждения миокарда в краткосрочной перспективе, что необходимо учитывать при разработке прогностической блок-схемы клинического исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК на госпитальном этапе.

Как видно из таблицы, достоверное повышение ( $p < 0,05$ ) сывороточного НП имело место в группе больных как «до», так и «после». Оценка с этих позиций аутоиммунного ответа на кардиолипин и антигены кардиомиоцитов не внесла существенных изменений в заключение о стабильном уровне этих маркёров за период пребывания в стационаре. Все больные из этой группы были тропонин-I-негативными. Интересно поведение BNP-32. Из табл. 2 видно, что на этапе поступления («до») и на этапе постановки клинического диагноза («после») значения BNP-32 достоверно выше по сравнению с контрольной группой здоровых доноров ( $p < 0,05$ ). Однако за период пребывания в стационаре от 14 до 20 дней эти показатели возросли почти в 1,5 раза. Очевидно, что функциональная перегрузка миокарда за период пребывания в стационаре не только не уменьшается, но и увеличивается.

Из маркёров воспаления, как это не удивительно, в иссле-

дуемой группе больных определяется ингибция продукции ИЛ-1β и ТНФ-α по сравнению с контрольной группой. На этом фоне обращает на себя внимание достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение сывороточных уровней ММР-9 и ТИМР-1 за период пребывания в стационаре. Факты несколько противоречивы. С одной стороны активность ММР-9 обуславливает дестабилизацию атеросклеротической бляшки, а с другой активность ингибитора ММР-9 (ТИМР -1) должна нивелировать патогенные эффекты этой металлопротеиназы. Вероятно, при стенокардии напряжения III ФК этот баланс достигает более или менее приемлемого уровня, поскольку дальнейшего прогрессирования коронарной болезни сердца в данной группе больных за период пребывания в стационаре мы не наблюдали. Со стороны других показателей эндотелиальной дисфункции – NO, ГЦ и ЭТ изменения носили недостоверный характер.

С использованием возможностей сводных таблиц (Microsoft Excel 2007) нами выведены наиболее часто встречающиеся интервалы концентраций показателей воспаления, эндотелиальной дисфункции и иммуномаркёров гипоксического повреждения миокарда в исследованных группах больных и на основании этих данных рассчитаны значения относительного риска (ОР) клинического исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК. В табл. 3 представлены полученные результаты.

Из данных таблицы видно, что статистически достоверные значения ОР затрагивали все патогенетически важные показатели, за исключением недостоверного ОР по СРБ в интервале концентраций 20 – 25 мг/л; ЭТ в интервале концентраций 1 – 1,5 фмоль/мл; ММР – 9 в интервале концентраций 420 – 720 нг/мл и АТ к КЛ в интервале концентраций 3 – 5 ЕД/мл.

Из операционных характеристик использованных тестов

Таблица 3

**Относительный риск клинического исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК по показателям воспаления, эндотелиальной дисфункции и иммуномаркерам гипоксического повреждения миокарда**

Интервалы концентраций	ОР	95% ДИ	p
BNP-32, 30 – 80 пг/мл	3,4	от 1,6 до 7,4	< 0,05
СРБ, 20 – 25 мг/л	1,43	от 0,5 до 3,8	> 0,05
ИЛ-1β, 0 – 0,5 пг/мл	4,6	от 1,8 до 11,5	< 0,05
ТНФ-α, 0 – 0,5 пг/мл	3,8	от 1,7 до 8,4	< 0,05
NO, 20 – 30 мкмоль/л	6,3	от 2,2 до 14,5	< 0,05
ЭТ, 1 – 1,5 фмоль/мл	2,2	от 0,9 до 5,3	> 0,05
ГЦ, 17 – 18 мкмоль/л	7,2	от 3,8 до 14,5	< 0,05
ММР – 9, 420 – 720 нг/мл	1,9	от 0,74 до 4,8	> 0,05
ТИМР -1, 90 – 150 нг/мл	4,4	от 1,7 до 11,3	< 0,05
НП, 24 – 43 нмоль/л	4,7	от 1,7 до 12,8	< 0,05
АТ к КЛ, 3 – 5 ЕД/мл	1,9	от 0,67 до 4,7	> 0,05

Примечание. ДИ – доверительный интервал.

**Блок-схема персонализированного прогноза клинического исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК на госпитальном этапе**

Показатель	Иммуномаркеры	Маркеры воспаления	Маркеры эндотелиальной дисфункции	Кардиомаркеры
НП	24 – 43 нмоль/л			
АТ к МК	+60% случаев			
ИЛ-1β		0 – 0,5 пг/мл		
ТНФ-α		0 – 0,5 пг/мл		
NO			20 – 30 мкмоль/л	
ГЦ			17 – 18 мкмоль/л	
ТИМР -1			90 – 150 нг/мл	
BNP-32				30 – 80 пг/мл

представим данные по прогностичности положительного результата (PVP), касающегося наиболее информативных интервалов концентраций изученных показателей. PVP для BNP-32 составил 37%, для ИЛ-1β – 60%, для ТНФ-α – 44%, для NO – 80%, для ГЦ – 91%, для ТИМР-1 – 32%, для НП – 37%. Как видим, наибольшей мощностью в отношении исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК по PVP отличался интервал концентрации ГЦ от 17 до 18 мкмоль/л.

Достоверные корреляционные связи между изученными показателями в группе больных ОКС с исходом в стенокардию напряжения III ФК были весьма многообразными. В частности, сильные положительные связи определялась между BNP-32 и ГЦ ( $r=0,958$ ;  $p=0,000$ ), ГЦ и ММР-9 ( $r=0,705$ ;  $p=0,019$ ) и BNP-32 и НП ( $r=0,764$ ;  $p=0,008$ ). Во всех остальных случаях определялась связь средней силы: BNP-32 и СРБ ( $r=0,609$ ;  $p=0,048$ ), ИЛ-1β и СРБ ( $r=0,561$ ;  $p=0,05$ ), ИЛ-1β и НП ( $r=0,598$ ;  $p=0,05$ ), ТНФ-α и ЭТ ( $r=0,584$ ;  $p=0,05$ ), ТНФ-α и АТ к КЛ ( $r=0,415$ ;  $p=0,05$ ), NO и ГЦ ( $r=0,641$ ;  $p=0,037$ ), NO и НП ( $r=0,598$ ;  $p=0,05$ ), ЭТ и АТ к КЛ ( $r=0,630$ ;  $p=0,04$ ), а также ГЦ и ММР-9 ( $r=0,705$ ;  $p=0,019$ ).

Комплексный анализ наиболее информативных интервалов концентраций неспецифического субклинического воспаления, эндотелиальной дисфункции и иммуномаркеров гипоксического повреждения миокарда, а также значений достоверных ОР, операционных характеристик использован-

ных тестов и достоверных корреляционных связей позволил составить итоговую блок-схему по персонализированному прогнозу клинического исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК на госпитальном этапе, представленную в табл. 4.

Как видно из таблицы, персонализированный прогноз клинического исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК на госпитальном этапе основывается на наличии у обследуемых больных следующих интервалов концентраций (точки разделения):

- иммуномаркеров: НП 24 – 43 нмоль/л и в 60% случаев встречаются АТ к кардиомиоцитам;
- кардиомаркера BNP-32 30 – 80 пг/мл;
- маркеров воспаления ИЛ-1β 0 – 0,5 пг/мл и ТНФ-α 0 – 0,5 пг/мл;
- маркеров эндотелиальной дисфункции NO 20 – 30 мкмоль/л, ГЦ 17 – 18 мкмоль/л, ТИМР -1 90 – 150 нг/мл;

Пациенты, у которых показатели воспаления, эндотелиальной дисфункции и иммуномаркеры гипоксического повреждения миокарда при поступлении в стационар находятся в пределах указанных интервалов концентраций (точка отсчёта), попадают в группу высокого риска в отношении клинического исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК (конечная точка).

Вычислив общие операционные характеристики тестов и общий ОР мы получим формулу персонализированного прогноза клинического исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК на госпитальном этапе:

Таблица 4

– по блоку кардиоспецифических иммуномаркеров: Se=82%, Sp=56%, PVP=37%, PVN=90%, ДЭ=60%, ОР=4,7.

– по блоку маркеров воспаления: Se=47%, Sp=83,5%, PVP=52%, PVN=80%, ДЭ=73,5%, ОР=4,2;

– по блоку маркеров эндотелиальной дисфункции: Se=58,6%, Sp=75,3%, PVP=67,6%, PVN=85,6%, ДЭ=72,3%, ОР=5,9;

Из представленной формулы видно, что наибольшей информативностью обладает блок иммуномаркеров и эндотелиальной дисфункции. В практической деятельности определение этих показателей в первые дни при поступлении больных ОКС в стационар (точка отсчёта) и констатация позитивных

результатов в указанных интервалах (точки разделения) позволяют с высокой вероятности прогнозировать краткосрочный клинический исход ОКС в стенокардию напряжения III ФК (конечная точка) по отношению к конкретному пациенту.

### Заключение

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что клинический исход ОКС в стенокардию напряжения III ФК связан с активным участием таких патологических процессов, как кардиоспецифические изменения в системе иммунитета в связи с гипоксическим повреждением миокарда, неспецифическим субклиническим воспалением и эндотелиальной дисфункцией. Достоверные показатели ОР по наиболее информативным интервалам концентраций растворимых факторов, а также учёт сравнительного анализа полученных результатов, достоверных корреляционных связей и операционных характеристик использованных методов позволил составить блок-схему персонализированного прогноза клинического исхода ОКС в стенокардию напряжения III ФК на госпитальном этапе. При условии налаженных лабораторных методов и своевременного определения указанных показателей, практическая значимость предложенного подхода очевидна.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.



**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-8, 10-13, 15-19 см. в REFERENCES)

1. Чарная М.А., Деметьева И.И., Морозов Ю.А. и др. Маркёры повреждения миокарда в кардиологии и кардиохирургии. Часть 2. Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2010; 3(4): 26–33.
9. Чарная М.А., Деметьева И.И., Морозов Ю.А. и др. Кардиоспецифические биомаркёры в кардиологии и кардиохирургии. Часть 1. Общая характеристика биомаркёров. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2010; 3(3): 26–33.
14. Богова О.П., Чукаева И.И. Инфаркт миокарда. Воспаление и прогноз. *Российский кардиологический журнал*. 2003; 4: 42–9.
20. Уразгильдеева С.А., Титков А.Ю., Васина Л.В. и др. Степень коронарной недостаточности и уровень антител к атерогенным липопротеидам у больных ишемической болезнью сердца. *Терапевтический архив*. 2011; 9: 5–13.
21. Зыков К.А., Татенкулова С.Н., Масенко В.П. и др. Выявление особенностей аутоиммунных реакций при хронической сердечной недостаточности различной этиологии. *Терапевтический архив*. 2009; 4: 22–8.
22. Давыдов С. И. Тарасов А.А., Емельянова А.Л. и др. Новые возможности иммунологической диагностики ишемической болезни сердца. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2012; 11(1): 49–52.
23. Палеев Ф.Н., Абудеева И.С., Москалец О.В. и др. Неспецифические маркёры воспаления в прогнозировании течения ишемической болезни сердца. *Кардиология*. 2009; 9: 59–65.
24. Барбараш О.Л., Зыков М. В., Кашталал В.В. и др. Прогностическая ценность различных маркёров воспаления при инфаркте миокарда с подъёмом сегмента ST. *Кардиология*. 2011; 3: 24–9.
25. Шрейдер Е.В., Шахнович Р.М., Казначеева Е.И. и др. Сравнительная динамика маркёров воспаления и NT-proBNP при различных вариантах лечения больных с острым коронарным коронарным синдромом. *Кардиология*. 2008; 8: 20–7.
26. Татенкулова С.Н., Мареев В.Ю., Зыков К.А. и др. Роль гуморальных воспалительных факторов в патогенезе ишемической болезни сердца. *Кардиология*. 2009; 1: 4–8.
8. Moe K.T., Wong P. Current trends in diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. *Ann. Acad. Med. Singapore*. 2010; 39(3): 210–5.
9. Charnaya M.A., Dementeva I.I., Morozov Yu.A. et al. Cardiac biomarkers in cardiology and cardiac surgery. Part 2. General characteristics of biomarkers. *Kardiologiya i serdечно-sosudistaya khirurgiya*. 2010; 3(3): 26–33. (in Russian)
10. Amodio G., Antonelli G., Di Serio F. Cardiac biomarkers in acute coronary syndromes: a review. *Curr. Vasc. Pharmacol*. 2010; 8(3): 388–93.
11. Bertinchant J. P., Ledermann B., Schmutz L. et al. Diagnostic and prognostic significance of CK-MB, troponins, CRP, BNP and/or NT-proBNP in coronary angioplasty. Elevation mechanisms and clinical implications. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss*. 2007; 100(11): 925–33.
12. Chan C.P., Rainer T.N. Pathophysiological roles and clinical importance of biomarkers in acute coronary syndrome. *Adv. Clin. Chem*. 2013; 59: 23–63.
13. Shu J., Ren N., Du J. B. et al. Increased levels of interleukin-6 and matrix metalloproteinase-9 are of cardiac origin in acute coronary syndrome. *Scand. Cardiovasc. J*. 2007; 41(3): 149–54.
14. Bogova O.P. Chukaeva I.I. Myocardial infarction. Inflammatory and prognosis. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2003; 4: 42–9. (in Russian)
15. Christersson C., Oldgren J., Wallentin L. et al. Treatment with an oral direct thrombin inhibitor decreases platelet activity but increases markers of inflammation in patients with myocardial infarction. *J. Intern. Med*. 2011; 270(3): 215–23.
16. Searle J. Danne O., Müller C. et al. Biomarkers in acute coronary syndrome and percutaneous coronary intervention. *Minerva Cardioangi*. 2011; 59(3): 203–23.
17. Skyschally A., Schulz R., Heusch G. Pathophysiology of myocardial infarction: protection by ischemic pre- and postconditioning. *Herz*. 2008; 33(2): 88–100.
18. Robertson L., Grip L., Mattsson-Hultén L. et al. Release of protein as well as activity of MMP-9 from unstable atherosclerotic plaques during percutaneous coronary intervention. *J. Intern. Med*. 2007; 262(6): 659–67.
19. Wannamethee S. G., Whincup P.H., Shaper A. G. et al. Circulating inflammatory and hemostatic biomarkers are associated with risk of myocardial infarction and coronary death, but not angina pectoris, in older men. *J. Thromb. Haemost*. 2009; 7(10): 1605–11.
20. Urazgildeeva S.A., Titkov A.Yu. Vasina L.V. et al. The extend of coronary stenosis and the level of antibodies to atherogenic lipoproteins in patients with coronary heart disease. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2011; 9: 5-13. (in Russian)
21. Zikov K.A., Tatenkulova S.N., Masenko V.P. et al. Characteristics of autoimmune reactions in chronic cardiac failure of different etiology. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2009; 4: 22–8. (in Russian)
22. Davydov S.I., Tarasov A.A., Emelyanova A.L. et al. New perspectives in immunological diagnostics of coronary heart disease. *Kardiologiyarnaya terapiyai profilaktika*. 2012; 11(1): 49–52. (in Russian)
23. Paleev F.N., Abudeeva I.S., Moskalets O.V. et al. Nonspecific markers of inflammation in prognosis of ischemic heart disease. *Kardiologiya*. 2009; 9: 59–65. (in Russian)
24. Barbarash O.L., Zikov M.V., Kashtalal V.V. et al. Prognostic value of various markers of inflammation in S-T-elevation myocardial infarction. *Kardiologiya*. 2011; 3: 24–9. (in Russian)
25. Shreider E.V., Shakhnovich R.M., Kaznacheeva E.I. et al. Comparative dynamics of markers of inflammation and NT-proBNP in different variants of treatment of patients with ACS. *Kardiologiya*. 2008; 8: 20–7. (in Russian)
26. Tatenkulova S.N., Mareev V.Yu., Zikov K.A. et al. The role of inflammatory factors in pathogenesis of ischemic heart disease. *Kardiologiya*. 2009; 1: 4-8. (in Russian)
1. Charnaya M.A., Dementeva I.I., Morozov Yu.A. et al. Markers of myocardial injury in cardiology and cardiac surgery. Part 2. *Kardiologiya i serdечно-sosudistaya khirurgiya*. 2010; 3(4): 26–33. (in Russian)
2. Kratz A., Lewandrowski K.M., Januzzi J.L. et al. Comparison of cardiac marker concentration in healthy blood donors and hospital patients without acute coronary syndrome. *Am. J. Cardiol*. 2002; 90(2): 177–8.
3. Szabo S., Etzel D., Walter T. et al. Abciximab combined with half-dose reteplase has beneficial effects on inflammatory myocardial response in patients with myocardial infarction. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2009; 20(2): 129–33.
4. Aukrust P., Sandberg W.J., Otterdal K. et al. Tumor necrosis factor superfamily molecules in acute coronary syndromes. *Ann. Med*. 2011; 43(2): 90–103.
5. Blankenberg S., Tiret L., Bickel C. et al. Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation*. 2002; 106(1): 24–30.
6. Derić M., Stokić E., Kojić-Damjanov S. et al. Biochemical markers of atherosclerotic disease. *Med. Pregl*. 2009; 62(3): 15–23.
7. Fichtlscherer S., Zeiher A.M. Endothelial dysfunction in acute coronary syndromes: association with elevated C-reactive protein levels. *Ann. Med*. 2000; 32(8): 515–8.

## REFERENCES

Поступила 09.11.17  
Принята в печать 16.12.17

## МЕТОДЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.37:579.887.9].012.6

*Зенинская Н.А.<sup>1</sup>, Рябко А.К.<sup>1</sup>, Колесников А.В.<sup>1,2</sup>, Козырь А.В.<sup>1</sup>, Марьин М.А.<sup>1</sup>, Фирстова В.В.<sup>1</sup>, Шемякин И.Г.<sup>1</sup>, Караулов А.В.<sup>3</sup>, Дятлов И.А.<sup>1</sup>***ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ПЕПТИДОГЛИКАН-АССОЦИИРОВАННОГО ЛИПОПРОТЕИНА (PAL) *LEGIONELLA PNEUMOPHILA***<sup>1</sup>ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ), 142279, п. Оболенск, Россия;<sup>2</sup>Институт инженерной иммунологии (ИИИ), 142380, дер. Любучаны, Россия;<sup>3</sup>ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, Россия

Разработан метод получения рекомбинантного пептидогликан-ассоциированного липопротеина (PAL) *L. pneumophila* в гетерологической системе экспрессии в составе химеризованного белка His-SUMO-PAL, содержащего гексагистидиновый тэг для хроматографической очистки белка-предшественника и белок PAL, разделённые расщепляемым SUMO-протеазой пептидом, который позволяет отделить белок His-SUMO от белка PAL с восстановлением его нативной первичной структуры. Метод позволяет получить PAL *L. pneumophila* с высокой степенью чистоты и выходом 0,3 г с литра бактериальной культуры без ферментации. Полученный рекомбинантный PAL сохраняет иммуногенные свойства и может быть использован при конструировании вакцинных препаратов и в процессе получения моноклональных антител для диагностики легионеллёзной инфекции.

Ключевые слова: *Legionella pneumophila*; пептидогликан-ассоциированный липопротеин; PAL; легионеллёз, лимфоциты.

**Для цитирования:** Зенинская Н.А., Рябко А.К., Колесников А.В., Козырь А.В., Марьин М.А., Фирстова В.В., Шемякин И.Г., Караулов А.В., Дятлов И.А. Получение и иммуногенные свойства рекомбинантного пептидогликан-ассоциированного липопротеина (PAL) *Legionella pneumophila*. *Иммунология*. 2018; 39(1): 50-55. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-50-55>

*Zeninskaya N.A.<sup>1</sup>, Riabko A.K.<sup>1</sup>, Kolesnikov A.V.<sup>1,2</sup>, Kozyr A.V.<sup>1</sup>, Marin M.A.<sup>1</sup>, Firstova V.V.<sup>1</sup>, Shemyakin I.G.<sup>1</sup>, Karaulov A.V.<sup>3</sup>, Dyatlov I.A.<sup>1</sup>*

**THE PREPARATION OF RECOMBINANT PEPTIDOGLYCAN-ASSOCIATED LIPOPROTEIN (PAL) *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* AND CHARACTERISATION OF ITS IMMUNOGENIC PROPERTIES**<sup>1</sup>FSIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, 142279, Obolensk, Russia;<sup>2</sup>Institute of Immunological Engineering, 142380, Lyubuchany, Russia;<sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Russian Health Ministry, 119991 Moscow, Russia

A method for producing recombinant peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) *L. pneumophila* in a heterologous expression system consisting of chimerical protein His-SUMO-PAL with hexa-histidine tag (for chromatographic purification of the precursor protein) and the protein PAL, which separated by SUMO protease peptide was developed. The method allows to obtain recombinant PAL with a high degree of purity and a yield of 0.3 g per liter of bacterial culture without fermentation. The obtained recombinant PAL retains the native structure, immunogenic properties and it can be used for vaccine development and production of monoclonal antibodies as a diagnostic tool at *Legionella* infection.

**Keywords:** *Legionella pneumophila*; peptidoglycan-associated lipoprotein; PAL; legionellosis; lymphocytes.

**For citation:** Zeninskaya N.A., Riabko A.K., Kolesnikov A.V., Kozyr A.V., Marin M.A., Firstova V.V., Shemyakin I.G., Karaulov A.V., Dyatlov I.A. The preparation of recombinant peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) *legionella pneumophila* and characterisation of its immunogenic properties. *Immunologiya*. 2018; 39(1): 50-55. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-50-55>

**For correspondence:** Natalia A. Zeninskaya, junior researcher of the laboratory of molecular biology "FBIS SRCAMB", E-mail: [nataliazeninskaya@mail.ru](mailto:nataliazeninskaya@mail.ru)

Information about authors:

Zeninskaya N.A., <http://orcid.org/0000-0002-5388-292X>;Riabko A.K., <http://orcid.org/0000-0001-7478-909X>;Kolesnikov A.V., <http://orcid.org/0000-0001-8108-0265>;Kozyr A.V., <http://orcid.org/0000-0001-6295-5943>;Marin M.A., <http://orcid.org/0000-0003-0560-915X>;

Firstova V.V., <http://orcid.org/0000-0002-9898-9894>;  
Shemyakin I.G., <http://orcid.org/0000-0001-9667-1674>;  
Dyatlov I.A., <http://orcid.org/0000-0003-1078-4585>

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

**Acknowledgments.** *Work is performed under NIR 054 "development of a new generation of high-performance test systems for detection of pathogens of nosocomial infections on the basis of immuno-PCR aptamers".*

Received 03.09.17

Accepted 16.12.17

## Введение

Основным методом, позволяющим осуществлять раннюю диагностику и мониторинг легионеллёзной инфекции, является определение легионеллёзного антигена в моче иммунохроматографическим или иммуноферментным методом. Эти тесты основаны прежде всего на выявлении ЛПС *L. pneumophila* серогруппы 1, т. к. именно этот возбудитель чаще всего вызывает легионеллёзную инфекцию. Вместе с тем последние исследования показывают, что доля легионеллёзной инфекции, вызванной *L. pneumophila* серогруппы 1, варьирует от года к году и составляет от 50 до 91%, что было подтверждено лабораторными исследованиями [1 – 3]. Более того, показатели смертности для всех групп пациентов, не входящих в группу заболевших от инфицирования *L. pneumophila* серогруппы 1, выше и составляют около 27% [1, 2]. *L. pneumophila*, *L. micdadei* и *L. bozemanii* были причиной 30 – 55% заболеваний легионеллёзной инфекцией в Австралии и Новой Зеландии. Регистрировались также инфекции, вызванные *L. jordanis*, *L. oakridgensis*, *L. anisa*, *L. gormanii* и *L. sainthelensii* [1, 4 – 6].

Приведенные данные свидетельствуют о необходимости создания тест-системы, позволяющей выявлять не только легионеллёзную инфекцию, вызванную бактериями *L. pneumophila* серогруппы 1, но также и другими серогруппами и другими видами *Legionella*.

Одним из высококонсервативных антигенов бактерий рода *Legionella* является пептидогликан-ассоциированный липопротеин (PAL). Иммунизация экспериментальных животных (мышей, кроликов, морских свинок) PAL индуцирует выраженный синтез антител, пролиферацию лимфоцитов, а сам антиген, начиная с третьих суток, обнаруживается в моче инфицированных животных [7]. В связи с иммуногенной активностью и специфичностью для бактерий рода *Legionella* PAL рассматривается в качестве возможного компонента вакцины, а моноклональные антитела к нему – в качестве основы при разработке препарата для диагностики легионеллёзной инфекции на ранних сроках заболевания [8].

Для получения рекомбинантного белка PAL (rPAL) использовались разные подходы, в частности, разработан метод получения rPAL содержащего на С-конце последовательность шести гистидинов; получение rPAL в клетках грамм-отрицательных бактерий под контролем сильного промотора; в эукариотических клетках линии NIH3T3 в векторе pcDNA3.1(+) методом липофекции, в составе единого полипептида с фрагментом глутатион-S-трансферазы (GST) в *E. coli* в векторе pGEX-KG, получение rPAL в виде химеры с мальтозосвязывающим белком (MBP) с использованием вектора pMAL(C2X). Все эти методы имеют определенные недостатки: низкая чистота конечного белкового препарата, сложность и дороговизна проведения масштабной продукции белка, низкая эффективность продукции rPAL.

Цель работы – разработать оптимальный способ получения рекомбинантного белка PAL в растворимой форме со структурой, максимально приближенной к нативной и определить его иммунобиологические свойства.

## Материал и методы

**Бактериальные штаммы, плазмиды, основные реактивы, среды.** Патогенный штамм *L. pneumophila* ATCC

33152 серогруппы 1 (Philadelphia), депонированный в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск) ФБУН ГНЦ ПМБ, культивировали в течение 5 сут при температуре 37 °С на легионеллбакагаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ), приготовленном в соответствии с инструкцией предприятия-изготовителя. Для клонирования и экспрессии использовали штаммы электрокомпетентных *E. coli* DH12S (Invitrogen, США) и BL21(DE3) (NEB, США). Бактерии *E. coli* культивировали как на агаризованной среде 2хУТ (дрожжевой экстракт – 10 г/л, триптон – 16 г/л, NaCl – 5 г/л, агар – 15 г/л, pH 7.0) с добавлением 1%-ной глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина, так и в жидкой среде 2хУТ (дрожжевой экстракт – 10 г/л, триптон – 16 г/л, NaCl – 5 г/л, pH 7.0) с добавлением 0,1%-ной глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина. Для получения экспрессионной конструкции использовали коммерческую плазмиду pET22b(+) (Novagen, США). Для расщепления продуктов амплификации и плазмиды по специфическим сайтам использовали эндонуклеазы рестрикции NdeI, SacI, SalI и BglII (Thermo, США). Для отщепления рекомбинантного белка rPAL из конструкции применяли протеазу SUMO (Invitrogen, США). Праймеры синтезированы ЗАО «Евроген» по заказу ФБУН ГНЦ ПМБ.

**Выделение тотальной ДНК *L. pneumophila*.** Колонии бактерий *L. pneumophila* смывали с поверхности агара физиологическим раствором. Помещали суспензию в стерильные микроцентрифужные пробирки, собирали клетки центрифугированием в течение 5 мин. при 10000g. Полученный осадок (60 – 80 мг) ресуспендировали в 400 мкл буфера экстракции (2 М Трис-HCl pH 8.0, 1 М NaCl, 20% SDS, 0,5 М ЭДТА), после чего прогревали суспензию на водяной бане при 65 °С в течение 20 мин., затем центрифугировали 5 мин. при 18000g. К супернатанту добавляли 300 мкл изопропилового спирта, перемешивали и выдерживали в течение 5 мин. при комнатной температуре, затем повторяли центрифугирование при тех же условиях. Осадок, содержащий ДНК, промывали 70%-ным охлажденным (+4 °С) этиловым спиртом, повторяли центрифугирование. Полученный осадок подсушивали 30 мин на воздухе с соблюдением условий асептики, и растворяли в 50 мкл особо чистой стерильной H<sub>2</sub>O (получена с помощью системы Milli-Q, Millipore, США).

**Получение экспрессионной конструкции.** Фрагмент ДНК, кодирующий последовательность шести гистидинов и пептида SUMO получали путём двух последовательных амплификаций с перекрывающихся праймеров. Результирующий фрагмент кодирует трансляционный энхансер MASMT, последовательность шести гистидинов (H6) и специфический сайт расщепления протеазой SUMO, содержит сайты эндонуклеаз рестрикции: NdeI на 5'-конце последовательности и SacI на 3'-конце. Полученный фрагмент клонировали в плазмиду pET22b(+) по сайтам рестрикции эндонуклеаз NdeI и SacI с получением экспрессионной плазмиды pET22-His-SUMO, которой затем трансформировали клетки *E. coli* DH12S. Трансформанты выращивали на твёрдой среде 2хУТ единичные колонии, анализировали на наличие инсера расчётной длины в плазмиде с помощью ПЦП с использованием стандартных праймеров T7forward и T7reverse. Плазмидную ДНК-клонов, содержащих встроенный фрагмент, выделяли

из ночной культуры, выращенной в жидкой среде 2хУТ, методом щелочного лизиса [9]. Корректность синтеза и встраивания экспрессионных конструкций верифицировали методом капиллярного секвенирования.

Фрагмент ДНК, кодирующий искомым белок PAL, получали прямой амплификацией с выделенного бактериального генома *L. pneumophila*. Использовали праймеры, вносящие на 5'-конец последовательности сайт рестрикции BglII и сайт SalI на 3'-конец фрагмента. Фрагмент, кодирующий PAL, лигировали в плазмиду pET22-His-SUMO по сайтам SalI и BglII. Получение единичных колоний и идентификацию инсерта проводили, как описано ранее.

**Экспрессия рекомбинантного белка His-SUMO-PAL в клетках *E. coli*.** Штамм-продуцент *E. coli* His-SUMO-PAL получали электротрансформацией электрокомпетентных клеток *E. coli* BL21(DE3). Трансформанты выращивали на агаризованной среде 2хУТ, содержащей 1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина. Полученную культуру засеивали в жидкую среду 2хУТ, содержащую 0,1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина, культивировали не менее 3 ч при 37°C в термостатируемом орбитальном шейкере при 220 об./мин до достижения 1 единицы оптической плотности. Продукцию рекомбинантного белка индуцировали добавлением 0,2 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), экспрессию белка проводили в течение 4 ч при 30°C.

**Выделение и очистка rPAL.** Бактериальную биомассу собирали посредством центрифугирования при 5000g в течение 10 мин., ресуспендировали осадок в буфере состава 20 мМ трис-HCl pH 8,0, 100 мМ NaCl. Лизис клеток производили в 0,5%-ном растворе тритон X-100 после предварительной обработки лизоцимом (200 мкг/мл), затем удаляли нуклеиновые кислоты обработкой ДНК-азой и РНК-азой в концентрациях по 10 мкг/мл каждого фермента. Разделяли лизат на фракции центрифугированием при 10000g в течение 30 мин. с охлаждением до +4 °С. Выделение рекомбинантного белка His-SUMO-PAL осуществляли из осветленного лизата (растворимой белковой фракции) методами ВЭЖХ. Все хроматографические работы вели при температуре +4°C. Выделяли His-Tag меченые белки на металл-хелатной смоле сOmplete™ His-Tag Purification Resin (Roche Life Sciences), используя буфер нанесения состава 20 мМ трис-HCl pH 8,0, 100 мМ NaCl и элюирующий буфер, содержащий 50 мМ имидазола. Доочищали элюат анионообменной хроматографией на смоле Q-Sepharose (GE Healthcare, США). Белок наносили на колонку в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl pH 8,0, 20 мМ NaCl, элюировали градиентом хлорида натрия на том же буфере от 20 до 500 мМ в течение 40 мин. Полученный белок His-SUMO-PAL обрабатывали протеазой SUMO (Invitrogen, США) в массовом соотношении протеазы к белку 1:1000, в присутствии 0,1 мМ дитиотреитола (ДТТ) при температуре 30 °С в течение 2 ч. для отщепления последовательности из пептида SUMO и гексагистидина.

Продукты расщепления белка His-SUMO-PAL отделяли друг от друга хроматографически на металл-хелатной смоле сOmplete™ His-Tag Purification Resin. Белок rPAL собирали из проскока хроматографической колонки при нанесении продуктов расщепления протеазой SUMO, концентрировали при помощи центрифужных фильтров Amicon Ultra-15 (Millipore, США). Получали чистую фракцию белка rPAL в конечном буфере методом эксклюзионной хроматографии на колонке Superdex 200 10/300 GL, уравновешенной буфером, содержащим 20 мМ MES pH 8,0, 100 мМ NaCl. Фракции, содержащие целевой белок PAL, определяли электрофоретически в 12% ПААГ в денатурирующих условиях по методике Лэмбли [10], объединяли, концентрировали, измеряли концентрацию белка в конечном препарате по методу Бредфорд [11] и при помощи инфракрасного спектрометра DirectDetect (Millipore, США), затем оценивали чистоту белкового препарата денситометрически. Белок PAL храни-

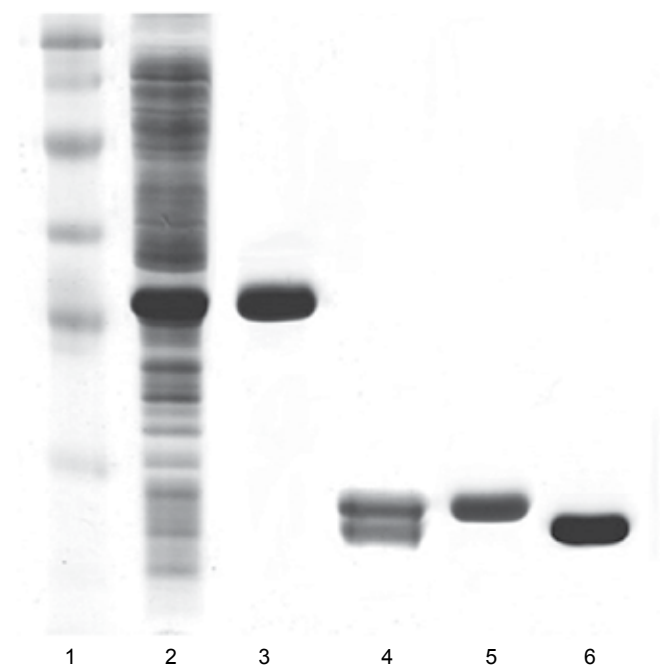


Рис. 1. Результаты отщепления белка His-SUMO и очистки белка PAL.

1 – маркер молекулярной массы SM0441 (Fermentas, США); 2 – контроль совокупности белков растворимой фракции бактериального лизата; 3 – белок His-SUMO-PAL, очищенный методом металл-хелатной хроматографии; 4 – фрагменты His-SUMO и PAL, полученные после расщепления исходного белка His-SUMO-PAL протеазой SUMO; 5 – белок PAL; 6 – белок His-SUMO.

ли в аликвотах при температуре -70°C в присутствии 30%-ного глицерина.

**Денситометрия.** Денситометрию rPAL проводили на лазерном сканере Turphon FLA 9500 с использованием программы ImageQuant™ TL.

**Определение цитотоксичности rPAL** проводили на клеточной линии J774 и лимфоцитах мышей с использованием общепринятых методов в МТТ-тесте [12] и с использованием прижизненного окрашивания 7-ААД красителем [13].

**Иммунизация мышей.** Мышей линии BALb/c иммунизировали двукратно подкожно rPAL (200 мкг/мл), эмульгированного с полным (первая иммунизация) и неполным (вторая иммунизация) адьювантом Фрейнда, с интервалом в 21 день. Бустер-дозу rPAL (100мкг/мл) вводили внутривенно в физиологическом растворе. Оценку иммунологических показателей проводили на 14-е сутки после последней иммунизации.

**Определение антител к PAL.** Проверку титра специфичности антител у иммунизированных мышей проводили непрямой твердофазным ИФА.

**Определение специфической активации лимфоцитов.** Спленциты ( $2 \cdot 10^6$  кл/мл), полученные общепринятым методом [12], инкубировали в лунках 96-луночного планшета по 200 мкл при температуре 37 °С во влажной атмосфере 5% углекислого газа ( $CO_2$ ) в полной питательной среде RPMI. В экспериментальные лунки вносили по 10 мкл среды, содержащей 10 мкг/мл PAL. В контрольные лунки добавляли 5 мкг/мл Con A (Sigma, США) для оценки уровня неспецифической активации. В лунки отрицательного контроля добавляли 10 мкл среды. Спленциты инкубировали в течение 24 ч для выявления количества клеток, экспрессирующих маркер активации CD69, 48 ч – экспрессирующих CD25.

Окрашивание поверхностных маркеров. Спленциты окрашивали моноклональными антителами к поверхност-

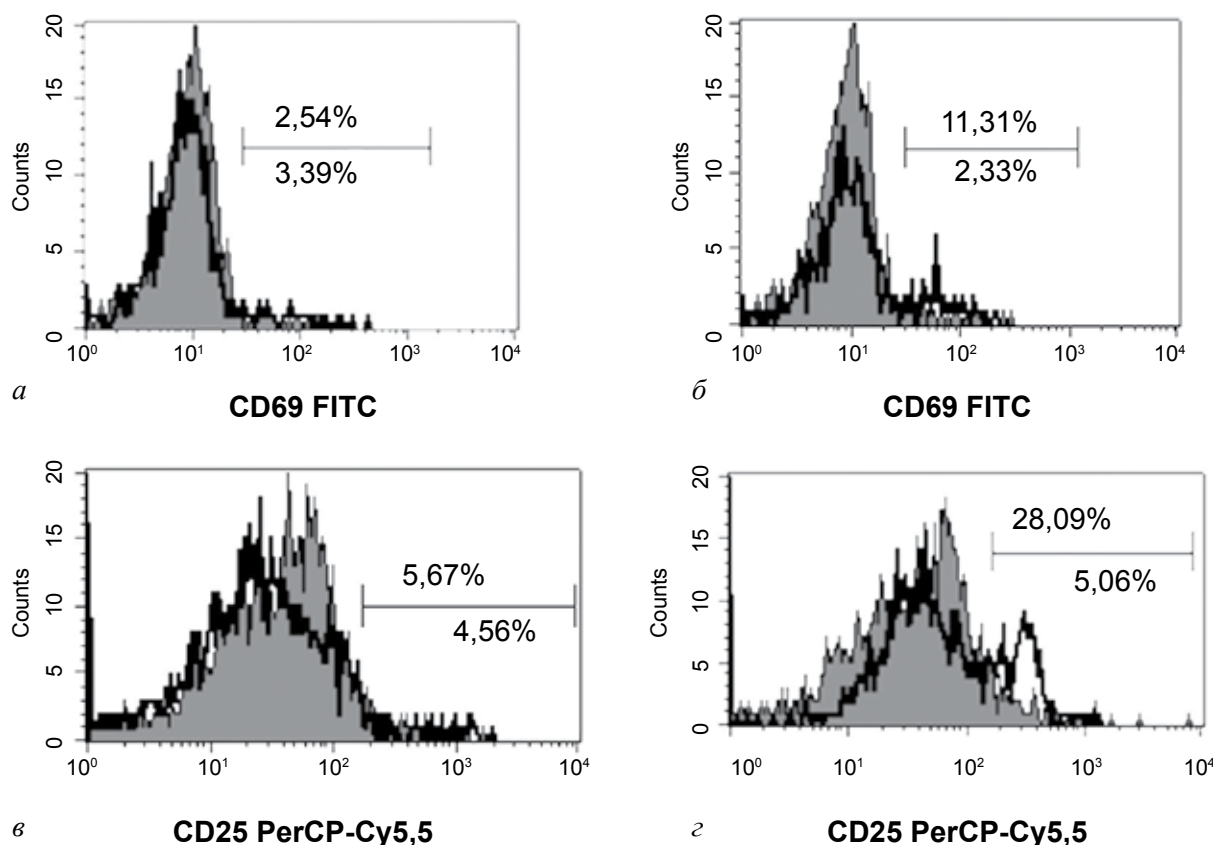


Рис. 2. Пример цитофлюорограмм, отражающих процентное содержание CD3+ CD4+ субпопуляции лимфоцитов, экспрессирующих CD69 (а, б) или CD25 (в, з) молекулу.

Распределение лимфоцитов, полученных от иммунных мышей, после инкубирования клеток в течение 24 ч (а, б), 48 ч (в, з) в присутствии гPAL (контурная линия) и без антигена (контурная линия с заштрихованной областью). Под маркером указано процентное содержание клеток, экспрессирующих активационный маркер без стимуляции гPAL. Над маркером – процентное содержание клеток экспрессирующих активационный маркер после стимуляции гPAL.

ным маркерам клеток мыши: CD69, CD25, CD19, CD3, CD4 (Caltag, Invitrogen), меченными флюорохромами FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5.5 или APC, в соответствии с инструкцией производителя. Подсчёт окрашенных клеток проводили на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы Cell QuestPro.

#### Статистическая обработка результатов измерений.

Для обработки результатов использовали стандартные методы математической статистики с вычислением средних арифметических значений величин и среднеквадратических отклонений; для анализа различий между группами применяли метод Стьюдента и непараметрические критерии Уилкоксона и Манна – Уитни [14].

#### Результаты и обсуждение

Для продукции комплексного белка His-SUMO-PAL была использована система экспрессии в *E. coli*. Выбор плазмидного вектора системы рЕТ обусловлен возможностью высокоэффективной трансляции полипептидов за счёт использования сильного промотора РНК-полимеразы бактериофага T7, повышенной стабильности продукции потенциально токсических белков за счёт низкого уровня копийности плазмид, несущих сайт репликации рBR332.

В итоге была получена экспрессионная конструкция рЕТ22-His-SUMO-PAL. Результаты секвенирования плазмиды рЕТ22-His-SUMO-PAL показали полное соответствие

полученной и запланированной к получению последовательности. N-концевая область белкового продукта содержит кодоны, обеспечивающие синтез последовательности энхансера трансляции MASMT [15], гомополимерного пептида H6, который позволяет очистить продукт с использованием металл-хелатной хроматографии, и полипептид SUMO, выступающий эффективным катализатором фолдинга – образующегося белка, и создающий возможность последующего отщепления N-концевого полипептида протеазой SUMO с сохранением нативной первичной последовательности белка PAL.

По результатам электрофоретического анализа в денатурирующих условиях было установлено, что белок, экспрессируемый клетками *E. coli* BL21(DE3), трансформированными плазмидой рЕТ22-His-SUMO-PAL, имеет вес ~30 кДа и накапливается как в растворимой, так и в нерастворимой фракции. Сравнение уровня продукции белка в растворимой и нерастворимой формах показало, что белок присутствует в обеих фракциях приблизительно в равных количествах. В связи с высокой продуктивностью растворимой формы PAL выделение рекомбинантного белка His-SUMO-PAL проводили из осветлённого лизата бактериальных клеток. В результате обработки очищенного His-SUMO-PAL протеазой SUMO получили 2 белковых фрагмента массой ~17 кДа (гPAL) и ~13 кДа (His-SUMO) (рис. 1). Меньший вес гPAL (17 кДа) по сравнению с нативным PAL (19 кДа) объясняется отсутствием сигнальной последовательности.

## Процентное содержание Т- и В-лимфоцитов, экспрессирующих CD69 или CD25-молекулу

Процентное содержание активированных лимфоцитов*, %	Группа мышей					
	интактные		иммунизированные гPAL с адьювантом Фрейнда		иммунизированные адьювантом Фрейнда	
	доза гPAL, мкг/мл					
	0	10	0	10	0	10
CD19+ CD69+	3,11	2,97	2,81	5,28	2,65	3,12
CD3+ CD69+	4,24	3,39	5,79	11,53	5,01	4,95
CD3+CD8+ CD69+	2,07	1,98	2,45	4,38	2,42	2,78
CD3+CD4+ CD69+	1,98	2,41	1,82	8,26	2,55	2,36
CD19+ CD25+	2,41	3,56	3,15	12,06	2,59	3,14
CD3+ CD25+	6,01	8,14	6,94	33,10	6,43	7,98
CD3+CD8+ CD25+	2,36	2,99	2,01	4,58	1,57	2,14
CD3+CD4+ CD25+	4,56	5,67	5,06	28,09	5,45	6,47

Примечание. \* – n = 5.

Разработанная методика получения белка гPAL позволила получить белок-предшественник His-SUMO-PAL с применением простой и быстрой двустадийной хроматографической очистки на металл-хелатной и анионообменной смолах. По результатам электрофоретического анализа, после 2-часовой выдержки большого избытка белка His-SUMO-PAL (1000 частей к 1 части протеазы) с протеазой SUMO происходит полное расщепление предшественника без остатка (см. рис. 1, дорожка 4). Фильтрация продуктов протеолиза осуществляется через металл-хелатную смолу, при этом происходит эффективное отделение пептида His-SUMO, который задерживается ионами Ni<sup>2+</sup> от нетегированного белка гPAL, обладающего нативной первичной структурой. Удаление примесей, выделение структурно гомогенной фракции белка и перевод в конечный буфер осуществляется эксклюзионной хроматографией.

Разработанная методика позволяет получить препарат с чистотой 98%, согласно данным денситометрии. Выход белка гPAL, отщепленного из состава рекомбинантного белка His-SUMO-PAL, составил 0,3 г с 1 литра бактериальной культуры.

Отсутствие токсичности гPAL было показано на клеточной линии J774 и лимфоцитах мышей в МТТ-тесте и с использованием прижизненного окрашивания клеток 7-AAD красителем (количество жизнеспособных клеток, инкубируемых совместно с гPAL, составило 95 – 97%).

Иммуногенность гPAL оценивали по способности антигена индуцировать синтез антител, активировать Т- и В-лимфоциты. Титры специфических антител у мышей, иммунизированных гPAL, составили 1:64000, причём антитела распознавали нативный PAL в иммуноблоте. Способность гPAL специфически активировать Т- и В-лимфоциты была подтверждена в экспериментах *in vitro*, проведённых на культурах спленоцитов, полученных от интактных и иммунных мышей. В качестве маркёров активации клеток оценивали уровень экспрессии CD69 и CD25 молекулы на поверхности клеток, отражающие этапы ранней (через 16 – 18 ч) и более поздней (через 48 ч) активации, соответственно. CD69 способствует запуску активационных процессов, для продолжения которых необходимы дополнительные сигналы, а появление молекулы CD25 на поверхности клеток позволяет сделать заключение о нарастании активации лимфоцитов. Появление молекулы CD25+ на поверхности В-лимфоцитов отражает не только активацию клеток, усиление их антиген-

презентирующих свойств, но и дифференцировку в клетки памяти [16].

Результаты исследований показали, что под влиянием гPAL активируются как Т-, так и В-лимфоциты, но только в группе иммунных мышей (см. таблицу, рис. 2), что показывает способность гPAL индуцировать специфические иммунные реакции и образование клонов памяти лимфоцитов, способных к быстрому иммунному ответу. В ответ на стимуляцию гPAL в группе иммунных мышей увеличивается количество CD3+CD4+ CD69+ (в 4,5 раза) и CD3+CD8+ CD69+ (в 1,7 раз) лимфоцитов, что свидетельствует о способности антигена активировать обе субпопуляции: Т-хелперы и цитотоксические лимфоциты.

Нативный PAL способен индуцировать синтез антител и специфически активировать Т- и В-лимфоциты [17, 18]. На основании полученных результатов, отражающих наличие иммуногенной активности у гPAL, можно сделать заключение о сохранении нативной структуры рекомбинантным антигеном аналогичной PAL *L. pneumophila*.

### Заключение

В рамках проведенной работы был создан новый эффективный способ конструирования продуцента, обеспечивающий получение белка в растворимом состоянии. Увеличение выхода белка-предшественника в растворимой форме было достигнуто за счёт химеризации белка PAL *L. pneumophila* с пептидом, расщепляемым SUMO. Разработана эффективная система хроматографической очистки белка, позволяющая получить белок 98%-ной чистоты с выходом 0,3 г с литра бактериальной культуры.

Полученный рекомбинантный белок гPAL специфически активирует Т- и В-лимфоциты и индуцирует синтез антител, распознающих нативный PAL в иммуноблоттинге, и нетоксичен для иммунокомпетентных клеток, что позволяет рассматривать его в качестве возможного компонента при конструировании вакцины против легионеллезной инфекции. Способность гPAL индуцировать синтез специфических антител позволяет использовать этот белок для получения моноклональных антител с целью создания диагностического препарата, выявляющего легионеллезную инфекцию у людей на ранних стадиях заболевания, в том числе обусловленную инфицированием *L. pneumophila* не только первой серогруппы, но и другими видами патогенных *Legionella*.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках НИИР 054 «Разработка нового поколения высокоэффективных тест-систем для детекции возбудителей нозокомальных инфекций на основе метода иммуно-аттамерной ПЦР».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-12, 15-18 см. В REFERENCES)

- Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН; 2014: 576.
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Медгиз; 1962.

### REFERENCES

- Benin A.L., Benson R.F., Besser R.E. Trends in Legionnaires Disease, 1980–1998: Declining Mortality and New Patterns of Diagnosis. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 35(9): 1039–46. doi:10.1086/342903.
- St-Martin G., Uldum S., Mølbak K. Incidence and prognostic factors for Legionnaires' disease in Denmark 1993–2006. *ISRN Epidemiol.* 2012; 2013. doi: 10.5402/2013/847283.
- Bruin J.P., Diederer B.M.W. Evaluation of Meridian TRU Legionella, a new rapid test for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 32(3): 333–4. doi:10.1007/s10096-012-1745-0.

4. Murdoch D.R., Podmore R.G., Anderson T.P., Barratt K., Maze M.J., French K.E. et al. Impact of Routine Systematic Polymerase Chain Reaction Testing on Case Finding for Legionnaires' Disease: A Pre-Post Comparison Study. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57(9): 1275–81. doi:10.1093/cid/cit504.
5. NNDSS, Annual Report Writing Group. Australia's notifiable disease status, 2011: annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System. *Communicable diseases intelligence quarterly report.* 2013; 37(4): E313.
6. Yu V.L., Plouffe J.F., Pastoris M.C., Stout J.E., Schousboe M., Widmer A. et al. Distribution of Legionella Species and Serogroups Isolated by Culture in Patients with Sporadic Community-Acquired Legionellosis: An International Collaborative Survey. *J. Infect. Dis.* 2002; 186(1): 127–8. doi:10.1086/341087.
7. Kim M.J., Sohn J.W., Park D.W., Park S.C., Chun B.C. Characterization of a lipoprotein common to Legionella species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' disease. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(7): 2974–9. doi: 10.1128/jcm.41.7.2974-2979.2003.
8. Shim H.K., Kim J.Y., Kim M.J., Sim H.S., Park D.W., Sohn J.W. et al. Legionella lipoprotein activates toll-like receptor 2 and induces cytokine production and expression of costimulatory molecules in peritoneal macrophages. *Exp. Mol. Med.* 2009; 41(10): 687. doi:10.3858/emm.2009.41.10.075.
9. Lee S.Y., Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *Biotechniques.* 1990; 9(6): 676–9.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680–5. doi:10.1038/227680a0.
11. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–54. doi:10.1006/abio.1976.9999.
12. Caligan J.E. *Short protocols in immunology.* Wiley. 2005; 730.
13. Zurochka A.V., Hajdukov S.V., Kudrjavcev I.V., Chereshev V.A. *Flow cytometry in biology. [Protochnaya tsitometriya v biologii].* Ekaterinburg: RIO UB RAS; 2014: 576. (in Russian)
14. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical methods in microbiological studies. [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh].* Medgiz; 1962. (in Russian)
15. Xia Y., Luan P. Methods and DNA constructs for high yield production of polypeptides. Patent WO. 2003100022; 2003.
16. Amu S., Gjertsson I., Tarkowski A., Brisslert M. B-cell CD25 Expression in Murine Primary and Secondary Lymphoid Tissue. *Scand. J. Immunol.* 2006; 64(5): 482–92. doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01832.x.
17. Godlewska R., Wis'niewska K., Pietras Z., Jagusztyn-Krynicka E.K. Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 298(1): 1–11. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01659.x.
18. Shim H.K., Kim J.Y., Kim M.J., Sim H.S., Park D.W., Sohn J.W. et al. Legionella lipoprotein activates toll-like receptor 2 and induces cytokine production and expression of costimulatory molecules in peritoneal macrophages. *Exp. Mol. Med.* 2009; 41(10): 687. doi:10.3858/emm.2009.41.10.075.

Поступила 03.09.17

Принята в печать 16.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.37:547.962.4].012

Фомина Е.Г., Счеслёнок Е.П., Семижон П.А., Школина Т.В., Григорьева Е.Е., Ткачёв С.В., Владыко А.С.

## ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА И АНТИГЕННАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА, ВКЛЮЧАЮЩЕГО CH2-CH3 ДОМЕНЫ FC-ФРАГМЕНТА ИММУНОГЛОБУЛИНА G ЧЕЛОВЕКА

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, 220114, Минск, Беларусь

Получен рекомбинантный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность CH2-CH3 доменов иммуноглобулина G человека, в клетках *Escherichia coli*. Показано, что экспрессируемый белок неравнозначно распределён между двумя фракциями бактериального лизата: растворимой (~30%) и нерастворимой (~70%). Отработаны способы его очистки с помощью металлохеллатной хроматографии (растворимая фракция) и выделение «телец включения». Подтверждена антигенная специфичность полученного рекомбинантного полипептида в иммуноблоттинге. Нарботаны препаративные количества белка, который будет использован в качестве иммуногена для получения иммуноасцитических жидкостей, содержащих моноспецифические поликлональные антитела против IgG человека.

**Ключевые слова:** рекомбинантная плазмидная ДНК; Fc-фрагмент; рекомбинантные CH2-CH3 домены иммуноглобулина G человека; экспрессия рекомбинантных белков; металлохеллатная хроматография.

**Для цитирования:** Фомина Е.Г., Счеслёнок Е.П., Семижон П.А., Школина Т.В., Григорьева Е.Е., Ткачёв С.В., Владыко А.С. Получение, очистка и антигенная специфичность рекомбинантного полипептида, включающего CH2-CH3 домены Fc-фрагмента иммуноглобулина G человека. *Иммунология.* 2018; 39(1): DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-228>

*Fomina E.G., Scheslenok E.P., Semizhon P.A., Shkolina T.V., Grigorieva E.E., Tkachov S.V., Vladiko A.S.*

### PRODUCTION, PURIFICATION AND ANTIGENIC SPECIFICITY OF RECOMBINANT POLYPEPTIDE INCLUDING CH2-CH3 DOMAINS OF FC-FRAGMENT OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN G

State Institution «The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology», Ministry of Health of the Republic of Belarus, 220114, Minsk, Belarus

**Для корреспонденции:** Фомина Елена Георгиевна, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии и иммунодиагностики особо опасных инфекций государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», кандидат биологических наук. E-mail: [feg1@tut.by](mailto:feg1@tut.by)

**Recombinant polypeptide containing the amino acid sequence of the CH2-CH3 domains of human immunoglobulin G was produced in *Escherichia coli*. It was shown that the expressed protein was not equally distributed between two fractions of bacterial lysate: soluble (~ 30%) and insoluble (~ 70%). Methods of protein purification by means of metal-chelate affinity chromatography (soluble fraction) and isolation of "inclusion bodies" have been worked out. The antigenic specificity of the resulting recombinant polypeptide was confirmed in the western blotting analysis. Preparative quantities of protein were produced to be used as an immunogen to obtain immune ascitic fluids containing monospecific polyclonal antibodies against human IgG.**

**Key words:** recombinant plasmid DNA; Fc-fragment; recombinant CH2-CH3 domains of human immunoglobulin G; recombinant protein expression; metal-chelate affinity chromatography.

**For citation:** Fomina E.G., Scheslenok E.P., Semizhon P.A., Shkolina T.V., Grigorieva E.E., Tkachov S.V., Vladyko A.S. Production, purification and antigenic specificity of recombinant polypeptide including CH2-CH3 domains of Fc-fragment of human immunoglobulin G. *Immunologiya*. 2018; 39(1): DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-228-232>

**For correspondence:** Fomina Elena Georgievna, lead researcher of the laboratory of biotechnology and immunodiagnostic of very dangerous infections The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology. E-mail: [feg1@tut.by](mailto:feg1@tut.by)

#### Information about authors:

Fomina E.G., <https://orcid.org/0000-0003-4664-4752>;  
Scheslenok E.P., <https://orcid.org/0000-0001-8143-684X>;  
Semizhon P.A., <https://orcid.org/0000-0001-7986-8299>;  
Shkolina T.V., <https://orcid.org/0000-0003-1135-0981>;  
Grigorieva E.E., <https://orcid.org/0000-0003-3919-0625>;  
Tkachov S.V., <https://orcid.org/0000-0002-5674-4004>;  
Vladyko A.S., <https://orcid.org/0000-0001-6927-5043>

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

**Acknowledgments.** The work was carried out with the financial support of the State Committee for science and technology of the Republic of Belarus in the framework of the task "Development of technology and development of production of anti-lipid immunoglobulins for IgG and IgM people, specific to Fc fragments of heavy chains, for use in diagnostic purposes" sub – program 8 "import – Substituting diagnosticums and biopreparations-2020" of the State program "science-Intensive technologies and technology" for 2016-20 years.

Received 19.06.17  
Accepted 16.08.17

## Введение

Современные успехи в технологии рекомбинантных ДНК дают возможность получать и использовать в терапевтических, диагностических, научных целях отдельные компоненты (цепи, домены, фрагменты) молекулы иммуноглобулина человека. Строение иммуноглобулинов как дискретных белковых доменов, определяющих антигенную специфичность (Fab-фрагмент) и эффекторные функции (Fc-фрагмент), соответственно, является основой для биосинтеза этих субфрагментов как отдельных белков. Ряд из них, таких как Fv, Fab, Fd, scFv и Fc, были экспрессированы с использованием прокариотических систем экспрессии [1]. Демонстрация возможности получения биологически активных фрагментов иммуноглобулинов в простой при использовании дешёвой системе *E. coli* привела к появлению заметного интереса к этим исследованиям и синтезу большого количества «химических» белков, используемых в диагностике и терапии [1]. Тем не менее, для создания целого ряда белков, объединённых общим названием иммуноадгезинов и иммуноконъюгатов, где Fc-фрагмент был использован как «fusion»-партнёр с другими протеинами, предпочтение было отдано эукариотической системе как обеспечивающей процесс гликозилирования, необходимого для активации комплемента [1].

Особый интерес представляет использование Fc-фрагмента и его составных частей в качестве антигена для получения антител как основы иммуноферментных конъюгатов различной специфичности. Известно, что гипериммунные антисыворотки к пулу иммуноглобулинов, которые, как правило, служат сырьём для производства антивидовых иммуноферментных конъюгатов, могут давать широкие перекрёстные реакции из-за наличия перекрёстно реагирующих антигенов у иммуноглобулинов человека и различных видов животных. Использование в качестве конъюгатов меченых антител из антисывороток к отдельным классам иммуноглобулинов также не гарантирует специфичность, прежде всего

из-за присутствия общих антигенных детерминант у разных изоформ иммуноглобулинов одного и того же вида. Решение данной проблемы возможно за счёт изменения дизайна рекомбинантного иммуногена: включение в его состав отдельных линейных эпитопов молекулы иммуноглобулина и элиминирование неиммуногенных сайтов.

Целью настоящего исследования было оценить возможность биосинтеза в клетках *E. coli* рекомбинантного полипептида, содержащего CH2-CH3 домены иммуноглобулина G человека, отработать методы его очистки и оценить антигенную специфичность.

## Материал и методы

Бактериальные штаммы и клеточные линии. Бактериальный штамм XL-blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ΔlacZ(M15)]*) использовали для проведения генно-инженерных работ, штамм BL21(DE3) (*F-ompT hsdS(rB- mB-) gal dcm λ(DE3)*) – для получения рекомбинантного полипептида после индукции изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ). Клеточная линия IM-9 была использована как источник РНК для получения кДНК фрагментов CH2-CH3 доменов иммуноглобулина G человека.

Выделение РНК и ОТ-ПЦР. Выделение РНК проводилось с использованием коммерческого препарата TRI Reagent BD (Sigma) согласно инструкции по применению.

Реакцию обратной транскрипции с последующей ПЦР осуществляли с использованием набора реагентов OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями производителя. Нуклеотидные последовательности, соответствующие выбранным Fc-фрагментам иммуноглобулинов G, анализировались в базах данных GenBank, European Nucleotide Archive, Uniprof.

Праймеры для амплификации CH2-CH3 доменов Fc-фрагмента иммуноглобулина G (Праймтех, Беларусь) имеют следующую нуклеотидную последовательность: IgG1 (5'-CG



CGAAGCTTCCGTGCCAGCAGCAGCT-3'); IgG2 (3'-GCGCTCGAGTTACCCGGAGACAG-5') и содержат сайты узнавания для HindIII и XhoI рестриктаз (отмечены подчеркиванием), которые необходимы для последующего клонирования фрагментов в экспрессирующий вектор pJC40 [2].

Анализ продуктов амплификации проводили в 1,5%-ном агарозном геле. В качестве электродного буфера использовали 1x TBE. Для визуализации анализируемой ДНК гели окрашивали раствором бромистого этидия в конечной концентрации 1,0 мкг/мл.

Конструирование экспрессирующего вектора. В качестве экспрессирующего вектора использовали плазмиду pJC40, обеспечивающую транскрипцию клонированных генов в бактериальных клетках под контролем T7-промотора. Особенностью этой плазмиды является наличие дополнительного фрагмента, кодирующего десять остатков гистидина, которые при трансляции локализируются в N-концевой части рекомбинантного полипептида, что позволяет очистить данный рекомбинантный полипептид с помощью аффинной металлохеллатной хроматографии.

Рестриктию вектора и амплифицированных фрагментов проводили ферментами HindIII и XhoI (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя. Для лигирования использовали фермент T4 ДНК-лигаза того же производителя. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli*, штамм XL-blue.

Трансформацию бактериальных клеток выполняли с использованием CaCl<sub>2</sub>, как описано в руководстве по молекулярному клонированию [3]. Трансформанты высевали на селективную среду, содержащую ампициллин (50 мкг/мл). Клоны, полученные после трансформации лигазной смесью, рассевали штрихом и выделяли из них плазмидную ДНК с использованием коммерческого набора QIAprep Miniprep Kit (Qiagen).

Секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили с помощью Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции по применению. Электрофорез и анализ продуктов реакции выполняли на автоматическом капиллярном ДНК-анализаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы MEGA 4.0. Для поиска последовательностей, гомологичных выявленным фрагментам ДНК, использовали BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Индукция синтеза рекомбинантного белка. Клетки *E. coli*, штамм BL21(DE3), трансформированные плазмидой, выращивали при 37°C в питательной среде LB с ампициллином (50 мкг/мл) при постоянном шейкере до достижения культурой логарифмической фазы роста (OD<sub>600</sub> = 0,3). Добавляли в среду ИПТГ в конечной концентрации 0,4 mM и инкубировали в течение 3 ч. Клетки собирали центрифугированием, анализировали бактериальный лизат электрофорезом в полиакриламидном геле по методу U. Laemmli [4]. Концентрация разделяющего геля составляла 15%, фокусирующего – 6%. Белки разделяли при напряжении 200 В в течение 1 ч. После окончания электрофореза гель окрашивали раствором Кумасси R-250.

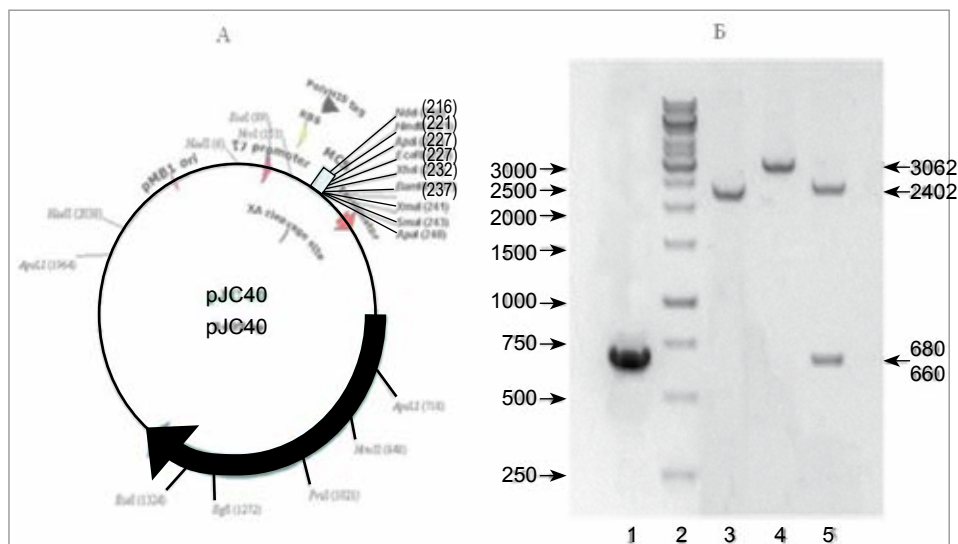


Рис. 1. а – Схематическое изображение плазмидного вектора pJC40; б – рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pJC40/IgG(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) и исходного вектора, п. н.

1 – амплификат, полученный с парой праймеров, ограничивающих CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> область иммуноглобулина G; 2 – маркер молекулярных масс (1kb Ladder, Thermo Scientific, США); 3 – рестриктия вектора pJC40 по HindIII сайту; 4 – рестриктия рекомбинантной плазмиды по HindIII сайту, 5 – рестриктия рекомбинантной плазмиды по HindIII и XhoI сайтам рестрикции.

Аффинную хроматографию проводили на HisBind колонке (Sigma) с иммобилизованными катионами Ni<sup>2+</sup> в денатурирующих условиях (все используемые буферные растворы содержали 6 M мочевины). Для приготовления лизата клетки *E. coli* (100 мл бактериальной культуры) осаждали центрифугированием при 5000 об/мин. в течение 10 мин. Супернатант удаляли, и осадок ресуспендировали в 1 мл холодного 1x "Bind" буфера (5mM имидазол, 0,5M NaCl, 20mM трис-HCl, pH 7,9). Затем клеточную суспензию обрабатывали четырежды ультразвуком при 20 кГц в течение 20 с на льду. После обработки ультразвуком клеточные лизаты *E. coli* выдерживали в течение 1 ч в растворе, содержащем 6 M мочевины, и затем центрифугировали при 6000 об/мин. Супернатант, содержащий растворимые белки, собирали и наносили на колонку со скоростью 15 – 20 мл/час. После нанесения материала колонку отмывали 10 объемами связывающего "Bind" буфера и 5 объемами отмывочного "Wash" буфера (20mM имидазол, 0,5M NaCl, 20mM трис-HCl, pH 7,9). Элюцию связавшихся на колонке рекомбинантных полипептидов проводили 5 объемами элюирующего "Elute" буфера (300 mM имидазол, 0,5M NaCl, 20mM трис-HCl, pH 7,9). Фракции элюции и все остальные фракции хроматографии анализировали электрофорезом в 15% ПААГ. Количество белка рассчитывали относительно маркера молекулярных масс.

Иммуноблоттинг. Для постановки иммунного блоттинга осуществляли электроперенос белков из 15%-ного полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma, размер пор 0,2 мкм) с использованием прибора Criterion Blotter (BioRad, США). Полоски нитроцеллюлозной мембраны с иммобилизованными белками (стрипы) выдерживали 2 ч в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ), pH 7,2, содержащем 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА), для блокирования неспецифических мест связывания. Затем инкубировали стрипы со специфическим конъюгатом в течение 2 ч при постоянном покачивании. Далее отмывали стрипы буфером ФСБ, содержащим 0,05% Твин 20 (ФСБ-Т), 3 раза по 5 мин и погружали в раствор антивидового пероксидазного конъюгата, приготовленного на ФСБ, содержащем 0,05% Твин 20 и 1% БСА (ФСБ-Т-БСА), на 1 ч. После отмывки стрипы помещали в раствор субстрата, в качестве которого

использовали диаминобензидин, растворенный в ФСБ, pH 7,2, содержащем 0,3%-ную перекись водорода. После развития окраски реакцию останавливали, отмывая стрипы трижды дистиллированной водой.

### Результаты и их обсуждение

Несмотря на накопленные знания в области генетики и молекулярной биологии *E. coli*, существует ряд причин неэффективной экспрессии клонированных генов: структурные особенности кодирующей последовательности; стабильность и эффективность трансляции мРНК; некорректный фолдинг молекул полипептида и вследствие этого деградация его протеазами клетки-хозяина; существенные различия в используемых кодонах между «привнесённым» геном и «нативными» *E. coli*; потенциальная токсичность белка для клетки-хозяина. Оценить влияние этих факторов можно только экспериментально. Интересным, на наш взгляд, является возможность экспрессии рекомбинантного CH2-CH3 домена Fc-фрагмента в прокариотической системе как альтернативы целевым иммуноглобулинам для получения антисывороток к IgG человека.

Для биосинтеза рекомбинантного полипептида использовали бактериальный штамм BL21(DE3) и экспрессирующий вектор pJC 40. Этот плазмидный вектор широко используется для эффективной и специфической суперэкспрессии клонированных генов под контролем T7 РНК-полимеразы. Количество экспрессируемого рекомбинантного белка может составлять до 10% от тотального клеточного. Вектор содержит «гистидиновый хвост», который становится составляющей частью N-конца экспрессируемого белка. Наличие последовательности, кодирующей 10 остатков гистидина, позволяет осуществлять очистку рекомбинантного полипептида аффинной металлохеллатной хроматографией.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая CH2-CH3 домены иммуноглобулина класса G, амплифицирована с помощью обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). В качестве матрицы использована РНК, выделенная из клеток лимфобластомы IM-9. ОТ-ПЦР проводили с использованием специфических праймеров, в со-

став которых дополнительно включены сайты для узнавания HindIII и XhoI рестриктазами (согласно наиболее близкой (прототипной) нуклеотидной последовательности, представленной в GenBank (JX292764.2), клонируемый фрагмент не содержит сайтов для распознавания указанными рестриктазами).

При анализе амплификатов в агарозном геле идентифицирован ПЦР-продукт, имеющий размер 680 п. н., который был обработан ферментами рестрикции, очищен и использован для клонирования в полилинкер экспрессирующего вектора. Таким образом, в результате стандартных генно-инженерных манипуляций получена рекомбинантная плазмидная ДНК pJC40/IgG(CH2-CH3), включающая часть Fc-фрагмента тяжёлой цепи иммуноглобулина G человека. На рис. 1 представлены циркулярная карта экспрессирующего вектора и результаты рестрикционного анализа рекомбинантной плазмиды. Результат рестрикции по уникальному сайту показал, что рекомбинантная плазмидная ДНК, содержащая вставку, менее подвижна в агарозном геле, чем исходный вектор, при этом обработка рестриктазами HindIII и XhoI делит её на 2 фрагмента, один из которых аналогичен вектору (2402 п. н.), второй – клонированной вставке (660 п. н.).

Для подтверждения специфичности вставки определена нуклеотидная последовательность клонированного фрагмента методом секвенирования с использованием Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Анализ показал практически полную гомологию нуклеотидов с матричной РНК, кодирующей тяжёлую цепь иммуноглобулина G человека, и выявил миссенс-мутацию (трансверсия C→A в положении 121, приводящая к замене аминокислоты H→N (histidine→asparagine)). Анализ данных литературы показал, что обнаруженная мутация, вероятно, не затрагивает функционально значимых доменов Fc-фрагмента молекулы иммуноглобулина. На рис. 2 представлена аминокислотная последовательность полученного полипептида с выделением перекрывающихся линейных антигенных детерминант, на которые, согласно данным литературы, вырабатываются антитела в ответ на иммунизацию мышей целой молекулой IgG. Большинство из них локализовано в Fc-фрагменте IgG [5].

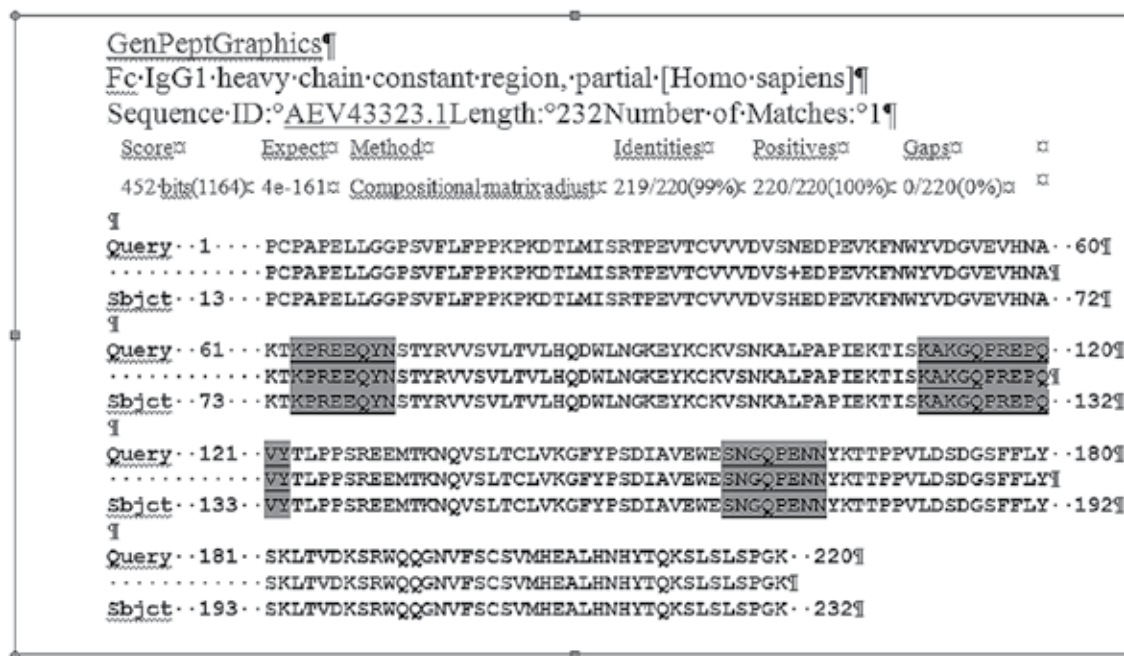


Рис. 2. Аминокислотная последовательность клонированного фрагмента с обозначением линейных эпитопов.

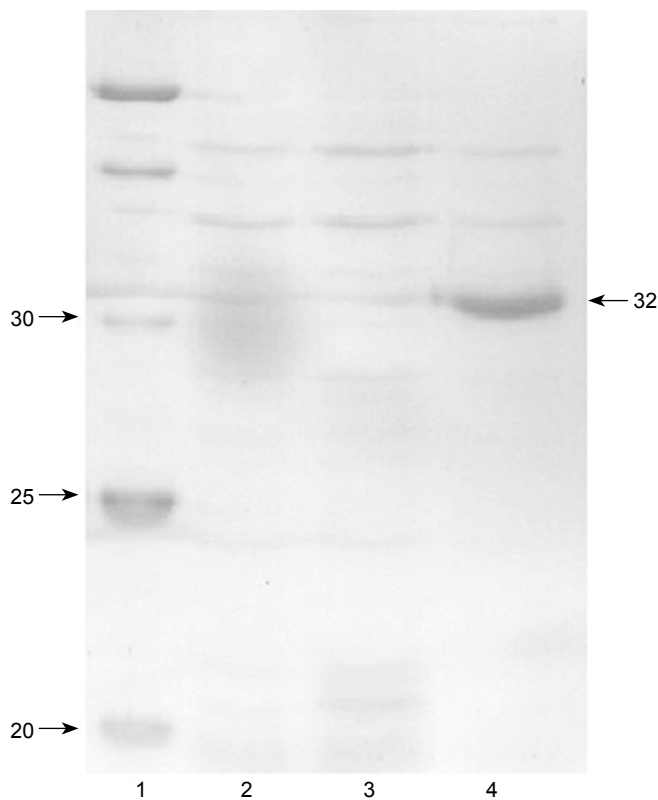


Рис. 3. Оценка экспрессии рекомбинантного полипептида, содержащего аминокислотные последовательности CH2-CH3 участка Fc-фрагмента тяжёлых цепей иммуноглобулина человека класса G, в клетках *E. coli*, штамм BL21(DE3) электрофорезом в ПААГ, кДа.

1 – маркер молекулярных масс (Thermo Scientific, США); 2, 3 – лизат бактериальных клеток после индукции ИПТГ; 4 – лизат бактериальных клеток после индукции ИПТГ.

Картирование эпитопов моноклональными антителами (МАТ, pepscan analysis) выявило последовательности 290-KPREE-294 и 338-KAKGQPR-344, расположенные соответственно в CH2 домене и N-регионе CH3 домена и присутствующие у всех четырех классов IgG [6]. Анализ *in silico*, проведённый в работе [7], показал, что аминокислотный фрагмент 290-KPREEQYN-297 обладает выраженной гидрофильностью и, вероятно, является наиболее антигенным участком CH2 домена. Также известно, что участок 383-SNGQPENN-390 выявляется пан-специфичными МАТ у всех подклассов IgG [8].

Для экспрессии рекомбинантного белка полученной гибридной плазмидой pJC40IgG(CH2-CH3) трансформировали бактериальную культуру компетентных клеток *E. coli*, штамм BL21(DE3). Эффективность экспрессии оценивали по интенсивности соответствующих зон при электрофорезе в полиакриламидном геле (теоретически рассчитанная молекулярная масса получаемого белка составляла 32 кДа). Оптимизация условий получения рекомбинантного полипептида по таким параметрам, как температура культивирования, количество индуктора в среде и время индукции, позволила достигнуть высокой продукции белка. Максимальное количество рекомбинантного белка экспрессировалось при внесении в среду культивирования ИПТГ в конечной концентрации 0,4 mM в момент достижения клеточной культурой оптической плотности OD600 = 0,3 и дальнейшей инкубации в течение 3 ч.

В лизате продуцента наблюдалось присутствие мажорного белкового продукта, размер которого по данным элек-

трофореза составлял 32 кДа, что совпадало с теоретически рассчитанной массой ожидаемого рекомбинантного полипептида (рис. 3).

Известно, что некоторые рекомбинантные белки при экспрессии их в гетерологичных системах способны на неспецифическую агрегацию (формирование так называемых «телец включения»). Интересно отметить, что анализ «грубых лизатов» бактерий-продуцентов после обработки ультразвуком и осаждения центрифугированием показал, что белок с молекулярной массой 32 кДа определяется одновременно в двух фракциях: растворимой и нерастворимой, причём основная часть полипептида (70%) присутствует в виде «телец включения» (рис. 4, дорожки 2 и 4).

Тем не менее, представлялось интересным определить, какое количество белка можно элюировать из бактериального лизата, используя металлохеллатную хроматографию, основанную на взаимодействии N-концевых гистидиновых остатков рекомбинантного полипептида с иммобилизованными на матриксе ионами никеля.

Аффинную хроматографию проводили в денатурирующих условиях, при которых полигистидиновый кластер полностью экспонирован на поверхности молекулы, что приводит к наи-

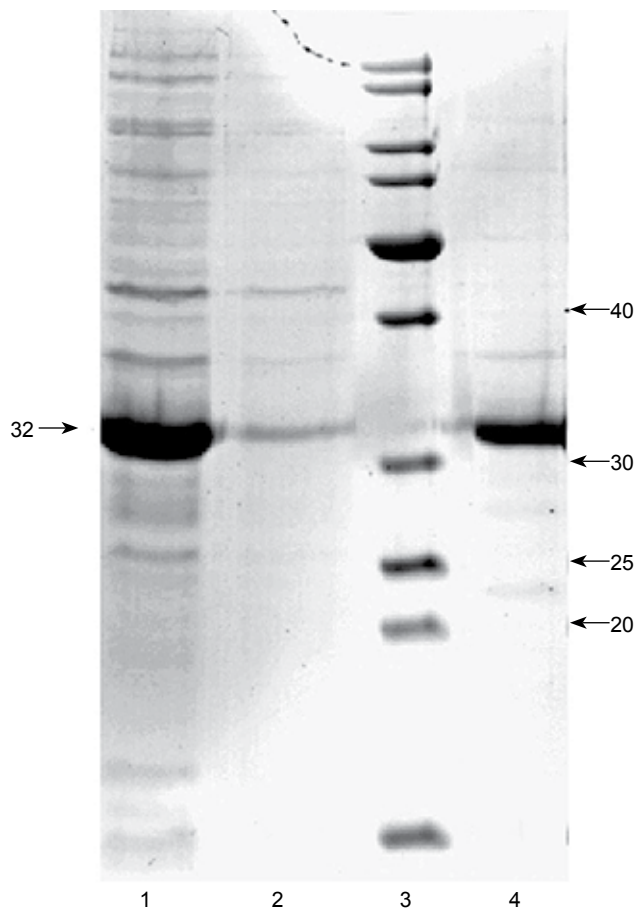


Рис. 4. Оценка распределения рекомбинантного белка в растворимой и нерастворимой (в виде «телец включения») фракциях бактериального лизата, кДа.

1 – «грубый лизат» бактериальной биомассы продуцента; 2 – бактериальные клетки, обработанные ультразвуком; растворимая фракция (надосадок); 3 – маркер молекулярных масс (Thermo Scientific, США); 4 – клетки продуцента после обработки ультразвуком и осаждения; нерастворимая фракция (осадок); окрашивание Кумасси R-250.

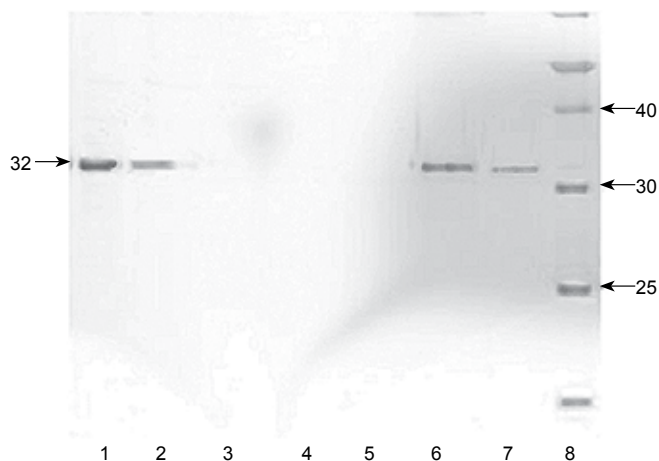


Рис. 5. Электрофоретический анализ фракций металлохеллатной хроматографии рекомбинантного полипептида, включающего участки иммуноглобулина G человека, кДа.

1 – 3 – лизат бактерий-продуцентов до обработки (1), после обработки ультразвуком и мочевиной (2), после нанесения на колонку (3); 4, 5 – фракции отмывки колонки после сорбции; 6, 7 – фракции элюции; 8 – маркер молекулярных масс (Thermo Scientific, США); окрашивание Кумасси R-250.

более эффективному специфическому связыванию его с адсорбентом и высокой степенью очистки полипептида. С целью дезинтеграции полипептидов клеточную суспензию обрабатывали четырежды ультразвуком при 20 кГц в течение 20 с на льду и выдерживали в течение 1 ч в растворе с 6М мочевиной. На рис. 5 представлен электрофоретический анализ фракций металлохеллатной хроматографии рекомбинантного полипептида.

Из рис. 5 видно, что фракции элюции (дорожки 6 и 7) содержат белок, соответствующий рассчитанной молекулярной массе (32 кДа) рекомбинантного полипептида. Незначительное количество фоновых клеточных белков во фракциях элюции позволяет сделать вывод о высокой степени очистки белка (~90%).

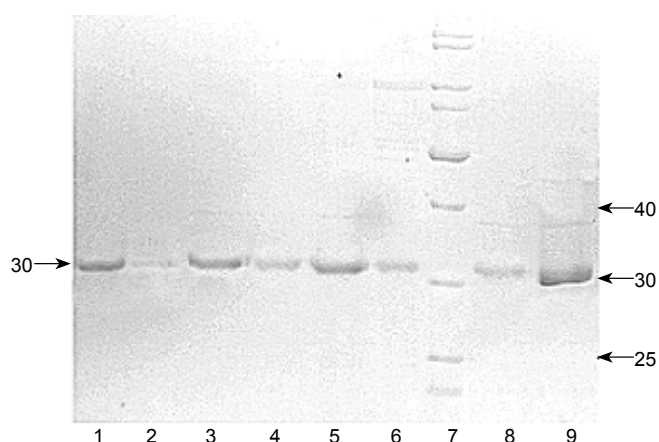


Рис. 6. Очистка «тельца включения» рекомбинантного полипептида, кДа.

1 – 6 – фракции (осадок, надосадок) после последовательной обработки ультразвуком и центрифугирования; 7 – маркер молекулярных масс (Thermo Scientific, США); 8 – растворимая фракция; 9 – «тельца включения» (после 4-кратной обработки лизата ультразвуком и осаждения центрифугированием); окрашивание Кумасси R-250.

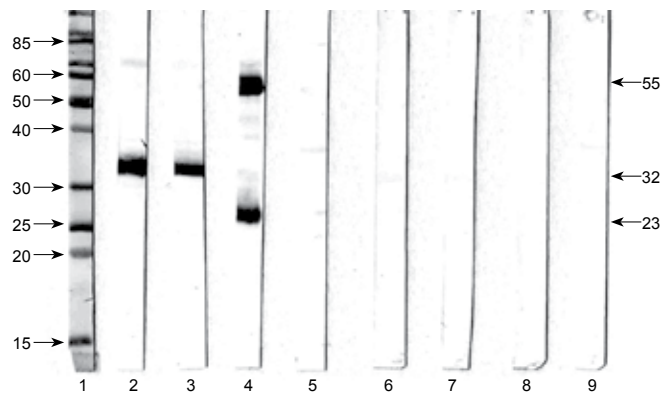


Рис. 7. Оценка антигенной специфичности рекомбинантного полипептида в иммуноблоттинге, кДа.

1 – маркер молекулярных масс (Thermo Scientific, США); 2, 6 – лизат бактериальных клеток продуцента; 3, 7 – «тельца включения» рекомбинантного полипептида; 4, 8 – коммерческий препарат цельных иммуноглобулинов G; 5, 9 – лизат клеток BL21(DE3); нитроцеллюлозные мембраны 2 – 5 инкубированы с анти-G конъюгатом, мембраны 6 – 9 – с анти-M антителами, меченными пероксидазой хрена.

Поскольку растворимая фракция бактериального лизата включает незначительную часть рекомбинантного полипептида (см. рис. 5, дорожка 2), что не позволяет получать его в препаративных количествах с помощью металлохеллатной хроматографии, для наработки очищенного препарата была использована нерастворимая фракция биомассы бактерий-продуцентов. Очистку рекомбинантного полипептида в виде «тельца включения» проводили поэтапным многократным (не менее четырёх раз) «озвучиванием» материала при 20 кГц с последующим центрифугированием. В результате проведенных исследований получен очищенный рекомбинантный полипептид в препаративных количествах (1500 мкг в расчёте на 100 мл исходной культуры бактерий-продуцентов) (рис. 6).

Так как выделение «тельца включения» рекомбинантной иммуноглобулиновой фракции не является специфическим методом очистки, то было принципиально важно оценить антигенную специфичность очищенного нерастворимого полипептида в иммуноблоттинге. В качестве антигенов, иммобилизованных на мембране, использовали: лизат бактерий-продуцентов после индукции ИПТГ, очищенные «тельца включения», коммерческий препарат иммуноглобулина G и лизированные клетки BL21(DE3) (отрицательный контроль) (конъюгатами служили антитела к иммуноглобулинам G и M человека, меченные пероксидазой хрена). Данные представлены на рис. 7. Полосы специфической преципитации наблюдаются в области 32 кДа только в препаратах, содержащих лизат бактерий-продуцентов (см. рис. 7, дорожка 2) и очищенные «тельца включения» (см. рис. 7, дорожка 3), а также в зонах 23 и 55 кДа – препарата коммерческих иммуноглобулинов G (см. рис. 7, дорожка 4), инкубированных с конъюгатом, содержащим анти-G антитела. Рекомбинантный полипептид не взаимодействует с анти-M антителами (см. рис. 7, дорожки 6 – 9), что является подтверждением наличия в полученном полипептиде линейных эпитопов, специфически взаимодействующих исключительно с антителами против иммуноглобулинов G человека.

## Заключение

В статье показана возможность получения препаративных количеств рекомбинантного полипептида, содержащего CH2-CH3 участка Fc-фрагмента тяжёлых цепей иммуноглобулина человека класса G, в клетках *E. coli* и доказана его специфичность. Полученный препарат может быть использован в качестве антигена для иммунизации животных (ла-

бораторные мыши) с целью получения иммуноасцитических жидкостей, содержащих моноспецифические поликлональные антитела против IgG человека.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь в рамках выполнения задания «Разработка технологии и освоение производства препарата антивидовых иммуноглобулинов к IgG и IgM человека, специфичных к Fc-фрагментам тяжёлых цепей, для использования в диагностических целях» подпрограммы 8 «Импортозамещающие диагностикумы и биопрепараты – 2020» Государственной программы «Научно-технологические и техника» на 2016 – 2020 годы.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Rönmark J., Hansson M., Nguyen T., Uhlén M., Robert A., Ståhl S. et al. Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*. *J. Immunol. Methods*. 2002; 261(1-2): 199–211.

2. Clos J., Brandau S. pJC20 and pJC40 – two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 1994; 5: 133–7.
3. Sambrook J., Russell D. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* : in 3 vol. 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
4. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–5.
5. Novotny J., Handschumacher M., Haber E. Location of antigenic epitopes on antibody molecules. *J. Mol. Biol.* 1986; 189: 715–21.
6. Nelson P., Westwood O., Soltys A. et al. Characterization of epitopes of pan-IgG/anti-G3m(u) and anti-Fc monoclonal antibodies. *Immunol. Lett.* 2003; 88: 77–83.
7. Hajighasemi F., Shokri F. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies recognizing multiple subclasses of human IgG. *Avicenna. J. Med. Biotech.* 2010; 2(1): 37–45.
8. Nelson N., Westwood O., Jefferis R. et al. Characterization of anti-IgG monoclonal antibody A57H by epitope mapping. *Biochem. Soc. Transact.* 1997; 25 (2): 373.

Поступила 19.06.17  
Принята в печать 16.08.17

## ОБЗОРЫ

© ВЛАДИМИРСКИЙ М.А., 2018

УДК 616-002.5-053.2-092:612.017.11-078.33

Владимирский М.А.

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ. ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ.

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Министерства здравоохранения РФ, 119991, Москва; НИИ фтизиопульмонологии, 127994, Москва, Россия

Величина распространения латентной туберкулёзной инфекции – 2,3 млрд людей. Чрезвычайное значение для человечества – ликвидировать туберкулёз как распространённое заболевание к 2035 г. Для детского населения, в силу ограниченности применения методов лучевой диагностики, основными массовыми методами на сегодня являются иммунологические тесты определения туберкулёзной инфекции. Наиболее распространённый метод кожной туберкулиновой пробы (р. Манту) в связи с её недостаточной специфичностью имеет существенные недостатки, особенно в странах, использующих массовую БЦЖ-вакцинацию. Относительно новые методы с использованием специфических рекомбинантных белков МБТ как в тестах *in vitro*, так и в новых кожных тестах позволяют значительно более точно определить туберкулёзное инфицирование в латентной или активной форме, однако они менее чувствительны по сравнению с пробой Манту, что требует развития этих методов с введением новых дополнительных специфических антигенов. Несомненно, что разработка новых методов дифференцирования активной и латентной туберкулёзной инфекции или прогностических методов перехода латентной инфекции к прогрессирующему в активную стадию является одной из наиболее актуальных задач в борьбе с туберкулёзом.

В настоящем обзоре демонстрируются также новые методы исследований клеток крови и образцов плазмы крови, основанные на применении проточной цитофлуориметрии с детекцией антиген-специфичных Т-клеток, продуцирующих интерферон-гамма и фактор некроза опухолей альфа, специфических Т-клеточных маркеров, а также использовании комбинаций определения различных белковых факторов, которые имеют перспективу определения признаков активной туберкулёзной инфекции. Однако эти методы пока трудозатратны и дорогостоящи. Развиваются новые перспективные подходы к определению специфических антител в сыворотке крови, основанные на использовании новых генно-инженерных продуктов. При развитии ускоренных методов анализа экспрессии специфических генов в клетках крови это направление также имеет перспективу внедрения в практику здравоохранения. Обзор проведён по базам данных Medline (PubMed) и РИНЦ.

Ключевые слова: туберкулёзная инфекция; кожные тесты; иммунодиагностика; цитокины; антитела; экспрессия генов.

Для корреспонденции: Владимирский Михаил Александрович, д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией иммунологических исследований и молекулярной диагностики туберкулеза, E-mail: mvladimirskij@mail.ru

Для цитирования: Владимирский М.А. Иммунологические методы диагностики туберкулёзной инфекции у детей и подростков. проблемы и перспективы. *Иммунология*. 2018; 39(1): DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-228-232>

*Vladimirsky M.A.*

#### IMMUNOLOGICAL METHODS FOR TB INFECTION DIAGNOSTICS IN CHILDREN AND ADOLESCENTS. CHALLENGES AND OPPORTUNITIES.

I.M. Sechenovs First Moscow state medical university Ministry of Health. Research Phthisiopulmonology Institute 127994 Moscow, Russia

The spread of a latent tuberculosis infection - 2.3 billion people - is of emergency importance for the global task of mankind - to eliminate tuberculosis as a common disease by 2035. For children, due to the limited use of the radiological diagnosis methods, the main methods today are the immunological tests for the detection of tuberculous infection. The most common used method is the tuberculin skin test (Mantoux test) due to its lack of specificity has significant drawbacks, especially in countries using mass BCG vaccination. Relatively new methods using specific recombinant MTB proteins, both in vitro tests and in new skin tests, allow to determine tuberculosis infection in latent or active form much more specifically, however, they are somewhat less sensitive, in comparison with the Mantoux test, which requires development of these methods with the introduction of new additional specific antigens. It is obvious that crucial task is the development of new methods for distinguishing active and latent tuberculosis infection or being able to predict progression from latent to active TB diseases both in children and in adult population. The article shows new diagnostic techniques of blood cells and plasma samples based on the use of flow cytometry with the detection of antigen-specific T cells producing interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha, T cells specific markers, as well as using combinations of the identification of various protein factors that have the prospect to determining active tuberculosis infection signs. However, these methods are still time-consuming and expensive. Currently, some new promising approaches based on the using of new genetically engineered products are being developed to determine specific antibodies in the blood serum. With the development of accelerated methods for the analysis of the expression of specific genes in blood cells, this direction also has the prospect of introducing into healthcare practice.

**Key words.** *TB-infection, skin tests, immunodiagnostics, cytokines, antibodies, gene expression.*

**For citation:** *Vladimirsky M.A.* Immunological methods for tb infection diagnostics in children and adolescents. Challenges and opportunities. *Immunologiya*. 2018; 39(1): DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-228-232>

**For correspondence:** *Vladimirsky Mikhail Aleksandrovich*, chief of the laboratory immunological studies and molecular diagnostic of tuberculosis. Moscow, Russia, e-mail: [mvladimirskij@mail.ru](mailto:mvladimirskij@mail.ru)

**Information about author:** *Vladimirsky M.A.* <http://orcid.org/0000-0002-2724-5791>

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

**Acknowledgments.** *The study had no sponsorship.*

Received 06.07.17

Accepted 16.08.17

Проблема диагностики туберкулёзной инфекции у детей в целом состоит из проблемы своевременного определения активной туберкулёзной инфекции и проблемы своевременной диагностики латентной туберкулёзной инфекции и её дифференцирования от активной инфекции. Обе эти задачи являются приоритетными для Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в целях достижения ликвидации туберкулёза как распространённого заболевания [1].

По оценкам ВОЗ, число людей с латентной туберкулёзной инфекцией в мире составляет около 2,3 млрд, т. е. около трети населения Земли. Естественно, что эта глобальная проблема требует исследования природы латентной инфекции, изучения её диагностики, дифференцирования от активной туберкулёзной инфекции, поиска необходимого лечения латентной инфекции, а также выявления её связи с развитием активного туберкулёза.

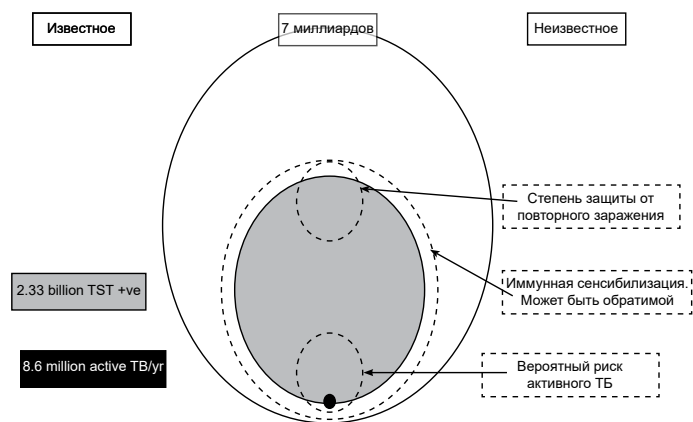
Современные требования ВОЗ настоятельно рекомендуют для стран с умеренно высоким уровнем заболеваемости туберкулёзом (менее 100 случаев на 100 тыс. населения) проводить лечение латентной туберкулёзной инфекции [2, 3] преимущественно в группах высокого риска этого заболевания: ВИЧ-инфицированным; лицам, контактирующим с больными туберкулёзом; получающим терапию, связанную с использованием лекарств, ингибирующих фактор некроза опухолей (один из главных факторов иммунной защиты от туберкулёзной инфекции); лицам, находящимся на хроническом гемодиализе; больным силикозом, бездомным и лицам, употребляющим наркотики. Рекомендации ВОЗ по лечению латентной туберкулёзной инфекции требуют серьёзного и длительного применения противотубер-

кулёзных препаратов: 6 – 9 месяцев лечения изониазидом или 3 – 4 месяца лечения изониазидом и рифампицином.

Проблема диагностики туберкулёзной инфекции у детей и подростков имеет важные особенности в связи с определённым ограничением использования рентгеновских методов исследования, в том числе с неопределённостью рентгенологической картины при туберкулёзе внутригрудных лимфоузлов и ограничением применения микробиологических методов диагностики из-за отсутствия мокроты, которую дети часто заглатывают. При этом точное определение туберкулёзного инфицирования в связи с проведением химиопрофилактических курсов в этой возрастной категории требует особого отношения к качеству диагностических исследований.

Ниже представлен рисунок из статьи Esmail H. и соавторов [4] «Вызов латентного туберкулеза».

После открытия Робертом Кохом в 1890 г. туберкулина – фильтрата культуры микобактерий туберкулёза (МБТ) – в 1907 г. австрийский педиатр Клеменс Пирке обосновал специфичность туберкулиновой пробы и ввёл в медицину скарификационную кожную пробу Пирке. Через год Шарль Манту предложил применять туберкулин внутрикожно с диагностической целью. Этот метод – проба Манту – получил всеобщее признание и массовое применение для диагностики туберкулёзного инфицирования вплоть до начала 2000-х гг., когда были проведены исследования иммунного ответа клеток крови на специфические рекомбинантные белки RD1 области генома *M.tuberculosis*, – ESAT-6 (ранний секретиремый антиген молекулярной массой 6 кд и CFP-10 (белок культурального фильтрата молекулярной массой 10 кда) [5,



Текст слева: 2,3 млрд людей с латентной туберкулезной инфекцией из 7 млрд населения Земли, 8,6 млн (на рис. обозначено точкой), из которых ежегодно заболевают туберкулезом. Текст справа, снизу вверх: вероятная численность риска активного туберкулеза; иммунная сенсibilизация, включающая латентную инфекцию, которая может быть обратимой; вероятная численность с иммунной защитой от реинфекции из числа лиц с иммунной сенсibilизацией при латентной инфекции

6]. Специфический иммунный ответ на эти антигены *in vitro* определяется по уровню интерферона-гамма (ИФН- $\gamma$ ), продуцируемого в течение 20 – 24-часовой инкубации при 370 С образцов цельной крови – interferon gamma release assay (IGRA). Количественное определение ИФН- $\gamma$  в образцах надосадочной плазмы крови измеряют с помощью количественного иммуноферментного анализа в соответствии с калибровочной кривой. Специфичность иммунного ответа клеток крови, в частности, сенсibilизированных CD4+ и CD8+ лимфоцитов, в отличие от здоровых БЦЖ-вакцинированных лиц, была многократно подтверждена в различных публикациях, после чего разработанные на основе определения продукции ИФН- $\gamma$  - interferon-gamma- release assay (IGRA) фирмой “Cellestis Ltd.” (Австралия) тест-системы “QuantiFeron-TBGold” и “QuantiFeron-TB Gold in Tube” (QFT – квантифероновый тест) получили широкое применение в различных странах. В этой тест-системе критерием положительного результата является определение ИФН- $\gamma$  в пробирке, содержащей МБТ специфические рекомбинантные белки ESAT-6 и CFP-10 не менее 0,35 международных единиц (МЕ); в качестве положительного контроля используется неспецифический митоген, индуцирующий около 2,5 – 3,5 МЕ. В нашей стране в 2011 г. была разработана [7] и зарегистрирована Росздравнадзором РФ подобная отечественная тест-система «Тубинферон» (регистр. удостоверение № ФСР 2011/11269), предназначенная для определения туберкулезного инфицирования *in vitro*. В российской тест-системе «Тубинферон» в качестве положительного контроля, учитывая массовое применение БЦЖ-вакцинации, используется туберкулин PPD. Наряду с тест-системой “QuantiFeron-TB Gold in Tube” на основе IGRA также была разработана и внедрена тест-система “T-SPOT.TB”. В этой системе результат иммунного ответа клеток крови после инкубации с антигенами анализируют по числу мононуклеаров, синтезирующих интерферон гамма и связывающихся в ходе реакции к соответствующим антителом, фиксированным на поверхности чашки.

В дальнейшем было проведено и опубликовано огромное число работ, посвященных определению специфического иммунного ответа *in vitro* как у больных туберкулезом (активная инфекция), так и для определения латентной туберкулезной инфекции, в том числе при сравнении использования специфических рекомбинантных белков и традиционного туберкулина. Особое внимание уделялось эффективности по крите-

риям «чувствительность» и «специфичность» при массовом скрининге туберкулезной инфекции с помощью технологии «QuantiFeron-TB Gold in Tube» (QFT) в сравнении с традиционным кожным тестом (р. Манту) и сравнительной экономической эффективности по критерию «стоимость – эффективность». Обзор, содержащий мета-анализ E. Chiappini и соавт. [8], посвященный применению тестов IGRA в диагностике туберкулезной инфекции у детей, отмечается, что специфичность тестов IGRA, и в частности QFT, выше, чем кожный туберкулиновый тест: при определении активного туберкулеза его чувствительность в некоторых работах достигает до 93%, однако положительный результат этого теста не исключает активную туберкулезную инфекцию. В этом обзоре отмечается также, что комбинация кожного туберкулинового теста и QFT повышает диагностическую чувствительность при определении туберкулезной инфекции. Работы, в том числе и с мета-анализом, с большим числом публикаций по сравнительному исследованию эффективности обоих тестов с критерием «стоимость – эффективность» были проведены как в странах экономически развитых, так и в странах с ограниченными ресурсами.

В Великобритании Pollock L. et al. [9] также были сделаны выводы, что тесты на основе индукции интерферона-гамма существенно более специфичны, чем туберкулиновая проба, однако они не позволяют дифференцировать текущую или прошлую туберкулезную инфекцию и рекомендуют комбинировать оба теста. В другом исследовании в этой же стране [10] по результатам анализа «стоимости – эффективности» на основе расчёта стоимости предотвращения случая заболевания туберкулезом (38 тыс. фунтов) предлагается стратегия двойного скрининга: туберкулиновая проба с последующим QFT.

В Германии [11] был проведён мета-анализ – обзор по 75 публикациям, посвящённым применению скрининговых методов диагностики туберкулезной инфекции, из которых 13 работ посвящены проблеме «стоимость – эффективность» двух тестов: кожная туберкулиновая проба и QFT *in vitro*. По общей оценке было рекомендовано последовательное использование двух тестов.

В Бразилии [12] также при проведении скрининга туберкулезной инфекции с использованием двух тестов с анализом стоимости предотвращённого случая заболеваемости туберкулезом было установлено, что эффективным является использование последовательно туберкулинового и специфического QFT-теста. При этом стоимость предотвращённого случая наименьшая – 16 тыс. долларов.

В Польше, где проводится БЦЖ-вакцинирование, было проведено сравнительное исследование более 700 лиц из групп риска: бездомные, семейные контакты с больным туберкулезом и периодические контакты с больными туберкулезом [13]. Туберкулиновая проба была положительной в 56, 47 и 43% случаев, соответственно; тогда как QFT – в 36,7, 27 и 23% случаев, соответственно. Был сделан вывод, что лучший предиктор вероятной туберкулезной инфекции – это использование двух тестов.

В Индии [14] при сравнении QFT и туберкулинового кожного теста у 362 детей, больных туберкулезом лёгких с микробиологическим подтверждением в 35% случаев, туберкулиновая проба была положительной в 93%, а QFT – в 82% случаев. При этом, по данным авторов, наличие БЦЖ-вакцинации не влияло на результаты исследования.

В последней работе 2017 г. [15] мета-анализ работ, посвящённых проспективному изучению значения результатов иммунологических тестов на основе QFT, T-Spot.TB и туберкулиновой пробы для прогноза развития активной туберкулезной инфекции в группах детей, лиц с иммунокомпрометированным статусом и иммигрантов, прибывших из стран с высоким бременем туберкулеза, не позволил сделать определённого вывода о преимуществе какого-либо метода.

В 2009 г. в России на основе использования рекомбинантных белков ESAT-6 и CFP-10 был разработан новый кожный тест – «Диаскинтест», который также был предложен для диагностики туберкулёзной инфекции [16]. Учитывая низкую стоимость такого теста, по сравнению с тестами *in vitro*, он был рекомендован органами здравоохранения для широкого применения и прежде всего для массовой иммунодиагностики туберкулёзной инфекции у детей и подростков. Этот метод, благодаря высокой специфичности используемых антигенов, позволил фтизиопедиатрам в регионах, где проводились широкие испытания Диаскинтеста многократно сократить число детей, взятых на учёт для диспансерного наблюдения и проведения специфического химиопрофилактического лечения с помощью изониазида и рифампицина [17]. Разумеется, столь существенное сокращение необоснованного назначения химиопрофилактического лечения является очень позитивным. При локальных формах активного туберкулеза лёгких ДСТ был положительным в 83,8%, однако он был отрицательным при малых формах и в стадии рассасывания процесса [18]. Ставицкая Н.В. и коллеги [19] при исследовании 5,3 тыс. детей, состоявших на 4-й группе диспансерного учёта, отметили 35,4% положительных результатов ДСТ у детей при положительной пробе Манту 10 – 17 мм. При этом отрицательный ДСТ был отмечен у нескольких детей с активным туберкулёзом лёгких. В некоторых российских публикациях высказывалось предположение, что положительная проба ДСТ у детей и подростков свидетельствует об активном размножении микобактерий туберкулеза у детей [18]. Однако положительный результат ДСТ как и результаты тестов «QuantiFeron-TB Gold in Tube» (QFT) и «T.SPOT.TB» не являются точным критерием активности туберкулёзной инфекции. При обследовании пульмонологических пациентов взрослого возраста [20] с использованием QFT чувствительность этого теста у больных туберкулёзом составила 77%, в том числе у больных, выделяющих микобактерии туберкулеза (МБТ) – 78%, а без выделения МБТ – 73%; специфичность исследования – 86%; у больных с неспецифическими заболеваниями лёгких число положительных результатов – 30%.

В 2016 г. была опубликована первая работа по результатам испытаний специфического кожного теста «С-ТБ» с использованием белков ESAT-6-CFP-10 [21], т. е. аналога российского кожного теста «Диаскинтест». Работа выполнена в Дании специалистами двух институтов по вопросам иммунологии и инфекционным болезням в сотрудничестве со специалистами по туберкулёзу из Кейптауна (Ю. Африка). Испытания кожного теста проводились на материалах больных туберкулёзом лёгких из Ю. Африки. Исследование было проведено двойным слепым методом на материале 253 больных туберкулёзом, из которых 100 больных имели сочетанную ВИЧ-инфекцию. Больных туберкулёзом без ВИЧ инфекции (153 чел.) в более 80% случаев выделяли МБТ, определяемые по микроскопии мазка, 100 пациентов при сочетании туберкулеза и ВИЧ-инфекции были положительными по присутствию МБ в мазках мокроты в 60% случаев. Тест С-ТБ считали положительным при наличии папулы от 5 мм; кожный туберкулиновый тест (р. Манту) считали положительной при папуле от 10 мм. Кроме того, всем пациентам проводили тест с образцами крови *in vitro* «QuantiFeronTBGold InTube» (QFT). Чувствительность теста С-ТБ среди больных туберкулёзом без ВИЧ-инфекции составила 76,7%, чувствительность туберкулинового кожного теста (10 мм) – 94,5%, чувствительность QFT – 76,7%. Среди больных туберкулёзом в сочетании с ВИЧ-инфекцией положительных по тесту С-ТБ оказалось 69,5%, по туберкулиновой пробе – 82,1%, QFT – 72,6%. Снижение чувствительности теста С-ТБ наблюдали при снижении CD4 положительных Т-лимфоцитов ниже 100 кл/мл; для QFT – при ниже 200 кл/мл.

Результаты этого исследования, проведённого по строгим

стандартам, продемонстрировали более высокую чувствительность традиционной пробы Манту. При этом уровень чувствительности С-ТБ совпадал с уровнем чувствительности теста QFT.

В последнее время IGRA-технология с определением интерферона-гамма в образцах плазмы крови *in vitro* претерпевает изменения. С целью повышения чувствительности исследования разработан усовершенствованный набор реагентов «QuantiFeronTB Gold.Plus», в который были включены 6 новых пептидов в качестве антигенных индукторов интерферона гамма в Т-лимфоцитах CD8+. В новом наборе образцы крови инкубируются в отдельных пробах с антигенами, которые индуцируют ИФН- $\gamma$  в CD4+Т-лимфоцитах и с антигенами, индуцирующими ИФН- $\gamma$  в Т-лимфоцитах CD8+. Такое решение, по данным разработчиков, авторов публикаций, несколько повышает чувствительность тестов до около 85% [22, 23].

Однако неэффективность указанных иммунологических методов и тестов в отношении предсказательности (предиктивности) вероятного развития активного туберкулеза остаётся важной проблемой в диагностике туберкулёзной инфекции у детей и подростков, тем более с учётом неопределённой целесообразности назначения химиопрофилактических курсов противотуберкулёзных препаратов даже по сокращённой формуле.

В первых же исследованиях, несмотря на принадлежность указанных специфичных рекомбинантных белков к возможным факторам вирулентности МБТ, была показана невозможность дифференцирования активной и латентной туберкулёзной инфекции. Учитывая, что большое число детей обнаружено с признаками первичного туберкулёзного инфицирования, трудности применения традиционных микробиологических и рентгенологических методов определения активного туберкулеза для этой категории пациентов, проблема дифференцирования активной и латентной туберкулёзной инфекции остаётся чрезвычайно актуальной. Эта научная проблема признана мировой научной общественностью в качестве одного из важнейших приоритетов развития глобальной борьбы с туберкулёзом. В связи с этим большая группа учёных была сформирована под эгидой Национального института здоровья (США) для активизации усилий с целью разработки эффективных методов диагностики активной туберкулёзной инфекции у детей и подростков, в том числе для дифференцирования латентной и активной инфекции. [24].

За последнее десятилетие был проведён широкий поиск различных иммунологических критериев определения активной туберкулёзной инфекции. Спектр исследований состоял в направлении анализа различных белковых факторов иммунного ответа в образцах надосадочной плазмы после инкубации клеток крови с антигенами МБТ с одновременным мультипараметрическим определением фактора некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ), спектра интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10), ИФН- $\gamma$  индуцированного в макрофагах неоптерина и белка IP-10; определения в сыворотке крови С-реактивного белка, сывороточного амилоида, воспалительного белка макрофагов MIP-1B, B2 микроглобулина [25], а также исследования по экспрессии факторов иммунного ответа непосредственно на поверхности иммунных лимфоцитов и их субпопуляционного анализа с помощью проточной цитофлуориметрии [26]. При исследовании с помощью проточной цитофлуориметрии было показано преимущество присутствия цитокинов ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  на поверхности CD4 и CD8 Т-лимфоцитов, в том числе в клетках CD8, содержащих оба цитокина, у пациентов с активной туберкулёзной инфекцией, что значительно отличалось от пациентов с латентной формой инфекции или от пациентов с нетуберкулёзными заболеваниями (собственные наблюдения) [27, 28]. Ряд перспективных исследований в этом направлении связан с определением субпопуляции эффекторных МБТ специфичных Т-лимфоцитов CD4, маркированных как CD 27low [29].



Показано присутствие этих клеток в очагах туберкулёзного воспаления лёгочной ткани как в экспериментальных работах, так и в клинических образцах больных туберкулёзом [30]. Эта субпопуляция Т-лимфоцитов рассматривается в качестве одного из критериев определения активной туберкулёзной инфекции. Исследование комбинаций различных факторов иммунного ответа, анализируемых в образцах плазмы крови после индукции антигенами МБТ с помощью многопараметрического анализа каждой пробы (технология Limiplex), также позволяет провести определённую дискриминацию латентной и активной туберкулёзной инфекции [30, 31]. Наиболее перспективными представляются IP-10, MIP-1B, IL6, CRP, неоптерин [32].

Очень интересные новые данные получены недавно при использовании более длительной инкубации клеток периферической крови с антигенами МБТ: вместо 24 ч – 72 ч с последующим определением в образцах плазмы ИФН- $\gamma$  и IL2 (интерлейкина 2) [33]. В этом случае продукция IL2 выше при латентной инфекции, чем при активной, тогда как интерферон-гамма выше при активной инфекции. Используя соотношение IL2/IFN-, авторы показали эффективность дискриминации активной и латентной туберкулёзной инфекции с чувствительностью 90,8% и специфичностью 97,7%. Разумеется, такие данные нуждаются в подтверждающих исследованиях.

В последние годы также возобновился интерес к определению специфических антител в образцах сыворотки крови при использовании всё более новых рекомбинантных белков МБТ.

Появились новые работы, которые, в отличие от ранее имевшихся представлений, демонстрируют важное значение специфических анти-МБТ антител в качестве фактора иммунной защиты. Обсуждается в том числе и вероятная возможность пассивной иммунизации в качестве терапевтического средства при лечении туберкулёза [34, 35]. Новые работы демонстрируют возможность применения серологических тестов для дифференцирования активной и латентной туберкулёзной инфекции [36]. Показано, что антитела к антигенам-продуктам генов вирулентности PhoP угнетены при активном туберкулёзе, тогда как у контактных (с латентной инфекцией) эти антитела определяются на более низком уровне. Кроме того, при измерении соотношения определяемых антител к альфа-кристаллину к антителам к PhoP, которое значительно повышено при туберкулёзе и при латентной инфекции, позволяет дифференцировать все 3 группы.

Наконец последняя работа китайских авторов 2017 г. представила удивительно эффективную возможность дифференцирования активной и латентной инфекции, а также определение латентной инфекции в отличие от здоровых неинфицированных лиц [37]. В этой работе были использованы 4 антигена – продуценты генов МБТ Rv0220, Rv2958c, Rv2994 and Rv3347c, к которым определяли антитела при активной туберкулёзной инфекции. Дифференцирование активной и латентной инфекции было достигнуто с максимальной диагностической эффективностью в отношении антигена Rv0220 с чувствительностью 98,3% при специфичности 91,3%.

Наибольший интерес с перспективой положительного решения чрезвычайно важной проблемы дифференцирования активной и латентной туберкулёзной инфекции, с нашей точки зрения, вызывают работы по определению экспрессии перспективных генов, связанных с иммунным ответом в мононуклеарных клетках крови [38, 39]. На сегодня известны не менее четырёх генов, определение экспрессии которых, по данным авторов, позволит дифференцировать больных активным туберкулёзом от лиц с латентной туберкулёзной инфекцией и пациентов с латентной инфекцией от здоровых в контрольной группе. Экспрессия конкретных генов может быть проведена при анализе спектра мРНК, определяемых с помощью обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени.

Таким образом, проблеме диагностики туберкулёзной инфекции, и прежде всего у детей и подростков, которая является наиболее трудной в силу особенностей детского возраста и требует применения иммунологических методов диагностики, в медицинской и научной общественности уделяется огромное внимание. Разумеется, проблема точного определения как туберкулёзного инфицирования в латентной форме без данных о предсказательности развития активной туберкулёзной инфекции существенно затрудняет назначение обоснованного химиопрофилактического курса лечения противотуберкулёзными препаратами. Проблема дифференцирования активной и латентной туберкулёзной инфекции в отношении взрослых контингентов также чрезвычайно актуальна и является предметом исследований большого спектра специалистов. Новые биомедицинские технологии, в том числе с использованием генно-инженерных продуктов – белков МБТ, обладающих малоизученными свойствами, позволяют рассчитывать на разрешение этих проблем в ближайшем десятилетии.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА (пп. 2—6, 9—15, 17, 21—39)

- ВОЗ. Стратегия ликвидации туберкулеза. Глобальная стратегия и цели по профилактике, лечению и контролю туберкулеза, ноябрь 2015. World Health Organization. The End TB Strategy. Global Strategy and Targets for Tuberculosis Prevention, Care and Control after 2015. www.who.int/tb/post2015\_November 2015.
- Мордовская Л.И., Владимирский М.А., Аксенова В.А., Ефремов Е.Е., Игнашенкова Г.И., Власик Т.Н. Индукция гамма-интерферона в образцах цельной венозной крови *in vitro* - тест для определения туберкулёзного инфицирования детей и подростков. Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2009; 6: 19–24.
- Киселев В.И., Барановский П.М., Рудых И.В., Шустер А.М., Мартынов В.А. и др. Клинические испытания нового кожного теста Диаскинтест для диагностики туберкулеза. Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2009; 2: 11–6.
- Аксенова В.А., Барышникова Л.А., Севостьянова Т.А., Клевно Н.И. Туберкулез у детей в России и задачи фтизиатрической общепедиатрической службы по профилактике и раннему выявлению заболевания. Туберкулез и болезни легких. 2014; 3: 40–6.
- Слогодская Л.В., Литвинов В.И., Филиппов Ф.В., Кочетков Ф.Я., Сельцовский П.П. и др. Чувствительность нового кожного теста (Диаскинтест) при туберкулёзной инфекции у детей и подростков. - Туберкулез и болезни легких. 2010; 1: 10–5.
- Ставицкая Н.В., Молчанова Н.В., Дудченко Д.В., Дорошенкова А.Е. Оптимизация скрининга туберкулёзной инфекции у детей. Туберкулез и болезни легких. 2010; 12: 59–64.
- Васильева Е.В., Паукер М.Н., Грицай И.Ю., Прибыток, Вербов В.Н. и Тотолян А.А. - Возможности и ограничения теста QuantiFERON-TB Gold In tube в лабораторной диагностике туберкулеза легких. Туберкулез и болезни легких. 2013; 2: 13–7.

## REFERENCES

- World Health Organization. The End TB Strategy. Global Strategy and Targets for Tuberculosis Prevention, Care and Control after 2015. www.who.int/tb/post2015\_November 2015. (in Russian)
- World Health Organization. Guidelines on the Management of Latent Tuberculosis Infection. Geneva, World Health Organization, 2015.
- Getahun H., Matteelli A., Abubakar I., Abdel Aziz M., Baddeley A., Barreira D., Den Boon S. et al. Management of latent Mycobacterium tuberculosis infection: WHO guidelines for low tuberculosis burden countries. Eur. Respir. J. 2015; 46(6): 1563–76.
- Esmail H., Barry C.E., Young D.B., Wilkinson R.J. The ongoing of latent tuberculosis. Philosophical Trans. of Royal Society. B 369: 2013.0437, 1-14.
- Berthet F.X., Rasmussen P.B., Rosenkrands I., Andersen P., Gicquel V. A. Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10) Microbiology. 1998; 11: 3195–203.

6. van Pinxteren L.A., Ravn P., Agger E.M., Pollock J., Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000; 7: 155–60.
7. Mordovskaya L.I., Vladimirovsky M.A., Aksenova V.A., Efremov E.E., Ignashenkova G.I., Vlasik T.N. Induction of gamma-interferon in whole-venous blood samples in vitro is a test for the detection of Mycobacterium tuberculosis infection in children: a literature review. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh.* 2009; 6: 19–24. (in Russian)
8. Chiappini E., Bonsignori F., Accetta G., Boddi V., Galli L., Biggeri A. et al. Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children: a literature review. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2012; 25(2): 335–43.
9. Pollock L., Basu Roy R., Kampmann B. How to use: interferon  $\gamma$  release assays for tuberculosis. *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* 2013; 98(3): 99–105.
10. Pooran A., Booth H., Miller R. F., Scott G. et al. Different screening strategies (single or dual) for the diagnosis of suspected latent tuberculosis: a cost effectiveness analysis. *BMC Pulm. Med.* 2010; 22(10): 7.
11. Nienhaus A., Schablon A., Costa J.T., Diel R. Systematic review of cost and cost-effectiveness of different TB-screening strategies. *BMC Health. Serv. Res.* 2011; 30(11): 247.
12. Steffen RE, Caetano R, Pinto M, Chaves D, Ferrari R, Bastos M. et al. Cost-effectiveness of QuantiFERON®-TB Gold-in-Tube versus tuberculin skin testing for contact screening and treatment of latent tuberculosis infection in Brazil. *PLoS One.* 2013; 8(4): e59546
13. Kruzak K., Duplaga M., Sanak M., Cmiel A., Mastalerz L., Sladek K. et al. Comparison of IGRA tests and TST in the diagnosis of latent tuberculosis infection and predicting tuberculosis in risk groups in Krakow, Poland. *Scand. J. Infect. Dis.* 2014; 46(9): 649–55.
14. Lodha R., Mukherjee A., Saini D., Saini S., Singh V., Singh S. et al. Role of the QuantiFERON®-TB Gold In-Tube test in the diagnosis of intrathoracic childhood tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2013; 17(11): 1383–8.
15. Auguste P., Tsertsvadze A.I., Pink J., Court R., McCarthy Noel, Sutcliffe P. et al. Comparing interferon-gamma release assays with tuberculin skin test for identifying latent tuberculosis infection that progresses to active tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17: 20.
16. Kiselev V.I., Baranovsky P.M., Rudykh I.V., Shuster A.M., Martyanov V.A. et al. Clinical trials of a new skin test Diaskintest for diagnosis of tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh.* 2009, 2, 11–6.
17. Aksenova VA, Baryshnikova LA, Sevostyanova TA, Klevno N.I. Tuberculosis in children in Russia and the tasks of the phthisiatry in general pediatric service for the prevention and early detection of the disease. *Tuberkulezy i bolezney legkikh.* 2014; 3: 40–6. (in Russian)
18. Slogotskaya LV, Litvinov V.I., Filippov F.V., Kochetkov F.Ya., Seltsovsky P.P., Etc. Sensitivity of a new skin test (Diaskintest) for tuberculosis infection in children and adolescents. *Tuberkulezy i bolezney legkikh.* 2010; 1: 10–5. (in Russian)
19. Stavitskaya NV, Molchanova NV, Dudchenko DV, Doroshenkova AE Optimization of screening of tuberculosis infection in children. *Tuberkulezy i bolezney legkikh.* 2010; 12: 59–64. (in Russian)
20. Vasilyeva EV, Pauker MN, Gritsay I.Yu., Pribytkov, Verbov V.N. And Totolyan AA - Opportunities and limitations of the QuantiFERON® TB Gold In tube test in the laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Tuberkulezy i bolezney legkikh.* 2013; 2: 13–7. (in Russian)
21. Hoff S.T., Peter J.G., Theron G., Pascoe M., Tingskov P.N., Aggerbeck H. Sensitivity of C-Tb: a novel RD-1-specific skin test for the diagnosis of tuberculosis infection. *Eur. Respir. J.* 2016; 47(3): 919–28.
22. Knierer J., Gallegos Morales, Schablon A., Nienhaus A., Kersten J.F. QFT-Plus: a plus in variability? – Evaluation of new generation IGRA in serial testing of students with a migration background in Germany. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2017; 12: 1.
23. Telisinghe L., Amofa-Sekyi M., Maluzi K., Kaluba-Milimo D., Cheeba-Lengwe M., Chiwele K. et al. The sensitivity of the QuantiFERON®-TB Gold Plus assay in Zambian adults with active tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2017; 21(6): 690–6.
24. Nicol M., Gnanashanmugam P., Browning R., Click E.S., Luis E., Cuevas L. et al. A Blueprint to Address Research Gaps in the Development of Biomarkers for Pediatric Tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 2015; 61(Suppl 3): S164–S172.
25. Mendy J., Togun T., Owolabi O., Donkor S., Martin Ota I, Sutherland J. et al. C-reactive protein, Neopterin and Beta2 microglobulin levels pre and post TB treatment in The Gambia. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16: 115.
26. Ferrian S., Manca C., Lubbe S., Conradie F., Ismail N., Kaplan G. et al. A combination of baseline plasma immune markers can predict therapeutic response in multidrug resistant tuberculosis. *PLoS One.* 2017; 12(5): e0176660.
27. Harari A., Rozot V., Enders F. B., et al. Dominant TNF- $\alpha$ -Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. *Nat. Med.* 2011; 17: 372–6.
28. Commandeur S., Lin M.Y., van Meijgaarden K.E., Friggen A.H., Franken K.L., Drijfhout J.W. et al. Double- and monofunctional CD4+ and CD8+ T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis DosR antigens and peptides in long-term latently infected individuals. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41(10): 2925–36.
29. Lyadova I. V., Oberdorf S., Kapina M. A., Apt A. S., Swain S. L., Sayles P. C. CD4 T cells producing IFN- $\gamma$  in the lungs of mice challenged with mycobacteria express a CD27-negative phenotype. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; 138(1): 21–9.
30. Nikitina I., Kondratuk N., Kosmiadi G., Amansahedov R., Vasilyeva I.A., Ganusov V., Lyadova I. Mtb-Specific CD27low CD4 T Cells as Markers of Lung Tissue Destruction during Pulmonary Tuberculosis in Humans. *PLoS One.* 2012; 7(8): e43733.
31. Borgström E., Andersen Peter, Atterfelt F., Julander, I., Källenius G. Maeurer M. et al. Immune Responses to ESAT-6 and CFP-10 by FASCIA and Multiplex Technology for Diagnosis of M. tuberculosis Infection; IP-10 Is a Promising Marker. *PLoS One.* 2012; 7(11).
32. Carrère-Kremer S., Rubbo P.A., Pisoni A., Bendriss S., Marin G., Peries M. et al. High IFN- $\gamma$  Release and Impaired Capacity of Multi-Cytokine Secretion in IGRA Supernatants Are Associated with Active Tuberculosis. *PLoS One.* 2016; 11(9): e0162137.
33. Qin Sun, Wei Wei, Wei Sha. Potential Role for Mycobacterium tuberculosis Specific IL-2 and IFN- $\gamma$  Responses in Discriminating between Latent Infection and Active Disease after Long-Term Stimulation. *PLoS One.* 2016; 11(12): e0166501.
34. Jacobs A. Mongkolsapaya J., Sreaton G., McShane H. Wilkinson R. REVIEW. Antibodies and tuberculosis. *Tuberculosis.* 2016; 102: e113.
35. Achkar J., Chan J., Casadeva A. B cells and Antibodies in the Defense against Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunol Rev.* 2015; 264(1): 167–81.
36. Vidyarthi A., Khan N., Agnihotri T., Siddiqui K.F., Nair G.R., Arora A. et al. Antibody response against PhoP efficiently discriminates among healthy individuals, tuberculosis patients and their contacts. *PLoS One.* 2017; 12(3): e0173769.
37. Xiaolong You, Ranhui Li, Kanglin Wan, Liangzhan Liu, Xiaoping Xie, Lanhua Zhao et al. Evaluation of Rv0220, Rv2958c, Rv2994 and Rv3347c of Mycobacterium tuberculosis for serodiagnosis of tuberculosis. *Microbiol. Biotechnol.* 2017; 10(3): 604–11.
38. Shih-Wei Lee, Lawrence Shih-Hsin Wu, Guan-Mau Huang, Kai-Yao Huang, Tzong-Yi Lee, and Julia Tzu-Ya Weng. Gene expression profiling identifies candidate biomarkers for active and latent tuberculosis. *BMC Bioinformatics.* 2016; 17(Suppl 1): 3.
39. Zak D.E., Penn-Nicholson A., Scriba T.J., Thompson E., Suliman S., Amon L.M. et al. A blood RNA signature for tuberculosis disease risk: a prospective cohort study. *Lancet.* 2016; 387 (10035): 2312–22.

© МИСЮРИН В.А., 2018

УДК 616-006:577.21.83.3

Мисюрин В.А.

## ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА PRAME ПРИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЯХ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия

Представлен анализ данных литературы о диагностической, прогностической и терапевтической роли экспрессии гена PRAME при онкологических заболеваниях. Кодированный этим геном белок играет двойную роль. С одной стороны, PRAME блокирует дифференцировку опухолевой клетки и предотвращает развитие апоптоза. Это ухудшает прогноз у больных. Ухудшение клинического исхода при активности PRAME доказано для больных раком почки, опухолями головы и шеи, раком молочной железы, нейробластомой и остеосаркомой. С другой стороны, PRAME относится к группе раково-тестикулярных антигенов, и его эпитопы распознаются иммунной системой человека. При раке лёгкого прогноз у больных в случае экспрессии PRAME в опухоли несколько улучшается. Возможно, в некоторых случаях достигается баланс между драйверными свойствами PRAME при онкогенезе и повышением иммуногенности опухолевой клетки. При раке мочевого пузыря и раке яичников влияние PRAME на выживаемость больных оказалось незначительным. Иммуногенность PRAME и его высокая частота экспрессии позволяют рассчитывать на эффективность методов иммунотерапии против данного антигена. В настоящее время разрабатываются разнообразные типы вакцин, такие как дендритноклеточные, Т-клеточные, пептидные и белковые. Поиск литературы для данного обзора проводился в базах данных Web of Science, Scopus и pubmed. Использовалось ключевое слово «PRAME». Найдено 245 уникальных публикаций. Для анализа использованы результаты экспериментальных исследований клинического значения экспрессии мРНК или белка PRAME у больных онкологическими заболеваниями, экспериментов на клеточных линиях, выведенных из солидных опухолей, и результаты применения вакцин на основе пептидов или полноразмерного рекомбинантного белка PRAME.

*Ключевые слова:* PRAME; солидные опухоли; иммунотерапия; прогноз; обзор литературы.

Для цитирования: Мисюрин В.А. Прогностическое значение экспрессии гена prame при солидных опухолях. *Иммунология*. 2018; 39(1): 67-73. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-67-73>

Misurin V.A.

### PROGNOSTIC VALUE OF PRAME'S GENE EXPRESSION IN SOLID TUMORS

N.N. Blokhin's National Medical Research Center of Oncology under Ministry of Health of Russia, 115478, Moscow

Meta-analysis of prognostic, diagnostic and therapeutic importance of PRAME expression in solid tumors was performed in this review. PRAME protein plays a dual role in cancerogenesis. PRAME can prevent cell differentiation and apoptosis induction. Due to that, PRAME expression is associated with poor outcome. Deterioration of clinical outcome with PRAME activity is proven for patients with renal cell carcinoma, head and neck cancer, breast cancer, neuroblastoma and osteosarcoma. On the other hand PRAME belongs to the group of cancer-testicular antigens. Like other cancer-testis antigens, PRAME is highly immunogenic. For example, PRAME-positive patients with lung cancer has better outcome than PRAME-negative. Perhaps, a balance between driver potential and immunogenicity exists. An effect of PRAME expression is nonsignificant in case of bladder cancer and ovarian cancer. Immunogenicity and high expression rate of PRAME make it an attractive target for immunotherapy. There are developed dendritic cell, T-cell-, peptide- and full protein-based vaccines. A search of literature for this review was performed using Web of science, Scopus and Pubmed databases with keyword "PRAME". It was taken into account only experiment results about clinical significance of PRAME expression in solid tumors, tumor cell line experiments and immunization studies.

*Key words:* PRAME; solid tumors; immunotherapy; prognosis; review.

**For citation.** Misurin V.A. Prognostic value of prame's gene expression in solid tumors. *Immunologiya*. 2018; 39(1): 67-73. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-67-73>

**For correspondence:** Misyurin Vsevolod Andreevich, PhD, senior researcher of the department of experimental diagnostics and bioterapy of cancer N. N. Blokhin Russian Cancer, E-mail: [vsevolod.misyurin@gmail.com](mailto:vsevolod.misyurin@gmail.com).

Information about author: <http://orcid.org/0000-0002-0762-5631>

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

Received 26.06.17  
Accepted 16.08.17

**Для корреспонденции:** Мисюрин Всеволод Андреевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, E-mail: [vsevolod.misyurin@gmail.com](mailto:vsevolod.misyurin@gmail.com)

### Введение в биологию PRAME

Раково-тестикулярный белок PRAME aberrантно экспрессируется при многих солидных опухолях, в то время как в организме здорового человека его активность строго ограничена и характерна для клеток семенников или плаценты. Белок PRAME представляет собой очень непростой объект для исследования, так как у него нет чётко обозначенной функции, как, например, у антиапоптотического белка BCL2

или ДНК-полимеразы. Тем не менее, характеристики опухолевой клетки при экспрессии в ней *PRAME* значимо изменяются, и это отражается на судьбе больного.

Свойства белка *PRAME* заключаются в его способности ассоциироваться с другими белками или их комплексами. Так, *PRAME* взаимодействует с белками семейства RAR, ядерными рецепторами ретиноевой кислоты [1]. Образовавшийся комплекс RAR $\alpha$ -*PRAME* привлекает EZH2, известный репрессор транскрипции генов [2]. В результате EZH2 блокирует экспрессию генов, с промоторами которых связывается комплекс RAR $\alpha$ -*PRAME*. При ассоциации с RAR $\alpha$  молекулы ретиноевой кислоты, комплекс RAR $\alpha$ -*PRAME*-EZH2 остаётся стабильным, и экспрессия RAR $\alpha$ -контролируемых генов не осуществляется. В здоровой клетке, не имеющей *PRAME*, ретиноевая кислота обеспечивает диссоциацию репрессора транскрипции, и гены, находящиеся под контролем RAR $\alpha$ , экспрессируются. Таким образом, в опухолевой клетке *PRAME* блокирует программы дифференцировки.

Другим партнёром *PRAME* по связыванию является белок Cullin2 (Cul2). Этот белок формирует комплекс убиквитин-лигазы, который распознаёт белковые субстраты, и присоединяет к ним убиквитиновые субъединицы. Белки, получившие «убиквитиновую метку», быстро деградируют. Комплекс Cul2 интересен тем, что входящие в него субстратраспознающие единицы могут быть разными. Каждая субстратраспознающая единица способна взаимодействовать с определённым набором белковых субстратов. Таким образом, в зависимости от субстратраспознающей единицы, входящей в комплекс, убиквитинируются и разрушаются разные клеточные белки. Пример субстрат-распознающего белка – VHL. Этот белок предназначен для распознавания Hif1 $\alpha$ , его убиквитинирования и последующей деградации. Для ассоциации с Cul2 белок *PRAME* использует мотивы своей структуры, сходные с мотивами VHL. Вследствие этого *PRAME* может являться субстратраспознающей единицей для Cul2 [3]. Тем не менее, способность *PRAME* распознавать и убиквитинировать белки ещё не была показана экспериментально, и субстраты для *PRAME* остаются неизвестными. Вследствие этого, невозможно предсказать, будет ли влияние убиквитин-лигазной активности *PRAME* на прогноз заболевания позитивным или негативным.

Относительно недавно обнаружено, что *PRAME* участвует в организации комплекса белков EKC/KEOPS, широко распространённых в тканях человека. EKC/KEOPS способен поддерживать стабильность теломерных повторов, что способствует опухолевой трансформации [3]. Роль *PRAME* в составе EKC/KEOPS изучена мало. Однако очевидная связь EKC/KEOPS с процессом иммортализации клеток характеризует *PRAME* как негативный фактор прогноза.

В мировой литературе представлены данные о том, что *PRAME* задействован в системе защиты клеток от отравления их солями тяжёлых металлов [4]. В дополнение к этому, *PRAME* способен блокировать экспрессию TRAIL – мощного индуктора внешнего пути апоптоза [5].

Совокупность перечисленных факторов позволяет предположить, что экспрессия *PRAME* увеличивает жизнеспособность и лекарственную резистентность опухолевых клеток. Несмотря на это, *PRAME* может быть связан и с более благоприятным исходом, так как представляет собой очень иммуногенный белок. Доказательства иммуногенности были получены ещё в 1997 г. группой Ikeda et al., выделивших клон Т-лимфоцитов, разрушающих клетки меланомы. Эпитоп, распознаваемый этим клоном, экспонировался на поверхности клетки в комплексе с молекулой HLA-A24, и принадлежал белку, в то время неизвестному. Обнаружив, что экспрессия гена, кодирующего этот новый белок, чаще всего происходит при меланоме, Ikeda дал ему название PReferentially expressed Antigen of MElanoma [6]. Спонтанный Т-клеточный иммунный ответ против *PRAME* может быть причиной либо полной

регрессии злокачественного заболевания, либо уменьшения опухолевой нагрузки.

#### Экспрессии гена *PRAME*. Её причины и методы детекции

*PRAME* отличается от большинства раково-тестикулярных генов тем, что его экспрессия в значительной степени связана с уровнем метилирования последовательности промотора и первых экзонов [7]. Это было многократно подтверждено экспериментально. В *PRAME*-негативных клетках здорового человека CpG-динуклеотиды в промоторной зоне и в первых экзонах гена в основном метилированы. Вследствие этого продвижение транскрипционного комплекса по последовательности гена *PRAME* затруднено, и его экспрессия не осуществляется. В клетках *PRAME*-позитивного рака мочевого пузыря последовательности гена *PRAME* были менее метилированы, чем в клетках здоровой ткани мочевого пузыря, в которых *PRAME* не экспрессировался [8].

Следует отметить, что среди опухолевых клеток *PRAME* может экспрессироваться гетерогенно, что было впервые обнаружено у больного меланомой. Из образца опухоли данного больного были выделены клоны, уровень экспрессии гена *PRAME* в которых оказался различным. Статус метилирования последовательностей гена *PRAME* также существенно различался от клона к клону. Наблюдалась прямая корреляция между числом деметилированных динуклеотидов CpG и уровнем экспрессии *PRAME* [9]. Подтверждение значимости статуса метилирования в регулировке активности *PRAME* находят также в том, что деметилирующие агенты, такие как децитабин и азацитидин, позволяют значительно увеличить уровень экспрессии *PRAME* [10, 11]. В частности, децитабин повысил уровень экспрессии *PRAME* в клеточных линиях рака яичников [12]. Интересно, что в клетках крови здорового донора деметилирование не приводило к активации экспрессии *PRAME* [11].

Имеются также свидетельства активации экспрессии *PRAME* сигнальными путями врождённого иммунного ответа [13].

Для более глубокого понимания клинического значения экспрессии *PRAME* следует ознакомиться с методами детекции активности мРНК и белка *PRAME*.

На сегодняшний день открыто более десяти вариантов сплайсинга мРНК *PRAME*. При этом каждый вариант содержит в себе последовательность о полном размере белке [10]. В связи с этим для изучения паттерна экспрессии *PRAME* оптимально использовать такие системы праймеров для ПЦР, которые позволяют обнаруживать транскрибируемые фрагменты РНК. Для этого следует подбирать пары праймеров, фланкирующих стык экзонов 2 и 3, 3 и 4 или 4 и 5 гена *PRAME*. Первооткрыватели *PRAME* под руководством Ikeda использовали системы праймеров, охватывающих место слияния экзонов 4 и 5. Используя классический метод ПЦР продуктов обратной транскрипции (ОТ-ПЦР), Ikeda et al. установили, насколько широко *PRAME* гиперэкспрессирован при онкологических заболеваниях [6]. Несколько позднее исследователи под руководством Oberthuer A. сравнили разрешающую способность методов нозерн-блоттинга мРНК, ОТ-ПЦР и количественной ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя для определения уровня экспрессии *PRAME*. Количественные результаты ПЦР коррелировали между собой и с полуколичественными результатами нозерн-блоттинга. Но из-за низкой разрешающей способности нозерн-блоттинга по сравнению с различными вариантами ПЦР авторы предложили использовать последние методы для детекции мРНК *PRAME* в дальнейшем [14].

В последующем были испытаны методики ПЦР-диагностики микрометастазов меланомы. Специфичность такого метода была очень высокой – 99% [15]. Наконец, в недавнем прошлом были начаты испытания метода неинвазивной диагностики меланомы, основанной на снятии спе-

циальным пластырем верхнего слоя эпидермиса, выделения тотальной РНК и тестирования уровня экспрессии меланомо-ассоциированных генов LINC и *PRAME* [16]. В настоящей момент достигнута очень высокая чувствительность метода (91%), и тестируются способы увеличения специфичности (в настоящее время специфичность составляет 69%) [17].

Помимо определения активности *PRAME* на уровне мРНК разработаны антитела для оценки количества белка в образцах опухолевой ткани. Данные по уровню экспрессии белка и мРНК для одного и того же образца обычно сопоставимы. Так, при раке яичников обнаружена корреляция уровня экспрессии мРНК и белка *PRAME* [18]. Данные полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуногистохимического анализа (ИГХ) хорошо коррелируют при увеальной меланоме [19]. Значимое преимущество иммунологических методов детекции – возможность установить архитектуру опухолевой ткани, в которой можно наблюдать *PRAME*-экспрессирующие клетки опухоли и *PRAME*-негативные клетки неопухолевой ткани. Однако разрешающая способность иммунологических методов значительно ниже, чем у ПЦР. Вероятно, по этой причине в наши дни не распространено определение уровня экспрессии белка *PRAME* в диагностических целях.

#### Клиническое значение экспрессии *PRAME*

При меланоме *PRAME* активен у подавляющего большинства больных. Согласно Ikeda et al., *PRAME* гиперэкспрессируется в 88% случаев первичной меланомы и в 95% случаев метастатической [6]. Исходя из этого, авторами было сделано заключение о связи гена *PRAME* с метастазированием меланомы. Позднее, используя более чувствительные методы детекции, другие исследователи показали, что *PRAME* активен в 86% [20] и в 84,6% случаев первичной меланомы [21]. Из этого следует, что активность *PRAME* в первичном очаге меланомы происходит на очень высоком уровне, детектируемым относительно низкочувствительным методом ОТ-ПЦР, либо не происходит вовсе, и может существовать небольшая популяция первичных *PRAME*-негативных больных меланомой.

Первичный очаг меланомы может развиваться в глазном яблоке. Ikeda et al. наблюдали экспрессию *PRAME* в 5 из 9 случаев меланомы такого типа. Позднее Westekemper et al. использовали метод ИГХ, при помощи которого наблюдали активность *PRAME* как в самой меланоме глаза, так и в кожных метастазах и поражённых лимфатических узлах [22]. В участках инвазии и образцах метастаза уровень экспрессии белка был выше, чем в первичном очаге [22]. Данные ИГХ показали, что белок *PRAME* в основном сосредоточен в ядрах опухолевых клеток. Влияние уровня экспрессии белка на такие параметры, как время выживаемости или результативность терапии, установить не удалось. В дальнейшем транскриптомный анализ показал, что существует благоприятный паттерн экспрессии генов, на основании чего выделили класс I меланомы глаза, и неблагоприятный, выделенный в класс II. У больных с благоприятным паттерном экспрессии генов активность *PRAME* оказалась значимым признаком, связанным с ухудшением прогноза [19]. Риск метастазирования опухоли у таких больных увеличивается [23].

При другой опухоли тканей глаза, ретинобластоме, *PRAME* связан с химиорезистентностью, что было доказано трансфекцией гена *PRAME* в линии ретинобластомы Y79, ATCC и USA [24].

*PRAME* является самым экспрессируемым РТГ (раково-тестикулярным геном) при остеосаркоме [25]. В опухоли 96,4% больных была обнаружена мРНК [26]. Доказано увеличение уровня экспрессии гена при более продвинутых стадиях заболевания и *PRAME*-опосредованное ухудшение параметров выживаемости [27]. Было установлено, что *PRAME* связан с инактивацией NOTCH-сигналинга и потерей клеточной остеосаркомы молекул адгезии, а также блокированием её дифференцировки [26, 27]. Нокаут *PRAME* в клетках

остеосаркомы U-2OS и ZOS приводил к снижению скорости их пролиферации и к способности образовывать колонии, а также к повышению уровня экспрессии белка P27 [27].

Интересно, что при опухоли Вильмса *PRAME* также, как при остеосаркоме, связан с потерей дифференцировки [28].

При липосаркоме активность *PRAME* наблюдается в основном в случаях высокодифференцированной опухоли [29]. Следует отметить, что именно высокодифференцированная липосаркома имеет наилучший прогноз. Высокая частота экспрессии *PRAME* характерна также для миксоидной (сходной по морфологии с жировой тканью эмбриона) липосаркомы, в связи с чем имеются данные об экспрессии *PRAME* в 90% случаев [30]. Уровень экспрессии гена прямо коррелирует с неблагоприятным прогнозом [30].

Активность *PRAME* часто наблюдается при раке почки. Ikeda et al. показали, что *PRAME* экспрессируется у 41% больных. В других исследованиях экспрессия *PRAME* наблюдалась у 40% [31] и 39% [32] исследованных больных. Наибольший уровень экспрессии *PRAME* обычно связан с самым неблагоприятным субтипом рака почки [7]. При этом не зависит от стадии заболевания и экспрессии других РТГ, таких как MAGE-A1 и MAGE-A3 [33]. Кроме этого, при терапии ингибиторами тирозинкиназ эффективность и прогноз заболевания значительно ухудшаются [34].

Известно о высокой частоте экспрессии *PRAME* при нейробластоме: ген активен у 93% первичных больных и всех без исключения больных с продвинутыми стадиями. Уровень экспрессии гена выше при большем возрасте больных и прямо коррелирует с тяжестью течения заболевания [14]. Амплификация гена MYC никогда не наблюдалась у больных нейробластомой, имеющих относительно низкий уровень экспрессии *PRAME*. Параметры бессобытийной (БСВ) и общей (ОБ) выживаемости были значительно хуже у больных с большим уровнем экспрессии *PRAME* по сравнению со средним и низким уровнями (БСВ 0,45 vs 0,71 vs 0,92, соответственно,  $p = 0,03$ ; ОБ 0,77 vs 0,86 vs 1,0, соответственно,  $p = 0,1$ ) [14].

При медуллобластоме также наблюдается экспрессия *PRAME* с различными уровнями у разных больных [35]. Активность гена наблюдалась у 84% больных, но связи с клиническими признаками не обнаружена [36].

Обнаружена активность *PRAME* при опухоли гипофиза. Согласно результатам анализа профиля экспрессии генов, *PRAME* ассоциирован с промежуточной степенью дифференцировки [37]. В работе было немного случаев, и установить связь с клиническим исходом не удалось.

При раке мочевого пузыря ген активен относительно редко: по одним данным всего в 20% случаев [8], по другим – в 32% [38]. В двух исследованиях была найдена связь активного *PRAME* с большим размером опухоли [8, 38]. Согласно Lerut et al, *PRAME* чаще активен при менее продвинутых стадиях [38]. По данным Dyrskjot et al, *PRAME* активен в более продвинутых стадиях и ассоциирован с более выраженной резистентностью к химиотерапии ( $p = 0,02$ ) [8]. Несмотря на развитие химиорезистентности, влияние *PRAME* на параметры выживаемости больных раком мочевого пузыря оказалось незначительным [8].

При плоскоклеточном раке головы и шеи экспрессия *PRAME* обнаружена в 42% [39], по другим данным – в 49% [40] случаев. мРНК и белок *PRAME* коэкспрессируются с другими РТГ, и активны на большем уровне в наиболее продвинутых стадиях, а также ассоциированы с курением [39 – 41]. В высокодифференцированной линии PCI-1 рака головы и шеи количество белка *PRAME* было меньшим, чем в низкодифференцированной PCI-13, что коррелировало с клиническими данными [41]. *PRAME* связан с метастазированием, так как активен в клетках, находящихся в «сторожевых» лимфатических узлах [39]. Интересно, что в клетках, поразивших лимфатические узлы, наблюдалось наибольшее

количество белка *PRAME* по сравнению с клетками первичного опухолевого очага и метастазов [41]. Влияние экспрессии *PRAME* на параметры выживаемости больных оказалось статистически незначимым [39].

У 32% больных раком лёгких в образце опухоли были обнаружены транскрипты гена *PRAME*. При раке лёгких, как и при опухолях головы и шеи, *PRAME* чаще активен у курильщиков. Курение оказалось решающим фактором, связанным с экспрессией *PRAME* [42]. Наблюдался тренд в сторону улучшения параметров выживаемости *PRAME*-положительных больных ( $p = 0,39$ ). Опубликованы данные, свидетельствующие о том, что *PRAME* может быть супрессором метастазирования при раке лёгких. При нокауте *PRAME* в клетках линий рака лёгкого PC9 и A549 наблюдалось значительное ускорение их пролиферации [43]. Есть данные, полученные на мышиных моделях, что экспрессия *PRAME* связана с более благоприятным течением рака лёгких, так как препятствует метастазированию [44]. Опубликованы данные о нарушениях в структуре гена *PRAME* при раке лёгких. В последовательности гена обнаружены микроделеции, которые могут приводить к экспрессии нефункционального белка. Дефекты найдены у 73% больных [45]. Возможно, именно по этой причине негативные последствия при раке лёгких не проявляются, так как *PRAME* не образует комплексов со своими белковыми партнёрами. При этом *PRAME*-экспрессирующие клетки рака лёгких приобретают повышенные иммуногенные свойства.

Согласно результатам Doolan et al, экспрессия гена *PRAME* может происходить в тканях молочной железы, не поражённых опухолевыми клетками. И мРНК была детектирована в 37% таких образцов. В образцах опухоли молочной железы *PRAME* экспрессируется чаще (в 53%) и на существенно более высоком уровне по сравнению с образцами ткани без поражения. Медиана общей выживаемости больных с экспрессией *PRAME* составила 7 лет. Медиана выживаемости больных без экспрессии не была достигнута ( $p = 0,0052$ ). Согласно результатам многофакторного анализа, высокий уровень экспрессии *PRAME* является независимым фактором неблагоприятного прогноза ( $p = 0,02$ ). Отмечено также, что уровень активности *PRAME* не коррелирует с такими показателями, как чувствительность опухоли к эстрогену, поражением «сторожевых» лимфатических узлов, гистологическим типом и размером опухоли [46]. Корреляция экспрессии *PRAME* с плохим прогнозом была подтверждена в другом исследовании. Медиана выживаемости больных с экспрессией *PRAME* была достигнута через 12 лет, в то время как медиана выживаемости больных без экспрессии не была достигнута к концу 18-летнего срока наблюдения ( $p < 0,001$ ) [47].

Согласно данным, полученным при анализе клинического значения экспрессии 1145 генов у 414 больных, *PRAME* является одним из лучших (наряду с CEGP1) биомаркеров негативного прогноза [48]. Несмотря на вполне однозначные результаты клинических наблюдений, роль *PRAME* в патогенезе рака молочной железы остаётся малопонятной и даже парадоксальной. Так, нокаут этого гена в клетках линий молочной железы приводил к снижению интенсивности апоптоза и к увеличению скорости метастазирования в ксенографтных моделях [49].

Определение уровня экспрессии *PRAME* оказалось полезным в уточнении субтипов фиброэпителиальных новообразований молочной железы. Фиброаденома и листовидная опухоль молочной железы – трудноотличимые предракочные состояния. На основании интенсивности экспрессии генов APOD, ABCA8, CCL19, FN1 и *PRAME* можно проводить дифференциальную диагностику данных новообразований. Для фиброаденомы характерен более высокий уровень экспрессии генов APOD, ABCA8 и CCL19, и для листовидной опухоли – повышенный уровень экспрессии FN1 и *PRAME* [50].

Существуют данные о значимости экспрессии *PRAME* при семиноме. Морфологическим субстратом этого заболевания являются герминогенные клетки, в которых в норме активен ген *PRAME*. При трансформации этих клеток уровень экспрессии *PRAME* существенно возрастает. Предполагается, что *PRAME* может быть драйвером дальнейшего онкогенеза при этом заболевании [51]. Это подтверждается новейшими данными о *PRAME*-опосредованном блокировании дифференцировки клеток семиномы [52].

Активность *PRAME* наблюдалась у 60% больных раком яичников [53]. В некоторых случаях наблюдалась амплификация гена, что считалось причиной гиперэкспрессии. Данные о клинической значимости экспрессии оказались противоречивыми. С одной стороны, наблюдалась связь гиперэкспрессии *PRAME* у больных с III стадией в дебюте заболевания с худшим прогнозом [54, 55]. В другом исследовании при ретроспективном анализе ОБ больных с III и IV стадиями заболевания оцененный уровень экспрессии *PRAME* у выживших более 5 лет и погибших больных оказался сопоставим [56]. При амплификации гена *PRAME* наблюдался тренд к улучшению параметров выживаемости [12]. Кроме прогностического, *PRAME* имеет и диагностическое значение. Так, *PRAME* может быть полезным в при дифференциальной диагностике серозной карциномы, при которой часто экспрессируется, и мезотелиомы яичника, в случае которой *PRAME* неактивен [18].

#### Использование антигена *PRAME* в качестве мишени для иммунотерапии

Так как белок *PRAME* не имеет ферментативного центра, очень трудно разработать низкомолекулярный ингибитор для терапии *PRAME*-экспрессирующих опухолей. Однако существует другой способ терапии – таргетная иммунотерапия. Свидетельства такой возможности следуют уже из первой публикации о *PRAME*. Сначала были получены моноклональные CD8-положительные лимфоциты, атакующие клетки меланомы, а потом был определён эпитоп, распознаваемый этими Т-клетками, и наконец, найден ген, кодирующий белок, содержащий данный эпитоп [6]. Кроме этого, высокая иммуногенность *PRAME* улучшает результаты адьювантной терапии. Действительно, ретроспективный анализ результатов терапии больных раком молочной железы показал, что адьювантная терапия улучшает клинический исход у пациенток, опухоль которых экспрессировала *PRAME* [46, 47]. В группе больных, не получивших адьювантную терапию, исход заболевания у *PRAME*-положительных пациенток был хуже, чем у *PRAME*-негативных [46, 47].

Значительное количество работ, обзор которых дан выше, посвящены поиску клинически значимых молекулярных маркеров, а также оценке распространённости активного *PRAME* у больных для разработки протоколов иммунотерапии. Некоторые работы посвящены разработке методов иммунотерапии. К настоящему времени (июнь 2017 года) в литературе упомянуты различные подходы.

Известны попытки использовать дендритноклеточные вакцины для презентации эпитопов белка *PRAME* лимфоцитам больного. Учитывая, что активность *PRAME* наблюдается в опухолевых клетках практически каждого больного нейробластомой, для создания вакцины Morandi et al. создали дендритные клетки, нагруженные тотальной РНК клеток нейробластомы. Эти дендритные клетки инкубировали с обогащёнными CD8-положительными клетками здоровых доноров и больных нейробластомой. После нескольких раундов культивирования сформировались популяции Т-киллеров, распознающих и уничтожающих клетки-мишени. В качестве мишеней использовались *PRAME*-экспрессирующие клетки нейробластомы и лейкозные клетки T2, в которые заранее были помещены пептиды белка *PRAME* [57].

Разрабатывалась и проверялась эффективность дендритноклеточной вакцины для терапии саркомы Юинга. Перво-

начально исследователи под руководством Altvater планировали получить клон Т-клеток из крови больного. При стимулировании *PRAME*-презентирующими дендритными клетками удалось обогатить популяцию Т-лимфоцитов, лизирующих клетки, презентующие эпитопы *PRAME*. Однако получить такой клон удалось только от двух из 14 больных саркомой Юинга и у одного из 20 здоровых доноров. Авторы предположили, что при саркоме Юинга Т-клеточный ответ против *PRAME* развивается редко, и рекомендовали разработку химерного Т-клеточного рецептора для трансфекции в неспецифические Т-лимфоциты [58].

Стоит упомянуть и о другом возможном способе иммунотерапии нейробластомы. Показано, что НК-клетки стимулируют экспрессию молекул HLA-A2 на поверхности клеток нейробластомы, что улучшает *PRAME*-зависимый Т-клеточный ответ против них [59]. Авторы предлагают развивать дальше методы НК-клеточной терапии нейробластомы.

Другой подход иммунотерапии предусматривает использование *PRAME*-распознающих Т-киллеров. Пример получения таких клеток – их сепарация посредством презентирования пептидов *PRAME* при помощи антиген-презентирующих клеток (АПК). Для оценки перспектив такого способа Babiak et al. определяли частоту развития спонтанного Т-клеточного ответа против *PRAME* у больных раком лёгких. Т-клетки, распознающие пептид 300 – 309 *PRAME*, были найдены в крови у 8/14 больных. При этом пептиды *PRAME* распознавались Т-клетками таких больных чаще, чем такие антигены, как RHAMM, WT1, from hTERT, survivin, MAGЕ-A3, G250, HER2 и Aurora kinase A и B [60]. Таким образом, поиск развившихся собственных Т-лимфоцитов, распознающих *PRAME*, кажется перспективным.

Однако выделение специфических лимфоцитов не всегда бывает результативным. В одной из ранних работ из крови больных меланомой выделили Т-клетки для презентации им пептидов белка *PRAME* 100 – 108, 142 – 151, 300 – 309 и 425 – 433 при помощи специально наработанных АПК. Популяции специфических Т-клеток были получены, но в результате распознавание *PRAME*-экспрессирующих клеток-мишеней проходило с меньшей интенсивностью, чем в экспериментах с контрольными пептидами вируса гриппа и PAX5 [61]. Лишь прибегнув к деметилирующим агентам в концентрациях, близких к IC50, удалось примерно вдвое повысить уровень экспрессии *PRAME* в клетках-мишенях, и увеличить литическую активность [61]. В другой работе при помощи дендритных клеток, нагруженных пептидом 300 – 309 *PRAME* вывели популяцию Т-клеток, распознающих клетки хондромиосаркомы [62]. Лизис происходил на низком уровне, но мог быть усилен при воздействии азациитидина на клетки-мишени [62].

Следует отметить, что в крови человека как здорового, так и больного онкологическим заболеванием может циркулировать незначительное количество наивных Т-лимфоцитов, имеющих низкоаффинный рецептор, связывающийся с пептидом *PRAME*. Подобные клетки могут быть получены, но при этом будут демонстрировать низкую литическую активность против клеток-мишеней.

Однако кровь человека не является единственно доступной средой, содержащей Т-клетки. Группа под руководством Zhang получила интересные результаты по выведению Т-лимфоцитов из лимфатических узлов, дренирующих опухоль больных меланомой. Из этих Т-лимфоцитов выводили клоны, распознающие пептиды *PRAME*. После этого мышам прививали *PRAME*-экспрессирующие клетки меланомы человека и вводили полученные клоны. В результате удалось добиться контроля над ростом опухоли. Авторы проверяли различные комбинации клонов и клеток опухолей и определили, что наилучшие результаты терапии мышей достигаются при полном соответствии молекул HLA привитой опухоли и клона Т-клеток [63].

Учитывая технологическую сложность наработки Т-лимфоцитов *in vitro*, привлекательным способом кажется вакцинирование больных для возможности появления этих клеток в организме самого больного. В этом случае компоненты иммунной системы больного взаимодействуют с антигеном и специфические клетки вырабатываются самостоятельно. Опубликованы результаты клинического исследования по вакцинированию пептидами *PRAME* и PSA 26 больных меланомой, раком почки и раком простаты, чьи клетки опухоли имеют соответствующие антигены. Все больные были в продвинутых стадиях, получили стандартную терапию без успеха либо находились в прогрессии. Вакцинация предусматривала введение ДНК-векторов для экспрессии фрагментов пептидов 422 – 509 *PRAME* и 3 – 45 и 217 – 297 PSA в «сторожевые» лимфатические узлы, а также введение HLA-A0201-презентируемых пептидов 425 – 433 *PRAME* и 288 – 297 PSA. Ремиссии, частичной либо полной, достигнуть не удалось ни в одном случае. Но 10 из 24 больных демонстрировали стабилизацию заболевания, 7 из 10 оставались стабильными в течение 6 месяцев от начала терапии. В эту группу вошли 4 из 10 исходных больных раком простаты, 2 из 2 больных раком почки и 1 из 10 больных меланомой [64].

Вакцина на основе полноразмерного рекомбинантного белка имеет преимущества по сравнению с вакциной, основанной на пептиде. Полноразмерный белок содержит полный набор эпитопов, свободно подвергается процессингу в АПК и может служить основой для развития всех необходимых В- и Т-клеток. В настоящее время проходит испытания вакцина, разработанная компанией GlaxoSmithKline. Первые результаты доклинических исследований были обнадеживающими. Рекомбинантный белок *PRAME* в сочетании с адьювантом AS15 использовался для вакцинирования мышей. Через две недели после четвёртого введения вакцины у мышей был обнаружен высокий титр антител против *PRAME*, который оставался стабильным в течение следующих шести недель. Иммунизированные мыши оставались здоровыми после прививки им мышью опухолью CT26, экспрессирующей человеческий белок *PRAME* (CT26-*PRAME*), в то время как мыши контрольной группы погибли. Ответ против другой опухоли, CT26-MAGE-A3, после применения *PRAME* и AS15 был незначительным. Иммунизация обезьян продемонстрировала безопасность созданной вакцины. У подопытных животных развился стабильный CD4-зависимый ответ, а также сформировался пул В-клеток, продуцирующих антитела против белка *PRAME* [65].

Вакцина на основе рекомбинантного белка *PRAME* прошла первую фазу клинических испытаний в группе из 60 больных с диагнозом мелкоклеточный рак лёгкого [66] и 66 больных меланомой [21]. В этих исследованиях оценивали безопасность применения различных доз белка – по 20, 100 и 500 мкг, а также характер развившегося иммунного ответа. Каждый больной получил по 12 введений. Результаты этих клинических испытаний в целом были сопоставимы. В большинстве случаев у больных развивались CD4-положительные клетки, распознающие *PRAME*, причём их количество было тем выше, чем больше белка получал больной при иммунизации. В плазме всех больных после иммунизации были обнаружены антитела, связывающиеся с *PRAME*. Наблюдаемые побочные эффекты усиливались напрямую в зависимости от количества белка, но оказались достаточно небольшими, чтобы использовать максимальную дозировку белка во второй фазе клинических испытаний. Однако CD8-зависимый ответ против белка *PRAME* не развился ни у одного больного [66]. Вторая стадия клинического исследования иммунизации больных мелкоклеточным раком лёгкого была прервана в связи с тем, что параллельно идущее исследование эффективности вакцинации белком MAGE-A3 не дало результатов, превосходящих плацебо.

## Заключение

Белок *PRAME* парадоксален, так как ведёт себя и как драйвер канцерогенеза, и как пассажир. Вызвано это способностью белка вступать в разнообразные комплексы и выполнять разные задачи. Так как контекст белков в каждой из тканей уникален, функции *PRAME* не могут быть одинаковыми. По этой причине исход у больных разными онкологическими заболеваниями также оказывается различным. В ряде случаев, например, при раке лёгкого, экспрессия *PRAME* имеет благоприятные последствия.

Строгая специфичность экспрессии *PRAME* в опухолевых клетках делает его хорошим маркером метастазирования или инвазии. Следовательно, использование данного маркера в диагностических целях оправдано. Наиболее удобными являются методы детекции мРНК *PRAME*, так как обладают большей разрешающей способностью, чем методы иммунодиагностики.

В дополнение к сказанному, *PRAME* открывает широкие возможности для иммунотерапии онкологических заболеваний. Против этого можно возразить, справедливо указав на то, что *PRAME* в опухоли экспрессируется гетерогенно, и *PRAME*-позитивные клетки опухоли могут быть перемешаны с *PRAME*-негативными [9]. Однако клинические данные свидетельствуют о том, что при определённых нозологических формах *PRAME* ухудшает прогноз заболевания. Наблюдаемые при некоторых заболеваниях благоприятное течение может объясняться развитием иммунного ответа против антигена и следующего за этим уничтожения клеток опухоли.

Несомненно, что вакцина, разработанная компанией GlaxoSmithKline, показала невысокую результативность. Согласно заключению самих исследователей, испытывающих вакцину, неуспех объясняется отсутствием CD8<sup>+</sup> клеток, распознающих эпитопы *PRAME*. Однако возможности иммунотерапии этим не исчерпываются. К примеру, вакцинирование можно сочетать блокаторами PD-L1/2 для повышения вероятности появления специфических CD8<sup>+</sup> клеток.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

- Epping M.T., Wang L., Edell M.J., Carlee L., Hernandez M., Bernards R. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell*. 2005; 122(6): 835–47.
- Costessi A., Mahrouf N., Tijchon E., Stunnenberg R., Stoel M.A., Jansen P.W. et al. The tumour antigen PRAME is a subunit of a Cul2 ubiquitin ligase and associates with active NFY promoters. *EMBO J*. 2011; 30(18): 3786–98.
- Costessi A., Mahrouf N., Sharma V., Stunnenberg R., Stoel M.A., Tijchon E., Conaway J.W. et al. The human EKC/KEOPS complex is recruited to Cullin2 ubiquitin ligases by the human tumour antigen PRAME. *PLoS One*. 2012; 7(8): e42822.
- Kim H.L., Seo Y.R. Molecular and genomic approach for understanding the gene-environment interaction between Nrf2 deficiency and carcinogenic nickel-induced DNA damage. *Oncol. Rep*. 2012; 28(6): 1959–67.
- De Carvalho D.D., Mello B.P., Pereira W.O., Amarante-Mendes G.P. PRAME/EZH2-mediated regulation of TRAIL: a new target for cancer therapy. *Curr. Mol. Med*. 2013; 13(2): 296–304.
- Ikeda H., Lethe B., Lehmann F., van Baren N., Baurain J.F., de Smet C. et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*. 1997; 6(2): 199–208.
- Yao J., Caballero O.L., Yung W.K., Weinstein J.N., Riggins G.J., Strausberg R.L. et al. Tumor subtype-specific cancer-testis antigens as potential biomarkers and immunotherapeutic targets for cancers. *Cancer Immunol. Res*. 2014; 2(4): 371–9.
- Dyrskjot L., Zieger K., Kissow Lildal T., Reinert T., Gruselle O., Coche T. et al. Expression of MAGE-A3, NY-ESO-1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma. *Br. J. Cancer*. 2012; 107(1): 116–22.
- Sigalotti L., Fratta E., Coral S., Tanzarella S., Danielli R., Colizzi F. et al. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2-deoxycytidine. *Cancer Res*. 2004; 64(24): 9167–71.
- Schenk T., Stengel S., Goellner S., Steinbach D., Saluz H.P. Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007; 46(9): 796–804.
- Yao Y., Zhou J., Wang L., Gao X., Ning Q., Jiang M. et al. Increased PRAME-specific CTL killing of acute myeloid leukemia cells by either a novel histone deacetylase inhibitor chidamide alone or combined treatment with decitabine. *PLoS One*. 2013; 8(8): e70522.
- Zhang W., Barger C.J., Eng K.H., Klinkebiel D., Link P.A., Omilian A. et al. PRAME expression and promoter hypomethylation in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(29): 45352–69.
- Wadelin F.R., Fulton J., Collins H.M., Tertipis N., Bottley A., Spriggs K.A. et al. PRAME is a golgi-targeted protein that associates with the Elongin BC complex and is upregulated by interferon-gamma and bacterial PAMPs. *PLoS One*. 2013; 8(2): e58052.
- Oberthuer A., Hero B., Spitz R., Berthold F., Fischer M. The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. *Clin. Cancer Res*. 2004; 10(13): 4307–13.
- Soikkeli J., Lukk M., Nummela P., Virolainen S., Jahkola T., Katainen R. et al. Systematic search for the best gene expression markers for melanoma micrometastasis detection. *J. Pathol*. 2007; 213(2): 180–9.
- Yao Z., Allen T., Oakley M., Samons C., Garrison D., Jansen B. Analytical characteristics of a noninvasive gene expression assay for pigmented skin lesions. *Assay Drug Dev. Technol*. 2016; 14(6): 355–63.
- Gerami P., Yao Z., Polsky D., Jansen B., Busam K., Ho J., Martini M. et al. Development and validation of a noninvasive 2-gene molecular assay for cutaneous melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol*. 2017; 76(1): 114–20.e2.
- Brenne K., Nymo D.A., Reich R., Davidson B. PRAME (preferentially expressed antigen of melanoma) is a novel marker for differentiating serous carcinoma from malignant mesothelioma. *Am. J. Clin. Pathol*. 2012; 137(2): 240–7.
- Field M.G., Decatur C.L., Kurtenbach S., Gezgin G., van der Velden P.A., Jager M.J. et al. PRAME as an independent biomarker for metastasis in uveal melanoma. *Clin. Cancer Res*. 2016; 22(5): 1234–42.
- Beard R.E., Abate-Daga D., Rosati S.F., Zheng Z., Wunderlich J.R., Rosenberg S.A. et al. Gene expression profiling using nanostring digital RNA counting to identify potential target antigens for melanoma immunotherapy. *Clin. Cancer Res*. 2013; 19(18): 4941–50.
- Gutzmer R., Rivoltini L., Levchenko E., Testori A., Utikal J., Ascierto P.A. et al. Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapeutic in metastatic melanoma: results of a phase I dose escalation study. *ESMO Open*. 2016; 1(4): e000068.
- Westekemper H., Karimi S., Susskind D., Anastassiou G., Freistuhler M., Meller D. et al. Expression of MCSP and PRAME in conjunctival melanoma. *Br. J. Ophthalmol*. 2010; 94(10): 1322–7.
- Field M.G., Durante M.A., Decatur C.L., Tarlan B., Oelschlager K.M., Stone J.F. et al. Epigenetic reprogramming and aberrant expression of PRAME are associated with increased metastatic risk in Class 1 and Class 2 uveal melanomas. *Oncotarget*. 2016; 7(37): 59209–19.
- Nalini V., Segu R., Deepa P.R., Khetan V., Vasudevan M., Krishnakumar S. Molecular insights on post-chemotherapy retinoblastoma by microarray gene expression analysis. *Bioinform. Biol. Insights*. 2013; 7: 289–306.
- Toledo S.R., Zago M.A., Oliveira I.D., Proto-Siqueira R., Okamoto O.K., Severino P. Insights on PRAME and osteosarcoma by means of gene expression profiling. *J. Orthop. Sci*. 2011; 16(4): 458–66.
- Zou C., Shen J., Tang Q., Yang Z., Yin J., Li Z. et al. Cancer-testis antigens expressed in osteosarcoma identified by gene microarray correlate with a poor patient prognosis. *Cancer*. 2012; 118(7): 1845–55.
- Tan P., Zou C., Yong B., Han J., Zhang L., Su Q. et al. Expression and prognostic relevance of PRAME in primary osteosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2012; 419(4): 801–8.
- Li C.M., Guo M., Borczuk A., Powell C.A., Wei M., Thaker H.M. et al. Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am. J. Pathol*. 2002; 160(6): 2181–90.
- Hemminger J.A., Toland A.E., Scharschmidt T.J., Mayerson J.L., Guttridge D.C., Iwenofu O.H. Expression of cancer-testis antigens MAGEA1, MAGEA3, ACRBP, PRAME, SSX2, and CTAG2 in myxoid and round cell liposarcoma. *Mod. Pathol*. 2014; 27(9): 1238–45.



30. Iura K., Kohashi K., Hotokebuchi Y., Ishii T., Maekawa A., Yamada Y. et al. Cancer-testis antigens PRAME and NY-ESO-1 correlate with tumour grade and poor prognosis in myxoid liposarcoma. *J. Pathol. Clin. Res.* 2015; 1(3): 144–59.
31. Neumann E., Engelsberg A., Decker J., Storkel S., Jaeger E., Huber C. et al. Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? *Cancer Res.* 1998; 58(18): 4090–5.
32. Dannenmann S.R., Hermanns T., Bransi A., Matter C., von Boehmer L., Stevanovic S. et al. Spontaneous peripheral T-cell responses toward the tumor-associated antigen cyclin D1 in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Res.* 2013; 1(5): 288–95.
33. Ringhoffer M., Muller C.R., Schenk A., Kirsche H., Schmitt M., Greiner J. et al. Simultaneous expression of T-cell activating antigens in renal cell carcinoma: implications for specific immunotherapy. *J. Urol.* 2004; 171(6 Pt 1): 2456–60.
34. Choudhury Y., Wei X., Chu Y.H., Ng L.G., Tan H.S., Koh V. et al. A multigene assay identifying distinct prognostic subtypes of clear cell renal cell carcinoma with differential response to tyrosine kinase inhibition. *Eur. Urol.* 2015; 67(1): 17–20.
35. Boon K., Edwards J.B., Siu I.M., Olschner D., Eberhart C.G., Marra M.A. et al. Comparison of medulloblastoma and normal neural transcriptomes identifies a restricted set of activated genes. *Oncogene.* 2003; 22(48): 7687–94.
36. Vulciani-Freitas T.M., Saba-Silva N., Cappellano A., Cavalheiro S., Toledo S.R. PRAME gene expression profile in medulloblastoma. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2011; 69(1): 9–12.
37. Fèvre-Montange M., Champier J., Szathmari A., Wierinckx A., Mottolese C., Guyotat J. et al. Microarray analysis reveals differential gene expression patterns in tumors of the pineal region. *J. Neuropathol Exp Neurol.* 2006; 65(7): 675–84.
38. Lerut E., Van Poppel H., Joniau S., Gruselle O., Coche T., Therasse P. Rates of MAGE-A3 and PRAME expressing tumors in FFPE tissue specimens from bladder cancer patients: potential targets for antigen-specific cancer immunotherapeutics. *Int J. Clin. Exp Pathol.* 2015; 8(8): 9522–32.
39. Figueiredo D.L., Mamede R.C., Proto-Siqueira R., Neder L., Silva W.A. Jr., Zago M.A. Expression of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.* 2006; 28(7): 614–9.
40. Cuffel C., Rivals J.P., Zaugg Y., Salvi S., Seelentag W., Speiser D.E. et al. Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 2011; 128(11): 2625–34.
41. Szczepanski M.J., DeLeo A.B., Luczak M., Molinska-Glura M., Misiak J., Szarzynska B. et al. PRAME expression in head and neck cancer correlates with markers of poor prognosis and might help in selecting candidates for retinoid chemoprevention in pre-malignant lesions. *Oral Oncol.* 2013; 49(2): 144–51.
42. Thongprasert S., Yang P.C., Lee J.S., Soo R., Gruselle O., Myo A. et al. The prevalence of expression of MAGE-A3 and PRAME tumor antigens in East and South East Asian non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2016; 101: 137–44.
43. Huang Q., Li L., Lin Z., Xu W., Han S., Zhao C. et al. Identification of preferentially expressed antigen of melanoma as a potential tumor suppressor in lung adenocarcinoma. *Med. Sci. Monit.* 2016; 22: 1837–42.
44. Huang Q., Wei H., Wu Z., Li L., Yao L., Sun Z. et al. Preferentially expressed antigen of melanoma prevents lung cancer metastasis. *PLoS One.* 2016; 11(7): e0149640.
45. Bankovic J., Stojisic J., Jovanovic D., Andjelkovic T., Milinkovic V., Ruzdijic S. et al. Identification of genes associated with non-small-cell lung cancer promotion and progression. *Lung Cancer.* 2010; 67(2): 151–9.
46. Doolan P., Clynes M., Kennedy S., Mehta J.P., Crown J., O'Driscoll L. Prevalence and prognostic and predictive relevance of PRAME in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2008; 109(2): 359–65.
47. Epping M.T., Hart A.A., Glas A.M., Krijgsman O., Bernards R. PRAME expression and clinical outcome of breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2008; 99(3): 398–403.
48. Sun Y., Urquidí V., Goodison S. Derivation of molecular signatures for breast cancer recurrence prediction using a two-way validation approach. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010; 119(3): 593–9.
49. Sun Z., Wu Z., Zhang F., Guo Q., Li L., Li K. et al. PRAME is critical for breast cancer growth and metastasis. *Gene.* 2016; 594(1): 160–4.
50. Tan W.J., Cima I., Choudhury Y., Wei X., Lim J.C., Thike A.A. et al. A five-gene reverse transcription-PCR assay for pre-operative classification of breast fibroepithelial lesions. *Breast Cancer Res.* 2016; 18(1): 31.
51. Biermann K., Heukamp L.C., Steger K., Zhou H., Franke F.E., Sonnack V. et al. Genome-wide expression profiling reveals new insights into pathogenesis and progression of testicular germ cell tumors. *Cancer Genomics Proteomics.* 2007; 4(5): 359–67.
52. Nettersheim D., Arndt I., Sharma R., Riesenbergs S., Jostes S., Schneider S. et al. The cancer/testis-antigen PRAME supports the pluripotency network and represses somatic and germ cell differentiation programs in seminomas. *Br. J. Cancer.* 2016; 115(4): 454–64.
53. Kloudova K., Hromadkova H., Partlova S., Brtnicky T., Rob L., Bartunkova J. et al. Expression of tumor antigens on primary ovarian cancer cells compared to established ovarian cancer cell lines. *Oncotarget.* 2016; 7(29): 46120–6.
54. Partheen K., Levan K., Osterberg L., Horvath G. Expression analysis of stage III serous ovarian adenocarcinoma distinguishes a sub-group of survivors. *Eur. J. Cancer.* 2006; 42(16): 2846–54.
55. Partheen K., Levan K., Osterberg L., Claesson I., Fallenius G., Sundfeldt K. et al. Four potential biomarkers as prognostic factors in stage III serous ovarian adenocarcinomas. *Int J Cancer.* 2008; 123(9): 2130–7.
56. Partheen K., Levan K., Osterberg L., Claesson I., Sundfeldt K., Horvath G. External validation suggests Integrin beta 3 as prognostic biomarker in serous ovarian adenocarcinomas. *BMC Cancer.* 2009; 9: 336.
57. Morandi F., Chiesa S., Bocca P., Millo E., Salis A., Solari M. et al. Tumor mRNA-transfected dendritic cells stimulate the generation of CTL that recognize neuroblastoma-associated antigens and kill tumor cells: immunotherapeutic implications. *Neoplasia.* 2006; 8(10): 833–42.
58. Altvater B., Kailayangiri S., Theimann N., Ahlmann M., Farwick N., Chen C. et al. Common Ewing sarcoma-associated antigens fail to induce natural T cell responses in both patients and healthy individual. *Cancer Immunol. Immunother.* 2014; 63(10): 1047–60.
59. Spel L., Boelens J.J., van der Steen D.M., Blokland N.J., van Noesel M.M., Molenaar J.J. et al. Natural killer cells facilitate PRAME-specific T-cell reactivity against neuroblastoma. *Oncotarget.* 2015; 6(34): 35770–81.
60. Babiak A., Steinhauser M., Gotz M., Herbst C., Dohner H., Greiner J. Frequent T cell responses against immunogenic targets in lung cancer patients for targeted immunotherapy. *Oncol. Rep.* 2014; 31(1): 384–90.
61. Yan M., Himoudi N., Basu B.P., Wallace R., Poon E., Adams S. et al. Increased PRAME antigen-specific killing of malignant cell lines by low avidity CTL clones, following treatment with 5-Aza-2'-Deoxycytidine. *Cancer Immunol. Immunother.* 2011; 60(9): 1243–55.
62. Pollack S.M., Li Y., Blaisdell M.J., Farrar E.A., Chou J., Hoch B.L. et al. NYESO-1/LAGE-1s and PRAME are targets for antigen specific T cells in chondrosarcoma following treatment with 5-Aza-2-deoxycytidine. *PLoS One.* 2012; 7(2): e32165.
63. Zhang M., Graor H., Visioni A., Strohl M., Yan L., Caja K. et al. T cells derived from human melanoma draining lymph nodes mediate melanoma-specific antitumor responses in vitro and in vivo in human melanoma xenograft model. *J. Immunother.* 2015; 38(6): 229–38.
64. Weber J.S., Vogelzang N.J., Ernst M.S., Goodman O.B., Cranmer L.D., Marshall J.L. et al. A phase 1 study of a vaccine targeting preferentially expressed antigen in melanoma and prostate-specific membrane antigen in patients with advanced solid tumors. *J. Immunother.* 2011; 34(7): 556–67.
65. Gerard C., Baudson N., Ory T., Segal L., Louahed J. A comprehensive preclinical model evaluating the recombinant prame antigen combined with the as15 immunostimulant to fight against PRAME-expressing tumors. *J. Immunother.* 2015; 38(8): 311–20.
66. Pujol J.L., De Pas T., Rittmeyer A., Vallieres E., Kubisa B., Levchenko E. et al. Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapeutic in patients with resected non-small cell lung cancer: a phase I dose escalation study. *J. Thorac. Oncol.* 2011; 11(12): 2208–17.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.37:547.962.4].03:616.155.194-053.31-084].012.6

Оловникова Н.И., Николаева Т.Л., Эршлер М.А.

## ИММУНОПРОФИЛАКТИКА РЕЗУС-ИММУНИЗАЦИИ: ПЕРСПЕКТИВА СОЗДАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ НОВОРОЖДЕННЫХ

ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, 125167, Москва, Россия

Анти-резус (D) иммуноглобулин является единственным препаратом, способным избирательно блокировать нежелательный иммунный ответ на конкретный антиген. Благодаря разработке этого уникального препарата появилась возможность предотвращать иммунизацию D-отрицательных женщин D-положительными эритроцитами плода/ новорожденного и резко снизить частоту гемолитической болезни – тяжелой патологии плода, вызванной иммунными антителами матери. Анти-D иммуноглобулин, который получают из сывороток иммунных доноров, используется в клинической практике около 50-ти лет, однако точный механизм действия препарата не ясен до сих пор. Исследование свойств и механизма действия анти-D иммуноглобулина, а также попытки создать моноклональный аналог поставили перед исследователями множество вопросов, выходящих далеко за рамки узкой клинической темы. В обзоре рассматриваются возможные механизмы иммуносупрессорного действия анти-D иммуноглобулина: антигенное маскирование, быстрое разрушение D-положительных эритроцитов под действием анти-D антител, элиминация антиген-специфических клонов В-клеток. Рассмотрены причины, почему не удавалось создать эффективный моноклональный препарат, протективные свойства которого не уступают сывороточному аналогу. Биохимические и эффекторные свойства сывороточного анти-D иммуноглобулина указывают на то, что за иммуносупрессорный эффект может отвечать фракция анти-D антител с уникальным паттерном гликозилирования. Воздействие на структуру гликана позволяет управлять эффекторными свойствами моноклональных антител и наделить их высоким сродством к рецептору FcγRIII, который вовлечён в быстрое выведение D-положительных эритроцитов из кровотока. В обзоре приводятся данные собственных исследований в этой области.

**Ключевые слова:** *резус; гемолитическая болезнь новорожденных; моноклональные антитела; гликозилирование; обзор.*

**Для цитирования:** Оловникова Н.И., Николаева Т.Л., Эршлер М.А. Иммунопрофилактика резус-иммунизации: перспектива создания моноклонального иммуноглобулина для предупреждения гемолитической болезни новорожденных. *Иммунология*. 2017; 38(6): 74-80. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-74-80>

*Olovnikova N.I., Nikolaeva T.L., Ershler M.A.*

### IMMUNIZATION OF RHESUS IMMUNIZATION: THE PROSPECT OF A MONOCLONAL IMMUNOGLOBULIN TO PREVENT HAEMOLYTIC DISEASE OF THE NEWBORN

Hematology research center of Minzdrav of Russia, 125167, Moscow, Russia

Anti-Rhesus (D) immunoglobulin is the only drug that selectively blocks an unwanted immune response to a specific antigen. Due to the development of this unique drug, it has become possible to prevent the immunization of D-negative women with D-positive fetus/ newborn erythrocytes and dramatically reduce the frequency of hemolytic disease - a severe fetal pathology caused by the mother's immune antibodies. Anti-D immunoglobulin, which is obtained from the sera of immune donors, has been used in clinical practice for about 50 years, but the exact mechanism of action of the drug is not clear until now. The study of the properties and mechanism of the action of anti-D immunoglobulin, as well as attempts to create a monoclonal analogue, put before the researchers a lot of questions that go far beyond a narrow clinical topic. The review considers possible mechanisms of immunosuppressive action of anti-D immunoglobulin: antigen masking; rapid destruction of D-positive erythrocytes by anti-D antibodies; elimination of antigen-specific clones of B cells. The reasons why it was not possible to create an effective monoclonal preparation, the protective properties of which are not inferior to the serum analogue, are considered. The biochemical and effector properties of serum anti-D immunoglobulin indicate that the fraction of anti-D antibodies with a unique glycosylation pattern can respond to the immunosuppressive effect. The effect on the glycan structure allows controlling the effector properties of monoclonal antibodies and conferring a high affinity for the FcγRIII receptor, which is involved in the rapid excretion of D-positive red blood cells from the bloodstream. The review contains data from our own research in the field.

**Key words:** *Rhesus; hemolytic disease of newborn; monoclonal antibodies; glycosylation; review.*

**For citation:** Olovnikova N.I., Nikolaeva T.L., Ershler M.A. Immunization of rhesus immunization: the prospect of a monoclonal immunoglobulin to prevent haemolytic disease of the newborn. *Immunologiya*. 2018; 39(1): 74-80. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-74-80>

**For correspondence:** *Ershler Maxim Aleksandrovich*, Ph.D., Senior Research Fellow, Hematopoiesis Physiology Lab, National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russia, E-mail: [ershler@yandex.ru](mailto:ershler@yandex.ru)

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

**Acknowledgments.** *The study had no sponsorship.*

Received 03.10.17  
Accepted 16.12.17

**Для корреспонденции:** Эршлер Максим Александрович, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения Гематологического научного центра Минздрава России, 125167, Москва, E-mail: [ershler@yandex.ru](mailto:ershler@yandex.ru)

Профилактика анти-D сенсibilизации – клиническое применение антиген-специфической иммуносупрессии

На сегодняшний день описано 36 эритроцитарных систем антигенов, включающих более 300 антигенов групп крови, и потенциально многие из них способны вызвать иммунный ответ у реципиента. Иммунный ответ может быть следствием трансфузии, трансплантации, беременности. Иммунные антитела вызывают посттрансфузионные реакции у пациентов, получивших при переливании крови несовместимые эритроциты. Проникая через плаценту, иммунные антитела матери также могут привести к гемолизу эритроцитов плода.

На основании многолетнего клинического опыта выделены наиболее трансфузионно опасные антигены групп крови, по которым определяют совместимость крови для переливания с целью избежать осложнения и сенсibilизации. Резус-типирование крови реципиентов и доноров, а также профилактика резус-сенсibilизации в родах являются обязательными, и тем не менее анти-D антитела остаются основной причиной гемолитической болезни новорожденных (ГБН).

Резус-принадлежность крови человека определяют по наличию или отсутствию на его эритроцитах антигена D системы Резус: D<sup>+</sup> лица считаются резус-положительными, а D<sup>-</sup> лица – резус-отрицательными. Антиген D является высокоиммуногенным и встречается у части населения (около 85% белого населения являются D<sup>+</sup>), что создаёт предпосылки для несовместимых трансфузий, а также иммунизации резус-отрицательных женщин эритроцитами D<sup>+</sup> плода. Несмотря на небольшой объём крови плода, который попадает в организм матери во время беременности или родов (при неосложнённых родах это менее 1 мл), такого количества достаточно, чтобы около 13% D<sup>-</sup> женщин оказались иммунизированными после первой беременности D<sup>+</sup> плодом [1]. При последующих беременностях иммунные анти-D антитела класса IgG проникают через плаценту и вызывают гемолиз у D<sup>+</sup> плода, что приводит к патологии плода/новорожденного – ГБН. Трансплацентарный перенос IgG является физиологическим процессом и осуществляется при участии рецепторов FcRn [2]. До эры иммунопрофилактики около 10% всех случаев гибели новорождённых было вызвано ГБН [3].

Идея использовать анти-D антитела для предотвращения D-иммунизации была экспериментально проверена в 50 – 60-х годах прошлого века двумя группами исследователей. К тому времени из клинических наблюдений было известно, что ABO-несовместимость плода и матери снижает вероятность D-иммунизации [4]. Предполагалось, что разрушение эритроцитов плода естественными анти-A/анти-B антителами в организме матери и быстрое выведение в печени предотвращает их попадание в органы иммунитета. Экспериментальная проверка подтвердила, что ABO-несовместимость оказывает частичную защиту от D-иммунизации [5]; в той же работе было показано, что анти-D IgG антитела также оказывают протективное действие. Взяв за основу эти факты, группа английских исследователей провела испытания, в которых D<sup>-</sup> волонтерам вводили D<sup>+</sup> эритроциты и затем анти-D сыворотку, и показала, что IgM анти-D неэффективны, в то время как IgG анти-D обладают высокой протективной эффективностью [6]. Аналогичные эксперименты одновременно проводились в Нью-Йорке, иным было только теоретическое обоснование [7]. Авторы решили применить в клинической практике феномен, который был описан первым Нобелевским лауреатом в области физиологии и медицины Адольфом фон Берингом в конце XIX века и который теперь носит название антитело-опосредованной иммуносупрессии (AMIS – antibody mediated immune suppression). Этот феномен заключается в способности пассивных IgG антител к антигену предотвращать иммунный ответ на данный антиген [8]. Основываясь на феномене антитело-опосредованной иммуносупрессии, можно было ожидать, что анти-D анти-

тела, введённые одновременно с D<sup>+</sup> эритроцитами, будут блокировать анти-D иммунный ответ. Блестящие результаты экспериментов и последующих клинических испытаний анти-D иммуноглобулина (анти-D ИГ) по обе стороны Атлантики привели к тому, что профилактика D-иммунизации с помощью анти-D ИГ стала в акушерстве обязательной процедурой, а ГБН – редкой патологией. Массовая профилактика после родов снизила частоту сенсibilизации женщин в 10 раз [1], оставшиеся 1,5% иммунизировались во время беременности. Последующие клинические испытания показали, что дополнительное введение анти-D ИГ на 28 – 34 неделе беременности позволяет еще в 10 раз сократить число иммунизированных женщин [3]. Применение анти-D ИГ во время беременности безопасно для плода, так как концентрация антител не достигает величины, способной вызвать существенное разрушение эритроцитов плода [9, 10]. Сейчас каждая неиммунизированная D<sup>-</sup> женщина должна получить по 1 дозе препарата (в разных странах доза колеблется от 150 до 300 мкг анти-D антител) до и после рождения D<sup>+</sup> ребенка независимо от его ABO-принадлежности.

Наиболее яркой характеристикой анти-D ИГ является его способность вызывать быстрое выведение D<sup>+</sup> эритроцитов из циркуляции и разрушение их в селезенке [11]. Селезенка – иммунный орган, однако попадание туда D<sup>+</sup> эритроцитов под действием анти-D ИГ приводит не к сенсibilизации, а, напротив, к подавлению иммунного ответа. Анти-D ИГ способен предотвращать только первичный анти-D ответ и не работает против вторичного ответа [12]. Что за процесс (или совокупность процессов) лежит в основе иммунопрофилактики D-иммунизации, мы продолжаем исследовать до сих пор. Ответ на этот вопрос интересен не только с академической точки зрения, но важен и с практической стороны. Анти-D ИГ производят из сывороток иммунных доноров путём выделения фракции IgG. Для проведения массовой профилактики D-иммунизации требуются большие объёмы препарата, который вводят не только после родов, но и в последнем триместре беременности, после аборта, после терапевтического и диагностического амниоцентеза и т. д. Разработка технологий получения моноклональных анти-D антител человека породила большие надежды на то, что будет найден альтернативный источник для производства анти-D ИГ. Так Однако до сих пор и не получен эффективный моноклональный анти-D ИГ при том, что целый спектр моноклональных антител (МКА) других специфичностей уже используется в клинической практике.

#### Механизм иммуносупрессорного действия анти-D ИГ

Из механизмов, предложенных в литературе для объяснения феномена антитело-опосредованной иммуносупрессии, три представляются наиболее правдоподобными:

- 1) механизм антигенного камуфляжа;
- 2) быстрое выведение антигена в комплексе с антителом;
- 3) избирательное подавление антиген-специфических В-клеток.

Для осуществления первого механизма не требуются Fc-фрагменты антител; второй и третий зависят от свойств Fc-фрагментов и характера их взаимодействия с Fc-рецепторами (FcγR), то есть с рецепторами к Fc-фрагменту IgG. Взаимодействие Fc-участков иммунных антител с комплементом и FcγR на эффекторных клетках играет ключевую роль в физиологическом ответе организма на присутствие иммунных комплексов [13]. Способность активировать систему комплемента лежит в основе действия многих терапевтических МКА, однако здесь этот аспект не рассматривается, поскольку этот механизм не вовлечён в клиренс D<sup>+</sup> эритроцитов под действием анти-D.

FcγR – это группа мембранных гликопротеинов, которые принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов и экспрессируются на иммунных клетках. Различают три класса FcγR:

Fc $\gamma$ R I (CD64), Fc $\gamma$ R II (CD32) и Fc $\gamma$ R III (CD16). Важными характеристиками Fc $\gamma$ R являются аффинность в отношении IgG и характер трансдуцируемого ими сигнала – активирующий или ингибирующий. Высокоаффинный Fc $\gamma$ RI обладает высоким сродством к IgG и способен связывать не только IgG в составе иммунных комплексов, но и мономерные молекулы. Остальные рецепторы распознают только IgG в комплексе с антигеном. Связывание Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA и Fc $\gamma$ RIII ведёт к активации клетки. Физиологический ответ при этом зависит от типа клеток: это может быть клеточная цитотоксичность, фагоцитоз, эндоцитоз, высвобождение цитокинов или факторов воспаления [14, 15]. Напротив, Fc $\gamma$ RIIB генерирует ингибиторный сигнал, который подавляет активацию клетки в том случае, если одновременно она стимулирована через активирующий рецептор [16]. Способность антител связывать активирующие Fc $\gamma$ R и опосредовать цитолизис определяют в реакции антитело-зависимой цитотоксичности. Аналогичного функционального теста на сродство к Fc $\gamma$ RIIB не существует.

**Механизм антигенного камуфляжа.** При исследовании первичного иммунного ответа на антиген в присутствии антител к этому антигену использовали, как правило, избыточное количество антител, достаточное для связывания всех антигенных детерминант. В этих условиях иммуносупрессорный эффект IgG антител может быть связан с экранированием антигена [8, 17]. По-видимому, маскировкой антигена объясняется также антитело-опосредованная иммуносупрессия у мышей, лишённых всех Fc $\gamma$ R [18]. Этот факт в своё время произвёл большой переполох, поскольку участие Fc $\gamma$ R в регуляции иммунного ответа представлялось беспорным. В пользу гипотезы антигенного камуфляжа говорят данные о том, что F(ab)<sub>2</sub> фрагменты и IgE могут вызывать иммуносупрессию [18, 19].

Интересно, что в экспериментах по исследованию профилактической эффективности анти-D МКА на добровольцах мы также наблюдали эффект маскировки [20]. Одно из исследуемых МКА (G17) обладало уникальной способностью связывать *in vivo* максимальное число антигенных детерминант и полностью насыщать D<sup>+</sup> ЭР. Несмотря на это, МКА G17 слабо ускоряло выведение D<sup>+</sup> эритроцитов из циркуляции, и D<sup>+</sup> эритроциты, покрытые МКА, мы наблюдали в крови испытуемых в течение нескольких месяцев. Из 5 человек, получивших G17, ни у кого не были выявлены иммунные анти-D антитела в течение 6 мес., однако в дальнейшем трое из этой группы показали вторичный ответ при повторном введении D<sup>+</sup> эритроцитов. Исследование антитело-опосредованной иммуносупрессии, в том числе и у Fc $\gamma$ R-дефицитных мышей, зачастую ограничивалось изучением первичного ответа; вполне возможно, что при ре-иммунизации были бы получены результаты аналогичные нашим.

Таким образом, в определённых экспериментальных условиях антигенное маскирование может привести к антиген-специфической толерантности. Однако этот механизм не годится для объяснения анти-D иммуносупрессии, поскольку при введении стандартной дозы анти-D ИГ только около 10% антигенных детерминант оказываются закрытыми. Более того, для эффективной супрессии анти-D ответа достаточно около 200 молекул IgG анти-D на эритроцит [21, 22].

**Может ли быстрый клиренс D<sup>+</sup> эритроцитов *in vivo* под действием анти-D обеспечить иммуносупрессию?** Основным показателем эффективности большинства иммунопрепаратов является способность ускорять выведение клеток или молекул-мишеней. Для анти-D ИГ способность ускорять клиренс D<sup>+</sup> эритроцитов также считается важной характеристикой. Корреляция между скоростью клиренса и способностью анти-D вызывать иммуносупрессию была установлена много лет назад [23]. Считалось, что профилактика анти-D ответа объясняется быстрым устранением D<sup>+</sup> эритроцитов из циркуляции посредством их фагоцитоза макрофагами се-

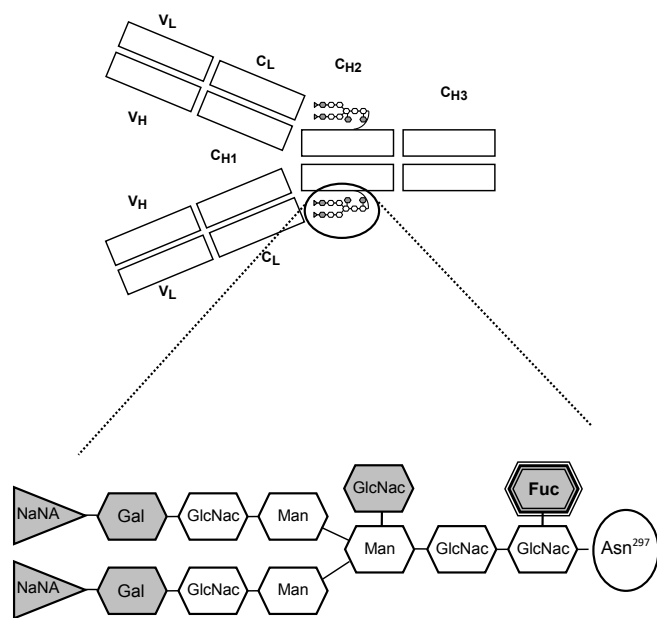
лезёнки [24]. Ключевую роль в захвате и разрушении покрытых антителами эритроцитов в селезёнке играет рецептор макрофагов Fc $\gamma$ RIIA [22, 25]. Все поликлональные анти-D как коммерческие препараты, так и индивидуальные сыворотки иммунных доноров и беременных женщин обладают способностью опосредовать гемолиз через Fc $\gamma$ RIIA [26, 27]. Несомненна роль Fc $\gamma$ RIIA в анти-опухолевом действии антител [28, 29].

Однако приведённые данные не позволяют ответить на ключевой вопрос, касающийся механизма иммуносупрессии: может ли сама по себе быстрая элиминация антигена из циркуляции обеспечить ускользание от иммунологического надзора и вызвать временную толерантность к данному антигену? С одной стороны, два таких различных процесса, как ускоренное выведение D<sup>+</sup> эритроцитов в печени под действием природных анти-A или анти-B антител, и в селезёнке под действием анти-D ИГ приводят к одинаковому результату – ингибированию иммунного ответа, и эти факты указывают на важность быстрого удаления из организма D<sup>+</sup> эритроцитов. С другой стороны, отмечалось, что анти-D оказывает иммуносупрессорное действие даже через две недели после поступления D<sup>+</sup> эритроцитов в организм [10], а скорость выведения эритроцитов может не влиять на эффективность профилактики [21]. Наши данные также указывают на то, что сам по себе быстрый клиренс не является достаточным условием успешного предотвращения иммунизации [20].

**Fc $\gamma$ RIIB – негативный регулятор В-клеточной дифференцировки.** К настоящему времени получены убедительные данные в пользу того, что антитело-опосредованная иммуносупрессия может регулироваться специальным механизмом, опосредованным ингибирующим рецептором Fc $\gamma$ RIIB. Этот единственный Fc $\gamma$ R рецептор, экспрессированный на В-клетках, играет центральную роль в негативной регуляции В-клеточного иммунного ответа [30, 31]. Дифференцировка и размножение В-клеток строго контролируются, не давая возможности бесконечно наращивать число В-клеток памяти, плазматических клеток и концентрацию антител в сыворотке. Контроль осуществляется иммунными комплексами антиген – IgG антитело, которые, связывая одновременно антиген-специфический рецептор В-клеток (BCR) и Fc $\gamma$ RIIB, вызывают подавление специфического В-клеточного клона [16]. Ингибирующая роль Fc $\gamma$ RIIB в регуляции BCR-зависимой активации убедительно показана на Fc $\gamma$ RIIB-дефицитных мышах [32]. У этих мышей повышен уровень антител в крови после иммунизации как тимус-зависимыми, так и тимус-независимыми антигенами, а также проявляются более тяжёлые симптомы аутоиммунных заболеваний и усиленные анафилактические реакции. В последнее время появилось множество данных о нарушении экспрессии Fc $\gamma$ RIIB при аутоиммунных заболеваниях человека [40]. Поскольку иммунные антитела могут участвовать в ограничении собственного производства, то поликлональные анти-D, получаемые от гипериммунных доноров, также должны быть наделены этим свойством. Это свойство мы и наблюдаем, когда вводим анти-D ИГ одновременно с антигеном, а именно с D<sup>+</sup> эритроцитами плода в крови роженицы.

Механизм ингибирования антиген-специфических клонов пусть схематически, но может объяснить загадочную способность антител к эритроцитарному антигену Келл одновременно подавлять иммунный ответ против антигена D [34]: в то время как BCR специфически распознает антиген D, Fc $\gamma$ RIIB взаимодействует с Fc-фрагментом любого антитела, связанного с другим антигеном на том же эритроците, и отменяет активирующий сигнал.

Неоднократно в литературе возникал вопрос, не является ли профилактический эффект анти-D ИГ результатом действия какой-то дополнительной фракции или неспецифического иммуномодулирующего действия [35]. Известно, что анти-D ИГ способен эффективно замедлять разрушение



Структура олигосахарида, связанного с аспарагином 297 IgG человека.

NaNA – N-ацетилнейраминная кислота; Gal – галактоза; GlcNAc – N-ацетилглюкозамин; Man – манноза; Fuc – фукоза; Asn297 – аспарагин Fc-участка IgG. (Нейтральные сахара не содержат сиаловых кислот (NaNA)); G2, G1 и G0 – нейтральные сахара с двумя, одной и без галактозы на конце цепи; VL, VH – переменные, CL, CH1, CH2, CH3 – константные участки IgG лёгкой и домены константного участка тяжёлой цепей IgG, соответственно (фоном выделены углеводные остатки, которые могут отсутствовать, создавая тем самым гетерогенность антител по углеводам. Фукоза выделена тройной рамкой).

тромбоцитов у резус-положительных больных аутоиммунной тромбоцитопенией [36]. Было показано, что введение анти-D сопровождается повышением в плазме уровня цитокинов интерлейкина-10 (IL-10), моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP-1), интерлейкина-6 и фактора некроза опухолей  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) [37]. Однако следует учитывать, что терапевтические дозы при этом заболевании (порядка 50 мг на кг веса пациента) существенно превышают профилактическую дозу анти-D ИГ, которая составляет 150 – 300 мкг.

#### Эффекторные свойства поли- и моноклональных антител зависят от гликозилирования Fc-фрагмента IgG

Взаимодействие с Fc $\gamma$ R на эффекторной клетке – это прерогатива Fc-фрагмента антитела. IgG – это гликопептид. Известно, что олигосахарид, связанный с Fc-фрагментом молекулы IgG ИГ через Asp297 влияет на фармакокинетику и эффекторные функции антитела, опосредованные взаимодействием Fc-фрагмента антитела с Fc $\gamma$ R-эффекторных клеток, хотя сам сахар напрямую и не контактирует с рецептором [38 – 40]. Дегликозилированные антитела не способны к взаимодействию с Fc $\gamma$ -рецепторами [41, 42]. Помимо гликанов, связанных с Asp<sup>297</sup>, антитела могут нести дополнительные гликаны в переменной области, однако они не влияют на взаимодействие с Fc $\gamma$ R. Структура олигосахарида IgG человека представлена на рисунке.

Неоднородность гликанов обусловлена в основном присутствием или отсутствием сиаловой кислоты, галактозы, бисекторного N-ацетилглюкозамина и фукозы (см. рисунок). Несмотря на многообразие форм, молярное соотношение между ними (гликопрофиль) в крови здоровых людей постоянно [43], но может сильно варьировать при различных заболеваниях, например, при ревматоидном артрите, болезни тяжёлых цепей, множественной миеломе [44, 45]. Полу-

ченные биотехнологическим путем МКА также характеризуются уникальным составом гликанов. Следует отметить, что хотя МКА производятся клонированными, т. е. выращенными из одной клетки линиями, гликаны при этом неоднородны. Гликопрофиль признан одной из важных характеристик терапевтических МКА [46, 47]. Гликопрофиль МКА и сывороточного IgG могут существенно отличаться. Многие отличия обусловлены использованием клеток грызунов (так, самые популярные в биопромышленности клеточные платформы для производства МКА – это клетки карциномы яичника китайского хомячка CHO и миеломы мыши Sp2/0), однако нелимфоидные клеточные линии человека также производят МКА, гликозилированные иначе, чем сывороточные IgG [48].

В современной биотехнологии олигосахарид является главной мишенью для воздействия на эффекторные функции МКА [46, 47, 49]. Многочисленными исследованиями установлено, что фукоза (см. рисунок) оказывает решающее влияние на способность МКА к взаимодействию с Fc $\gamma$ RIII: дефукозилированные антитела по сравнению с их фукозилированными двойниками проявляют повышенную цитотоксическую активность, которая к тому же не зависит от полиморфизма Fc $\gamma$ RIIIa [50 – 52]. Для МКА с дефукозилированным сахаром требуется более низкая плотность антигенных детерминант на поверхности клеток для инициирования эффективной антитело-опосредованной цитотоксичности [53]. В связи с тем, что именно цитотоксические свойства МКА лежат в основе действия многих противоопухолевых препаратов, это направление биоинженерии активно развивается. Есть созданы линии с редуцированным фукозилированием [50, 51, 54, 55].

Несомненно, что повышать средство антиопухолевых МКА к Fc $\gamma$ RIII целесообразно потому, что высокая цитотоксичность антител необходима для эффективного разрушения клеток опухоли. Однако анти-D антитела имеют другое назначение. Есть данные, что антитела с пониженным фукозилированием сильнее связываются не только с активирующим Fc $\gamma$ RIII, но и с ингибирующим Fc $\gamma$ RIIb [56]. На примере антиопухолевого моноклонального препарата Трастузумаб показано, что варианты с высоким средством к Fc $\gamma$ RIIIa существенно лучше связывали и Fc $\gamma$ RIIb [57]. Таким образом, стремясь получить МКА с высоким средством к Fc $\gamma$ RIII, мы рассчитываем не только достичь максимально быстрого выведения D<sup>+</sup> эритроцитов, но и одновременно усилить средство к другим низкоаффинным рецепторам, и в первую очередь к Fc $\gamma$ RIIb.

В процессе разработки моноклонального анти-D ИГ мы показали, в каких широких пределах может изменяться функциональная активность МКА с зависимости от способа его производства. В этой работе одно и то же анти-D IgG1 МКА экспрессировали в различных клеточных линиях человека и грызунов, а также в присутствии веществ, изменяющих характер гликозилирования. Мы наблюдали драматические изменения цитотоксических свойств МКА, причём активность, опосредованная рецептором Fc $\gamma$ RIII, зависела только от содержания дефукозилированных олигосахаридов [58, 59].

Золотым стандартом при исследовании биохимических и физиологических свойств МКА является поликлональный анти-D ИГ, эффективность которого проверена и в эксперименте, и многолетним клиническим применением. Мы обнаружили, что выделенные из поликлонального препарата анти-D антитела имеют иной профиль гликозилирования, чем неспецифические иммуноглобулины сыворотки, а именно более высокое содержание нефукозилированных сахаров [58, 59]. Тот же феномен наблюдался и на примере иммунных антител к другим антигенам эритроцитов и тромбоцитов [60 – 62].

Если влияние фукозы на эффекторные свойства анти-D антител бесспорно, то роль других остатков в ускорении клиренса и ингибировании анти-D иммунного ответа не очевид-

на. Так, наличие галактозы (см. рисунок) в составе гликана индуцирует конформационное преобразование Fc-домена, усиливая связывание с C1q-компонентом комплемента, однако не ясно, влияет ли галактозилирование на связывание с FcγRIIIa и антители-зависимую цитотоксичность МКА [63]. Не ясна и роль сиалирования в действии анти-D ИГ, хотя показано, что сиалирование оказывает влияние на иммуномодулирующее действие неспецифического иммуноглобулина [64]. В наших экспериментах *in vitro* гемолитическая активность анти-D МКА зависела только от пониженного содержания дефукозилированных гликанов и не зависела от наличия или отсутствия других остатков, но не всегда результаты, полученные *in vitro*, могут предсказывать эффекты МКА *in vivo*.

#### Что показали испытания анти-D МКА *in vivo*

Подробный обзор результатов испытаний анти-D МКА на добровольцах представлен в обзоре [65]. На добровольцах в мире испытано уже более 10 МКА разного происхождения: из В-лимфобластоидных клеточных линий человека, гетерогридом человек – мышь, СНО, YB2/0 (миелома крысы). Большинство препаратов – это IgG1 человека. Схема таких испытаний имитировала последовательность событий при родах: резус-отрицательному реципиенту вводили 1 – 10 мл D<sup>+</sup>-эритроцитов, после чего следовало внутривенное или внутримышечное введение анти-D. Пробы крови брали с такими интервалами, чтобы определить скорость начального выведения D<sup>+</sup>-эритроцитов и вовремя обнаружить иммунные анти-D антитела. И, наконец, не раньше, чем через 6 мес, повторно вводили D<sup>+</sup>-эритроциты, чтобы выявить состояние сенсибилизации у тех испытуемых, у которых не были обнаружены антитела: если наблюдался иммунный ответ по типу вторичного ответа, это указывало на состояние сенсибилизации и неэффективность профилактики. Эксперименты на добровольцах выявили такие свойства МКА, которые невозможно было предсказать ни теоретически, ни исходя из их свойств в тестах *in vitro*, поставив множество новых вопросов.

1. Несмотря на то что ускорение выведения D<sup>+</sup>-эритроцитов является наиболее яркой характеристикой сыровоточного анти-D ИГ – и именно этого свойства добивались в первую очередь создатели анти-D препаратов – быстрое выведение не является единственным условием профилактики анти-D сенсибилизации [20].

2. Во всех экспериментах, где испытывались анти-D МКА, продуцируемые гетерогридами человек – мышь, процент сенсибилизированных лиц был выше, чем в контрольной незащищенной группе независимо от скорости выведения эритроцитов. Такие анти-D МКА демонстрировали эффект адьюванта и скорее стимулировали, чем подавляли иммунный ответ [20, 66]. По-видимому, МКА гетерогридомного происхождения, содержащие чужеродные гликаны, могут распознаваться рецепторами врожденного иммунитета, что приводит к стимуляции иммунного ответа на соответствующий антиген [65].

3. Не получен ответ на вопрос, какой класс анти-D более эффективен, IgG1 или IgG3, и необходима ли смесь МКА различных классов. Полученные данные не позволяют увидеть преимущество смеси IgG1 + IgG3, в которой антитела взяты в физиологическом соотношении, перед одним IgG1 МКА [67, 68].

4. Нет ответа, может ли олигоклональная смесь антител одного класса быть более эффективной, чем одно антитело. Первый псевдополиклональный препарат Rozrolimurab, состоящий из 25 уникальных анти-D МКА, произведенных в клетках СНО, исследуется для использования в лечении идиопатической тромбоцитопенической пурпуры [69].

На сегодняшний день из всех испытанных *in vivo* препаратов два типа анти-D МКА показали реальные защитные свойства. Во-первых, это МКА, продуцируемые

В-лимфобластоидными линиями человека и способные опосредовать гемолиз через FcγRIIIa в тестах *in vitro*. Защитный эффект этих МКА был такой же, как у анти-D ИГ, а отсутствие иммунного анти-D ответа у большинства испытуемых после повторной незащищенной иммунизации D<sup>+</sup> эритроцитами показало, что супрессия носит длительный характер [67, 68]. К сожалению, В-лимфобластоидные линии отличаются нестабильным ростом и не могут служить основой крупномасштабного производства. Второй эффективный препарат – моноклональный анти-D препарат Roledumab, испытания которого в настоящее время проводит французская компания LFB Biotecnologies. В основе препарата Roledumab лежат человеческие анти-D МКА с пониженным содержанием фукозы, продуцируемые крысиной миеломой YB2/0, и мы с нетерпением ожидаем результатов клинических испытаний [70]. Несмотря на то что МКА производятся клетками крысы и их профиль гликозилирования отличается от естественного, препарат показал высокую эффективность в экспериментах на добровольцах при отсутствии побочных эффектов [71].

#### Заключение

Первый анти-D ИГ (RhoGam, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan NJ) был зарегистрирован в Северной Америке в 1968 г. Таким образом история клинического применения этого препарата приближается к 50-ти годам. Анти-D является самым востребованным из плазменных глобулинов, причём наибольший его рынок приходится на развитые страны. В России введение анти-D ИГ резус-отрицательным женщинам во время беременности и после родов также является обязательной процедурой<sup>1</sup>. Тем не менее частота ГБН составляет, по данным разных авторов, от 6 до 9 случаев на 1000 родов, то есть не намного ниже, чем в эпоху до профилактики, и не имеет тенденции к снижению [72, 73]. Объясняет этот факт острая нехватка препарата в нашей стране: отечественный анти-D ИГ производится сейчас только на одном предприятии, а импортные препараты обеспечивают менее четверти от потребности. Такой дефицит приводит к тому, что анти-D ИГ не вводят всем нуждающимся в профилактике роженицам, и потому анти-D антитела по-прежнему остаются основной причиной ГБН. Дефицит сырья для производства анти-D ИГ, которым являются сыроворотки от иммунных доноров, существует во всем мире. Именно поэтому усилия биотехнологов так упорно направлены на создание моноклонального аналога. Существование высокоэффективного сыровоточного прототипа заведомо ставит высокую планку перед исследователями, поскольку биотехнологический препарат должен быть не менее активным. История поиска подходящих моноклональных анти-D антител принесла много разочарований, однако накопленные за последние годы научные факты и методические достижения позволяют надеяться на успешное решение этой сложной и увлекательной задачи.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1—19, 21—47, 49—57, 59—71)

20. Оловникова Н.И., Белкина Е.В., Дризе Н.И., Леменева Л.Н., Митерев Г.Ю., Николаева Т.Л., и др. Быстрый клиренс резус-положительных эритроцитов моноклональными анти-резус антителами - недостаточное условие эффективной профилактики резус-сенсибилизации. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000; 129(1): 77–81.

<sup>1</sup> Приказ МЗ РФ от 1 ноября 2012 года № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю "акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)»).

48. Оловникова Н.И., Григорьева О.В., Петров А.В. Эффекторное свойство и характер гликозилирования рекомбинантных анти-D-IgG1-антител человека, продуцируемых линией клеток человека PER.C6®. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012; 154(8): 209–14.
58. Оловникова Н.И., Эршлер М.А., Григорьева О.В., Петров А.В., Митерев Г.Ю. Воздействие на профиль N-гликозилирования моноклональных антител как способ управления их иммунорегуляторными и цитотоксическими свойствами. Биохимия. 2012; 77(8): 1122–32.
72. Суханова Л.П. Перинатальные проблемы воспроизводства населения России в переходный период. М.: Реабилитация, Канон+, 2006.
73. Конопляников А.Г. Современные аспекты патогенеза гемолитической болезни плода и новорожденного. Вестн. РГМУ. 2008; 6: 38–42.
19. Karlsson M.C., Diaz de Ståhl T., Heyman B. IgE-mediated suppression of primary antibody responses in vivo. *Scand. J. Immunol.* 2001; 53(4): 381–5.
20. Olovnikova N.I., Belkina E.V., Drize N.I., Lemeneva L.N., Miterev G.Yu., Nikolaeva T.L. et al. Rapid clearance of RH positive red cells with monoclonal anti-RH antibody - insufficient condition for effective prevention of RH sensitization. *Bulleten experimentalnoy biologii i meditsiny.* 2000; 129(1): 77–81. (in Russian)
21. Kumpel B.M., Judson P.A. Quantification of IgG anti-D bound to D-positive red cells infused into D-negative subjects after intramuscular injection of monoclonal anti-D. *Transfus. Med.* 1995; 5(2): 105–12.
22. Kumpel B.M. On the immunologic basis of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis. *Transfusion.* 2006; 46(9): 1652–6.
23. Mollison P.L. Some aspects of Rh hemolytic disease and its prevention. In: G. Garraty, Ed. *Hemolytic disease of the newborn.* 1984. Arlington VA, American Association of Blood Banks.
23. Pollack W. Mechanisms of Rh Immune Suppression by Rh Immune Globulin. In: G. Garraty, Ed. *Hemolytic disease of the newborn.* 1984. Arlington, VA, American Association of Blood Banks.
24. Miescher S., Spycher M.O., Amstutz H., De Haas M., Kleijer M., Kalus U.J. et al. A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the FcγRIIA and FcγRIIIA genes. *Blood.* 2004; 103(11): 4028–35.
25. Armstrong-Fisher S.S., Sweeney G.M., Greiss M.A., Urbaniak S.J. Functional assessment of therapeutic anti-D immunoglobulin using Fc-mediated assays. *Transfus. Med.* 1995; 5(1): 21–9.
26. Hadley A.G. In vitro assays to predict the severity of hemolytic disease of the newborn. *Transfus. Med. Rev.* 1995; 9(4): 302–13.
27. Clynes R.A., Towers T.L., Presta L.G., Ravetch J.V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 2000; 6(4): 443–6.
28. Cartron G., Dacheux L., Salles G., Solal-Celigny P., Bardos P., Colombat P. et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood.* 2002; 99(3): 754–8.
29. Heyman B. Feedback regulation by IgG antibodies. *Immunol. Lett.* 2003; 88(2): 157–61.
30. Hjelm F., Carlsson F., Getahun A., Heyman B. Antibody-mediated regulation of the immune response. *Scand. J. Immunol.* 2006; 64(3): 177–84.
31. Takai T., Ono M., Hikida M., Ohmori H., Ravetch J.V. Augmented humoral and anaphylactic responses in FcγRII-deficient mice. *Nature.* 1996; 379(6563): 346–9.
32. Espéi M., Smith K.G., Clatworthy M.R. FcγRIIB and autoimmunity. *Immunol. Rev.* 2016; 269(1): 194–211.
33. Woodrow J.C., Clarke C.A., Donohoe W.T., Finn R., McConnell R.B., Sheppard P.M. et al. Mechanism of Rh prophylaxis: an experimental study on specificity of immunosuppression. *Br. Med. J.* 1975; 2(5962): 57–9.
34. Petri I.B., Lórinz A., Berek I. Detection of Fc-receptor-blocking antibodies in anti-Rh(D) hyperimmune gammaglobulin. *Lancet.* 1984; 2(8417-8418): 1378–9.
35. Imbach P., Barandun S., d'Apuzzo V., Baumgartner C., Hirt A., Morell A. et al. High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet.* 1981; 1(8232): 1228–31.
36. Cooper N., Heddle N.M., Haas M., Reid M.E., Lesser M.L., Fleit H.B. et al. Intravenous (IV) anti-D and IV immunoglobulin achieve acute platelet increases by different mechanisms: modulation of cytokine and platelet responses to IV anti-D by FcγRIIA and FcγRIIIA polymorphisms. *Br. J. Haematol.* 2004; 124(4): 511–8.
37. Radaev S., Sun P.D. Recognition of IgG by FcγRIIIA receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(19): 16478–83.
38. Raju T.S. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr. Opin. Immunol.* 2008; 20(4): 471–8.
39. Hanson Q.M., Barb A.W. A perspective on the structure and receptor binding properties of immunoglobulin G Fc. *Biochemistry.* 2015; 54(19): 2931–42.
40. Nose M., Wigzell H. Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983; 80(21): 6632–6.

## REFERENCES

41. Walker M.R., Lund J., Thompson K.M., Jefferis R. Aglycosylation of human IgG1 and IgG3 monoclonal antibodies can eliminate recognition by human cells expressing Fc gamma RI and/or Fc gamma RII receptors. *Biochem. J.* 1989; 259(2): 347–53.
42. Kobata A. Function and pathology of the sugar chains of human immunoglobulin G. *Glycobiology.* 1990; 1(1): 5–8.
43. Furukawa K., Kobata A. IgG galactosylation – its biological significance and pathology. *Mol. Immunol.* 1991; 28(12): 1333–40.
44. Omtvedt L.A., Royle L., Husby G., Sletten K., Radcliffe C.M., Harvey D.J. et al. Glycan analysis of monoclonal antibodies secreted in deposition disorders indicates that subsets of plasma cells differentially process IgG glycans. *Arthritis. Rheum.* 2006; 54(11): 3433–40.
45. Batra J., Rathore A.S. Glycosylation of monoclonal antibody products: Current status and future prospects. *Biotechnol. Prog.* 2016; 32(5): 1091–102.
46. Niwa R., Satoh M. The current status and prospects of antibody engineering for therapeutic use: focus on glycoengineering technology. *J. Pharm. Sci.* 2015; 104(3): 930–41.
47. Olovnikova N. And. Grigor'eva O.V., Petrov A.V. Effector properties and the nature of the glycosylation of recombinant anti-D-IgG1-human antibodies produced by cell line PER individual. C6®. *Bulleten experimentalnoy biologii i meditsiny.* 2012; 154(8): 209–14 (in Russian).
48. Parsons T.B., Struwe W.B., Gault J., Yamamoto K., Taylor T.A., Raj R. et al. Optimal Synthetic Glycosylation of a Therapeutic Antibody. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016; 55(7): 2361–7.
49. Shields R.L., Lai J., Keck R., O'Connell L.Y., Hong K., Meng Y.G. et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(30): 26733–40.
50. Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., Shoji-Hosaka E., Kanda Y., Sakurada M. et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(5): 3466–73.
51. Niwa R., Hatanaka S., Shoji-Hosaka E., Sakurada M., Kobayashi Y., Uehara A. et al. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of Fc gamma RIIIa functional polymorphism. *Clin. Cancer. Res.* 2004; 10(18 Pt 1): 6248–55.
52. Niwa R., Sakurada M., Kobayashi Y., Uehara A., Matsushima K., Ueda R. et al. Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. *Clin. Cancer. Res.* 2005; 11(6): 2327–36.
53. Yamane-Ohnuki N., Kinoshita S., Inoue-Urakubo M., Kusunoki M., Iida S., Nakano R., et al. Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol. Bioeng.* 2004; 87(5): 614–22.
54. Kanda Y., Yamane-Ohnuki N., Sakai N., Yamano K., Nakano R., Inoue M. et al. Comparison of cell lines for stable production of fucose-negative antibodies with enhanced ADCC. *Biotechnol. Bioeng.* 2006; 94(4): 680–8.
55. Sibéil S., de Romeuf C., Bihoreau N., Fernandez N., Meterreau J.L., Regenman A., et al. Selection of a human anti-RhD monoclonal antibody for therapeutic use: impact of IgG glycosylation on activating and inhibitory Fc gamma R functions. *Clin. Immunol.* 2006; 118(2-3): 170–9.
56. Lazar G.A., Dang W., Karki S., Vafa O., Peng J.S., Hyun L., et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(11): 4005–10.
57. Olovnikova N.I. Ershler M.A., Grigor'eva O.V., Petrov A.V., Miterev G.Yu. miterev impact on the profile of the N-glycosylation of monoclonal antibodies as a way to control their immunoregulatory and cytotoxic properties. *Biokhimiya.* 2012; 77(8): 1122–32. (in Russian)
58. Olovnikova N. Anti-RhD-Mediated Immunosuppression: Can Monoclonal Antibodies Imitate the Action of Polyclonal Antibodies? in Kapur S. and Portela M. B., eds. *Immunosuppression – Role in Health and Disease.* 2012; InTech, Rijeka, Croatia; 77–106.
59. Kapur R., Kustiawan I., Vestreheim A., Koeleman C.A., Visser R., Einarsdottir H.K. et al. A prominent lack of IgG1-Fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. *Blood.* 2014; 123(4): 471–80.
60. Kapur R., Della Valle L., Verhagen O.J., Hipgrave Ederveen A., Ligthart P., de Haas M. et al. Prophylactic anti-D preparations display variable decreases in Fc-fucosylation of anti-D. *Transfusion.* 2015; 55(3): 553–62.
61. Sonneveld M., van der Schoot C.E., Vidarsson G. Factors contributing to the pathogenesis of IgG-mediated alloimmune disease, *ISBT Science Series.* 2016; 11 (Suppl. 1), 126–32.
62. Raymond C., Robotham A., Spearman M., Butler M., Kelly J., Durocher Y. Production of  $\alpha$ 2,6-sialylated IgG1 in CHO cells. *MAbs.* 2015; 7(3): 571–83.
63. Kaneko Y., Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science.* 2006; 313(5787): 670–3.
64. Kumpel B.M. Lessons learnt from many years of experience using anti-D in humans for prevention of RhD immunization and haemolytic disease of the fetus and newborn. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 154(1): 1–5.
65. Béliard R. Monoclonal anti-D antibodies to prevent alloimmunization: lessons from clinical trials. *Transfus. Clin. Biol.* 2006; 13(1–2): 58–64.
66. Kumpel B.M. On the mechanism of tolerance to the Rh D antigen mediated by passive anti-D (Rh D prophylaxis). *Immunol. Lett.* 2002 ; 82(1-2): 67–73.
67. Beliard R., Waegemans T., Notelet D., Massad L., Dhainaut F., Romeuf C. et al. A human anti-D monoclonal antibody selected for enhanced Fc gamma RIII engagement clears RhD+ autologous red cells in human volunteers as efficiently as polyclonal anti-D antibodies. *Br. J. Haematol.* 2008; 141(1): 109–19.
68. Quagliaroli D. Do YB2/0 cells produce alien sugars? *Biochemistry (Mosc).* 2013; 78(12): 1371–3.
69. Easdale S., Stasi R. Rozrolimupab, a first-in-class recombinant monoclonal antibody product for primary immune thrombocytopenia. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2013; 13(7): 1085–92.
70. Sukhanova L.P. Perinatal problems of reproduction of the Russian population during the transition period. [Perinatal'nye problemy vosproizvodstva naseleniya Rossii v perekhodnyy period]. Moscow: Rehabilitation, Kanon+; 2006. (in Russian)
71. Konoplyanikov A.G. Modern aspects of the pathogenesis of hemolytic disease of the fetus and newborn. *Vestnik. RGMU.* 2008; 6: 38–42. (in Russian)



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.215.4.017.1

Щубелко Р.В.<sup>1</sup>, Зуйкова И.Н.<sup>2</sup>, Шульженко А.Е.<sup>2</sup>**МУКОЗАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ**<sup>1</sup>Многопрофильный Медицинский Центр «Клиника К+31», 119415, г. Москва;<sup>2</sup>ФГБУ Государственный научный центр Институт иммунологии ФМБА России, 115478, г. Москва

Иммунная система – это совокупность органов, тканей, клеток и белков, обеспечивающих защиту хозяина от патогенов в любой точке их проникновения и ограничивающих их распространение по всему организму.

В ходе эволюции в слизистых оболочках организовалась специфическая лимфоидная ткань – Mucosa associated lymphoid tissue (MALT), где формируются защитные реакции врождённого и адаптивного ответа на патогены. Лимфоидные ткани слизистых оболочек разных отделов имеют свои особенности, отвечающие потребностям их анатомического расположения. Так, слизистая оболочка ротоглотки обеспечивает одновременную обработку как пищевых, так и респираторных антигенов, сохраняя при этом основной иммунный гомеостаз. В этом обзоре рассмотрены структура и особенности организации иммунного ответа оро-фарингеальной слизистой оболочки.

**Ключевые слова:** мукозальная иммунная система; слизистая оболочка ротоглотки; лимфоциты.

**Для цитирования:** Щубелко Р.В., Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е. Мукозальный иммунитет верхних дыхательных путей. *Иммунология*. 2018; 39(1): 81-88. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-81-88>

*Shchubelko R.V.<sup>1</sup>, Zuikova I.N.<sup>2</sup>, Shuljenko A.E.<sup>2</sup>*

**MUCOSAL IMMUNITY OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT**<sup>1</sup> Multidisciplinary Medical Center “Clinic K+31”, 119415, Moscow;<sup>2</sup> FSBI National research Center Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

The immune system can be considered as a common throughout the body organ that protects the host from pathogenic microorganisms at any point of their penetration, limiting their distribution in this area. In the course of evolution in the mucous membranes of a specific organized lymphoid tissue - Mucosa associated lymphoid tissue (MALT), which formed a protective response of the innate and adaptive response to pathogens. The lymphoid tissue of the mucous membranes different departments have their own features that meet the needs of their anatomical location. So, the mucous membrane of the oropharynx provides simultaneous processing of both food and respiratory antigens, while maintaining the primary immune homeostasis. In this review viewed the structure and organization of the immune response in oropharyngeal mucosa.

**Key words:** mucosal immune system; mucosa of the oropharynx; lymphocytes.

**For citation:** Shchubelko R.V., Zuikova I.N., Shuljenko A.E. Mucosal immunity of the upper respiratory tract. *Immunologiya*. 2018; 39(1): 81-88. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-81-88>

**For correspondence:** *Shchubelko Rosalia V.*, doctor allergist-immunologist Multidisciplinary Medical Center “Clinic K+31”, E-mail: [spapharia@gmail.com](mailto:spapharia@gmail.com).

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

**Acknowledgments.** *The study had no sponsorship.*

Received 04.07.17

Accepted 16.08.17

В пределах иммунной системы можно выделить ряд анатомически различных областей, каждая из которых специально приспособлена для генерирования ответа на присутствующие в ней патогены. Каскад иммунных реакций, индуцированных в одной области, в значительной степени ею же и ограничивается. Таким образом, в организме человека можно выделить 4 условные зоны иммунитета:

1) системный иммунитет – иммунный ответ на антигены, которые проникли в ткани или попали в кровь;

2) местный иммунитет слизистых оболочек – область формирования иммунного ответа в зоне, где происходит проникновение большинства патогенных микроорганизмов;

3) иммунитет полостей тела (брюшина и плевра);

4) иммунитет кожи [1, 2].

Слизистые оболочки представляют собой тонкий и пронизываемый барьер, выстилающий внутренние части тела и обладающий выраженной физиологической активностью:

участие в газообмене (бронхо-лёгочная система), пищеварении (желудочно-кишечный тракт), сенсорной активности (глаза, нос и ротоглотка), выделении и размножении (урогенитальный тракт). Именно слизистые оболочки являются первым барьером на пути подавляющего большинства инфекционных агентов, поэтому в ходе эволюции они сформировали иммунобиологический комплекс эффективных механизмов защиты, направленных на обеспечение целостности макроорганизма. Здесь формируются защитные реакции врожденного и адаптивного ответа на патогены, толерантность к непатогенным организмам (комменсалам) и пищевым антигенам, развиваются различные патологические (аллергические, аутоиммунные, инфекционно-зависимые) реакции. Все эти функции обеспечиваются организованной лимфоидной тканью, ассоциированной со слизистыми оболочками, известной под аббревиатурой MALT (от англ.: Mucosa associated lymphoid tissue). В зависимости от анатомического расположения лимфоидной ткани слизистых различают NALT (nasopharynx-associated lymphoid tissue), BALT (bronchus-associated tissue), GALT (gut-associated lymphoid tissue) и SALT (skin-associated lymphoid tissue). Лимфоидные ткани слизистых оболочек разных отделов взаимосвязаны

**Для корреспонденции:** *Щубелко Розалия Васильевна*, врач-аллерголог-иммунолог Многопрофильного медицинского центра «Клиники К+31», E-mail: [spapharia@gmail.com](mailto:spapharia@gmail.com)

благодаря рециркуляции между ними лимфоцитов. В то же время лимфоидная ткань слизистых в определённой степени изолирована от других (периферических) вторичных лимфоидных органов в связи с автономностью путей рециркуляции лимфоцитов [2 – 4].

В отличие от системного иммунитета, который функционирует в стерильной среде и энергично реагирует на патогены, MALT защищает структуры, которые изобилуют инородными телами и поэтому должна экономично выбирать соответствующие эффекторные механизмы и регулировать их интенсивность, чтобы избежать повреждения тканей.

#### Мукозальный иммунитет ротоглотки – NALT

Ротоглотка является зоной активности NALT. Орофарингеальная слизистая оболочка обеспечивает одновременную обработку как пищевых, так и респираторных антигенов, поэтому обладает общими характеристиками гастроинтестинального и респираторного тракта, а также имеет свои собственные отличительные особенности.

Орофарингеальная слизистая образует механический барьер, более толстый и плотный, чем слизистая гастроинтестинального тракта. Морфологически она состоит из многослойного плоского эпителия, lamina propria (рыхлая соединительная ткань, лежащая под эпителием, которая содержит кровеносные и лимфатические сосуды), и подслизистого слоя (рис. 1) [2, 5].

Важную роль в физико-химическом гомеостазе ротоглотки играет слюна, защитные белки и пептиды которой могут связывать антигены, обеспечивая их агглютинацию и изоляцию на поверхности слизистой. Они также способны первично поражать патогены, обладая антибактериальными, противогрибковыми и противовирусными свойствами [6].

Иммунологический аппарат слизистых оболочек ротоглотки представлен организованными тканевыми структурами – неинкапсулированными скоплениями фолликулов, окружёнными лимфоидной тканью (кольцо Пирогова – Вальдейера: язычная, нёбные, трубные и глоточная миндалины), и диффузной лимфоидной тканью [5, 7].

Функционально различают афферентную (индуктивную) и эфферентную (эффекторную) зоны лимфоидных тканей слизистых оболочек [2, 5, 7].

Афферентная (индуктивная) зона орофарингеальной слизистой анатомически представлена нёбными миндалинами, слюнными железами, лимфоидными фолликулами и региональными лимфатическими узлами. Здесь происходит распознавание антигена, восприятие сигнала чужеродности, и дальнейшая обработка иммунологической информации. Эти функции обеспечиваются, в основном, дендритными клетками. Дендритные клетки, «запечатланные» при захвате антигена в разных участках лимфоидных тканей слизистых оболочек, мигрируют в регионарные лимфоузлы. Здесь они презентуют антиген Т-лимфоцитам, индуцируя экспрессию на формирующихся эффекторных Т-лимфоцитах и Т-клетках памяти, молекул адгезии и хемокиновых рецепторов. Благодаря этим структурам эффекторные Т-лимфоциты и Т-клетки памяти «находят» отдел слизистых оболочек, в котором произошёл захват антигена определёнными дендритными клетками. Способность клеток находить «свое место» в организме называют хомингом. В этом процессе задействованы 2 механизма – контактный, обеспечиваемый молекулами адгезии, которые находятся на поверхности лимфоцитов, и хемотаксис, определяющий направленность движения клеток и зависящий от наличия на их поверхности

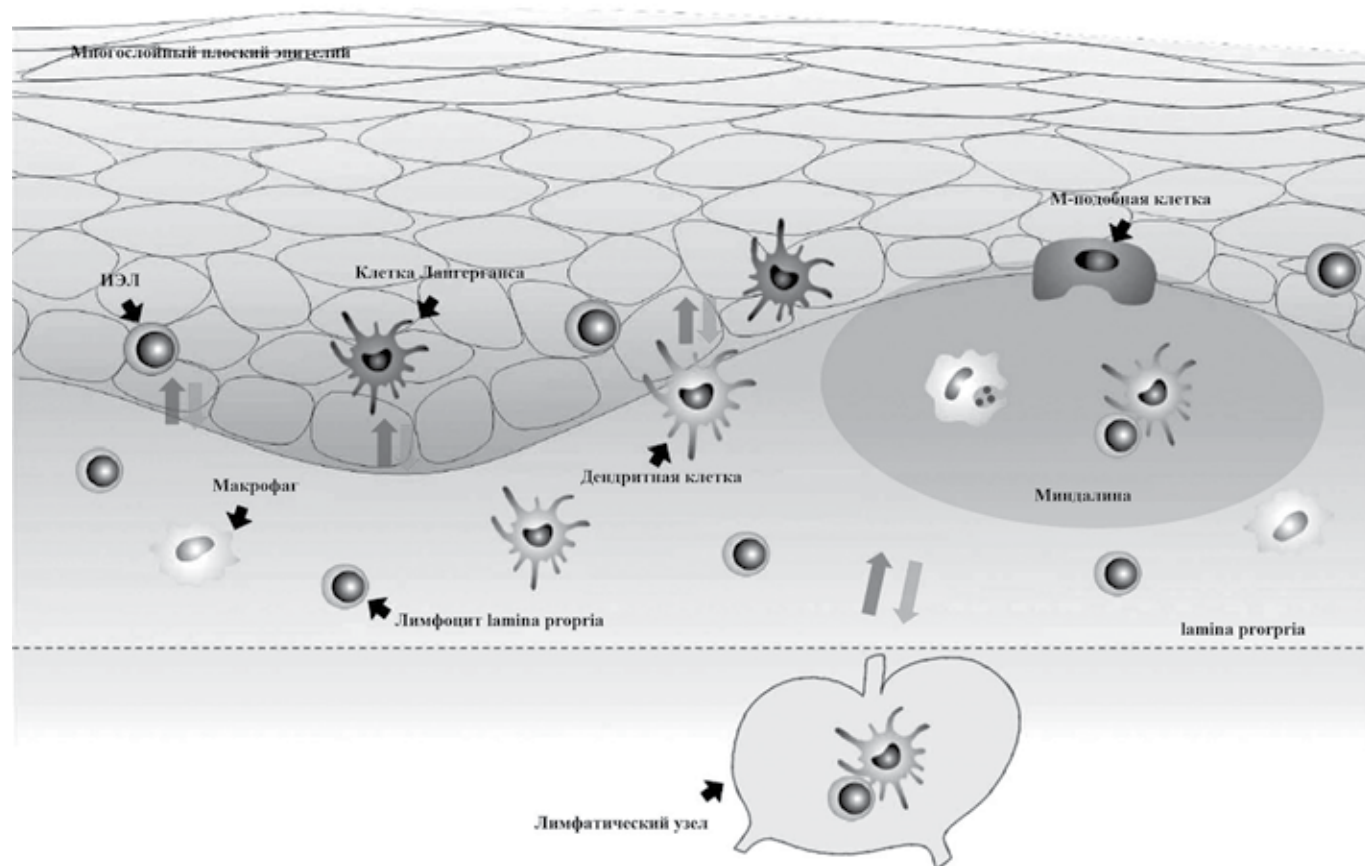


Рис. 1. Структура и иммунные клетки орофарингеальной слизистой.

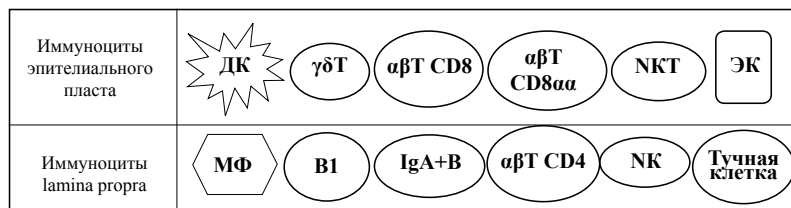


Рис. 2. Распределение клеток в слизистом и подслизистом слоях.

хемокиновых рецепторов. Аналогичным способом обеспечивается «прицельность» миграции в слизистые оболочки эффекторных В-лимфоцитов – предшественников антителопродуцентов и В-клеток памяти.

Эффекторный (исполнительный) отдел иммунной системы слизистых оболочек анатомически находится в эпителии, lamina propria и подслизистом слое. Сюда мигрируют активированные лимфоциты – функциональные представители эффекторной зоны. Все разновидности эффекторных Т-клеток, сформировавшихся в регионарном лимфатическом узле, покидают его с эфферентной лимфой и в составе лимфы грудного протока поступают в общий кровоток. Как уже упоминалось, дальнейшее распределение эффекторных Т-клеток определяется экспрессией ими молекул адгезии и хемокиновых рецепторов. Эти клетки мигрируют преимущественно в отделы, из которых происходят индуцированные дендритные клетки. Активированные Т-клетки попадают в эпителиальный пласт и lamina propria через плоский эпителий сосудов. Миграция лимфоцитов в слизистые оболочки усиливается при воспалительной реакции, когда происходит активация эндотелия сосудов мукозальной лимфоидной ткани [2, 7 – 9].

#### М-клетки

Известно, что в норме чужеродные молекулы и агенты непрерывно поступают в организм через слизистые оболочки. Их транспорт осуществляют специализированные клетки эпителия – М-клетки (от *microfold*) или М-подобные (*M-like*) клетки (для некоторых отделов слизистых оболочек, в том числе и для орофарингеальной слизистой). Благодаря особенностям строения, а именно коротким нерегулярным микроворсинкам (микроскладкам), которые увеличивают поглощающую поверхность, и свойствам трансклеточной передачи, М-клетки очень эффективны в плане отбора антигенного материала. Эти клетки присутствуют в составе фолликулярного эпителия, выстилающего поверхность слизистой оболочки над местами расположения лимфоидных фолликулов и пейеровых бляшек, имеют форму колокола, вогнутая часть которого обращена в сторону лимфоидных фолликулов (или пейеровых бляшек), содержащих Т- и В-лимфоциты, преимущественно клетки памяти и дендритные клетки. М-клетки составляют 10% всех клеток фолликулярного эпителия, они лишены слоя слизи, покрывающего другие эпителиальные клетки слизистых оболочек. Основное назначение М-клеток состоит в активном транспорте патогенов из полости органа в лимфоидные структуры. М-клетки захватывают антигенный материал путём эндоцитоза, который затем транспортируется через клетку в везикулах к базальной мембране, где высвобождается во внеклеточное пространство. Этот процесс известен как транзитоз. На базальной поверхности клеточная мембрана М-клеток контактирует с подлежащими лимфоцитами и антиген-представляющими клетками, которые захватывают транспортируемый материал, высвобождаемый из М-клеток, и обрабатывают его для представления антигена. Механизм транспорта не имеет отношения к МНС-зависимому (major histocompatibility complex) процессингу антигенов [5, 7].

#### Toll-like рецепторы

Toll-like-рецепторы (TLR) – эволюционно древняя система, включающая у человека 10 типов рецепторов, распо-

ложенных как внеклеточно (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и TLR10), так и внутриклеточно (TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9). Они распознают микробные продукты с конкретными структурными особенностями, классифицированными как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны или образы патогенности (pathogen-associated molecular pattern, PAMP).

Экспрессия рецепторов TLR является практически повсеместной на иммунных клетках, где они управляют механизмами врождённого и адаптивного иммунитета, и менее распространена в клетках негемопозитического происхождения, такие как клетки эпителия. Распознавание PAMP подготавливает клетки врождённого иммунитета к выполнению основной функции – удалению чужеродных агентов из внутренней среды организма.

Поскольку TLR специализируется в распознавании микробных продуктов, разумно предположить их высокую концентрацию в местах наибольшего контакта поверхностей макроорганизма с патогенами, а именно на слизистых оболочках. Экспрессия TLR-протеинов сильно варьирует и зависит от участка слизистой и её состояния (нормальное или воспалённое).

Кроме контакта с патогенами (PAMPs), иммунная система слизистых активно взаимодействует с комменсальной микробиотой (микроорганизмами, заселяющими человека, но не вызывающими заболевания), поэтому был введён термин DAMPs для комменсал-ассоциированных молекулярных паттернов (или более общий термин MAMPs – для микроорганизмов, ассоциированных молекулярных паттернов), которые также распознаются системой TLR.

Кроме того, эндогенные лиганды, которые вызывают воспаление при отсутствии инфекции, также могут активировать TLR-зависимый сигнал и определяются как опасность-ассоциированные молекулярные паттерны (молекулярные паттерны, ассоциированные с опасностью – *danger-associated molecular patterns*, DAMPs) [10 – 13].

#### Диффузная лимфоидная ткань

Диффузная лимфоидная ткань – это часть эфферентной зоны, представленная различными иммунокомпетентными клетками: Т- и В-лимфоцитами, дендритными клетками, макрофагами, NK- и НКТ-клетками, эпителиальными и тучными клетками. Состав диффузной лимфоидной ткани существенно различается в эпителиальном (собственно слизистом) и в подслизистом слоях (рис. 2).

В эпителии (слизистом слое) клетки эфферентного звена представлены интраэпителиальными Т-лимфоцитами (ИЭЛ), состоящими практически исключительно из клеток памяти или активированных лимфоцитов. Соотношение субпопуляций Т-клеток в этом слое различно в слизистых оболочках разных отделов.

Состав популяции клеток иммунной системы в подслизистом слое более разнообразен и близок по спектру к вторичным лимфоидным органам и крови. В подслизистом слое присутствуют типичные Т- и В-лимфоциты, NK-клетки, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, эозинофилы и тучные клетки. Соотношение субпопуляций Т-лимфоцитов в подслизистом слое близко к таковому в крови и лимфатических узлах. Хотя здесь преобладают клетки, ранее контактировавшие с антигеном (клетки памяти), выявляют и наивные лимфоциты, мигрирующие в эти ткани из кровотока [7, 15, 16].

#### Макрофаги

Наиболее важную роль в запуске иммунных процессов играют макрофаги – тканевые варианты моноцитов. Превращение моноцита в макрофаг происходит под влиянием тканевого микроокружения и сопровождается экспрессией новых генов, т. е. может рассматриваться как дифференцировка клеток. Эту дифференцировку регулирует макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF).

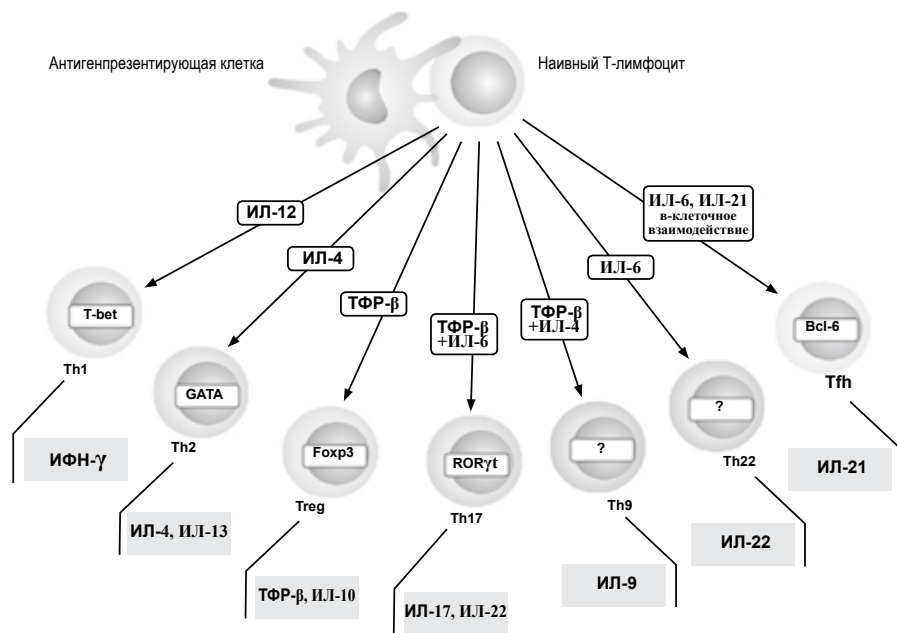


Рис. 3. Дифференциация Т-хелперов в зависимости от цитокинового окружения и их цитокиновые профили.

Выделяют две разновидности тканевых макрофагов: резидентные и воспалительные. Резидентные макрофаги заселяют ткани на различных этапах эмбриогенеза. Они приобретают тканеспецифичные характеристики и поддерживают свою численность за счёт пролиферации *in situ*. Кроме того, резидентные макрофаги постоянно дифференцируются в результате спонтанной миграции CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов из кровотока в ткани под влиянием невоспалительных, так называемых гомеостатических хемокинов. Резидентные макрофаги участвуют в гомеостатических процессах: обменных, регуляторных и репаративных. Они утилизируют повреждённые, стареющие и апоптозные клетки, способствуют резорбции очагов воспаления и некроза и заживлению ран; фагоцитируют иммунные комплексы и продукты лизиса клеточных структур, образующиеся в результате комплементзависимого лизиса и цитолитического действия эффекторных Т-лимфоцитов. Также они являются профессиональными антиген-презентирующими клетками (АПК).

Резидентные тканевые макрофаги относятся к долгоживущим клеткам: продолжительность их жизни исчисляется месяцами и годами. Если не происходит их мобилизации в очаг инфекции или воспаления, они могут погибать, мигрируя в селезёнку или лимфатические узлы.

Большое количество резидентных макрофагов находится в соединительной ткани, в лимфоузлах и лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми, в том числе со слизистыми воздухоносных путей.

Вторая популяция представлена относительно короткоживущими макрофагами моноцитарного (костномозгового) происхождения. Относительное содержание таких клеток в ткани зависит от её типа и возраста организма. Количество макрофагов моноцитарного происхождения резко увеличивается при воспалении и нормализуется по его окончании.

Воспалительные тканевые макрофаги образуются из CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> моноцитов, которые содержат на своей поверхности множество рецепторов для воспалительных хемокинов, в первую очередь CCR2, который является маркером CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> моноцитов и отсутствует у резидентных макрофагов, благодаря чему экспрессирующие CCR2-

моноциты мигрируют в очаги воспаления.

Воспалительные макрофаги являются одними из основных эффекторных клеток врождённого иммунитета, так как осуществляют фагоцитоз и внутриклеточный киллинг большинства патогенов. Продуцируя большое количество провоспалительных цитокинов, эти клетки стимулируют развитие защитной воспалительной реакции и вовлекают в неё другие клетки врождённой и адаптивной иммунной системы.

Таким образом, основными функциями моноцитов/макрофагов является фагоцитоз, презентация антигена и секреторная активность.

Функция фагоцитоза реализуется благодаря большому разнообразию мембранных молекул на поверхности моноцитов/макрофагов – экспрессируемых рецепторов. Наиболее важные в функциональном отношении – это TLR, все разновидности которых представлены на макрофагах, что даёт им возможность распознавать фактически все основные группы паттернов. Благодаря экспрессии лектиновых рецепторов, макрофаги распознают и элиминируют «старые клетки» организма. Экспрессия макрофагами

разнообразных Fc-рецепторов обеспечивает распознавание Fc-участков молекул иммуноглобулинов и фагоцитоз опсонизированных ими клеток. Этому способствует и экспрессия на поверхности макрофагов рецептора для комплемента (CR).

Поскольку для проявления функциональной активности моноцитам/макрофагам важно взаимодействие с межклеточным матриксом (в процессе миграции) и с другими клетками (при участии в реакциях иммунитета), на их поверхности также представлено большое число молекул адгезии.

Презентация антигена – узловое событие иммунного ответа, связывающего реакции врождённого и адаптивного иммунитета. Презентация антигена макрофагами обеспечивается экспрессией на их поверхности молекул класса МНС и ко-стимулирующих молекул. Таким образом, макрофаги, наряду с дендритными клетками и В-лимфоцитами, являются «профессиональными» АПК.

Ещё одна группа мембранных молекул – рецепторы для цитокинов. Особенно важны рецепторы макрофагов для интерферона-гамма (ИФН-γ), для провоспалительных цитокинов, которые они сами же и секретируют (интерлейкин-1, фактор некроза опухоли -ИЛ-1, ФНО), а также рецепторы для интерлейкинов 6, 8, 12 (ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Кроме того, макрофаги экспрессируют рецепторы для хемокинов, особенно провоспалительных.

Среди секреторных продуктов макрофагов наиболее важную роль в развитии воспаления и реакций врождённого иммунитета играют цитокины. Их секреция происходит, как правило, после активации клетки. Спектр цитокинов, секретируемых макрофагами, очень широк: цитокины семейства ИЛ-1, ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-23, ИЛ-27, ГМ-КСФ, Г-КСФ, М-КСФ, ИФН-α, ИФН-β, ИФН-γ, ИЛ-15 (гомеостатический), супрессорные цитокины (ИЛ-10, ТФР-β) ростовые/ангиогенные факторы, провоспалительные хемокины, макрофагальные воспалительные и хемотаксические белки.

Также моноциты/макрофаги секретируют некоторые ферменты, гормоны, катионные белки, протеогликаны, метаболиты арахидоновой кислоты, компоненты комплемента,

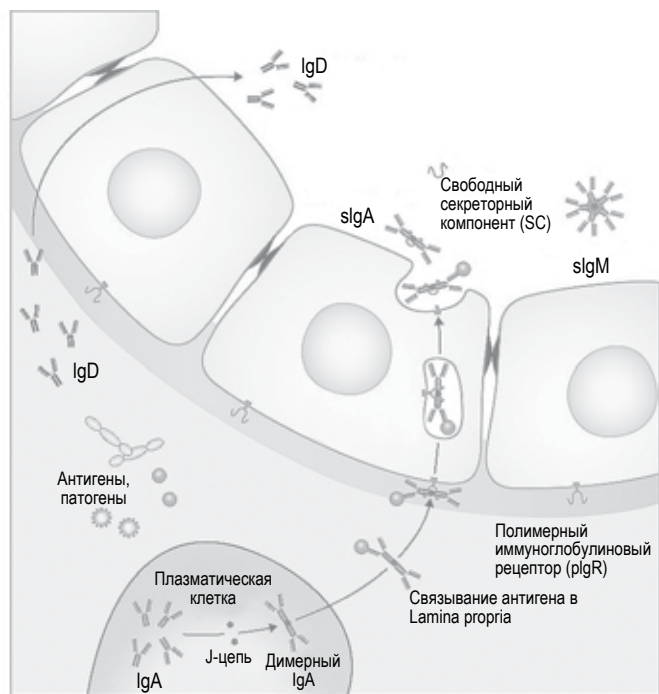


Рис. 4. Иммуноглобулины слизистых оболочек.

белки межклеточного матрикса. С секреторной активностью связано выполнение макрофагами таких функций, как поставка ряда гуморальных факторов для врожденного иммунитета, иммунорегуляторные эффекты, формирование межклеточного матрикса [7, 17].

#### Дендритные клетки

Большинство дендритных клеток принадлежит к миелоидному ряду, меньшая их часть – к лимфоидному. Незрелые дендритные клетки обоих рядов циркулируют в крови, составляя в сумме менее 0,5% от общего числа лейкоцитов крови. Не достигнув полной зрелости, миелоидные и лимфоидные дендритные клетки мигрируют в ткани. По аналогии с макрофагами тканевые дендритные клетки иногда разделяют на резидентные (стационарные) и воспалительные. Резидентные дендритные клетки присутствуют преимущественно в барьерных тканях – коже и слизистых оболочках. Дендритные клетки слизистых локализируются преимущественно в эпителиальном слое, где они воспринимают антигенный материал, поступающий независимо от М-клеток (М-подобных клеток). Взаимодействуя с патогенами (носителями антигенов), дендритные клетки поглощают их с помощью различных форм эндоцитоза (пино- и фагоцитоза), активируются PAMP, представленными на поверхности патогенов, и под влиянием провоспалительных цитокинов мигрируют в тканевую жидкость, а затем в лимфу, где они приобретают характерную форму вуалевидных клеток. Одновременно изменяется мембранный фенотип этих клеток: усиливается экспрессия ко-стимулирующих молекул MHC II, появляются  $\beta 1$ -интегрины и хемокиновый рецептор CCR7. В это же время осуществляется процессинг антигена и экспрессия его пептидов на поверхности клеток в составе молекул MHC. С током афферентной лимфы дендритные клетки проникают в региональные лимфатические узлы, где мигрируют в Т-зоны, куда их привлекают хемокины CCL19 и CCL21, распознаваемые рецептором CCR7. Оказавшись в Т-зоне лимфоидных органов, дендритные клетки созревают (признак созревания – экспрессия молекул CD83) и превращаются в интердигитальные клетки. Эти клетки не экспрессируют рецептор CCR7, но сами

вырабатывают хемокины CCL21 и CCL19, благодаря чему они привлекают незрелые дендритные клетки и Т-лимфоциты, поступающие в узел в процессе рециркуляции.

Таким образом, основной функцией дендритных клеток является антиген-презентирующее свойство – способность захватывать (путем пиноцитоза и, в меньшей степени, фагоцитоза) и обрабатывать антиген с последующим его представлением Т-лимфоцитам, что вызывает активацию последних [5, 7, 18].

#### НК-клетки

Естественные киллеры (natural killers, NK) – довольно крупные лимфоциты с азурофильной зернистостью в цитоплазме (большие гранулярные лимфоциты). Основные компоненты гранул НК-клеток, связанные с их цитолитической активностью, – перфорин, гранзимы и гранулозин. Главное их отличие от других популяций лимфоцитов – отсутствие антиген-специфических рецепторов. Основные маркеры НК-клеток – комбинация молекул CD56 и CD16. Различают 2 субпопуляции НК-клеток отличные по мембранному фенотипу и функциям: CD56LoCD16+клетки обладают выраженной цитотоксической активностью, CD56hiCD16-клетки – активные цитокинопродуценты (ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ ,  $\beta$ , ГМКСФ, ИЛ-10).

НК-клетки распознают сигналы опасности в виде эндогенных стрессорных молекул (опасность-ассоциированных молекулярных паттернов, DAMP), а основная их функция – контактный цитолитиз клеток, несущих сигналы опасности. Таким образом, наиболее важные функции НК-клеток – цитотоксическая активность по отношению изменённых (трансформированных, инфицированных вирусом, подвергшихся действию стресса) клеток организма и секреция цитокинов, играющие важную роль в регуляции иммунных процессов [7, 14].

#### Т-лимфоциты

Т-клетки – разновидность лимфоцитов, основные этапы развития которых проходят в тимусе, что и определило их название (тимусзависимые, или Т-лимфоциты).

Большинство Т-лимфоцитов распознаёт комплекс антигенов с молекулами MHC и участвует в реализации иммунного ответа в качестве исполнительных и регуляторных клеток. Т-лимфоциты экспрессируют молекулярный комплекс TCR-CD3+, где TCR – антиген-распознающий димер, а CD3+ – вспомогательный молекулярный комплекс. Выделяют естественные Т-лимфоциты, формирующиеся в процессе нормального развития, независимо от поступления в организм чужеродных антигенов, а также адаптивные Т-лимфоциты, формирующиеся в ходе иммунного ответа.

Поступившие из кровотока CD4+Т-клетки задерживаются в подслизистом слое и мигрируют из него в lamina propria и, в небольшом количестве, в эпителиальный слой. CD8+Т-клетки, напротив, мигрируют преимущественно в эпителиальный слой слизистых оболочек и пополняют пул ИЭЛ.

Свойства клеток, мигрирующих в лимфоидные ткани, ассоциированные со слизистыми оболочками, могут изменяться под влиянием микроокружения (взаимодействие с местными АПК, цитокинами). Это происходит уже в процессе трансмиграции через эндотелий сосудов. Слизистая оболочка – это среда, обогащённая цитокинами, где эпителиальные клетки, макрофаги, дендритные клетки и Т-лимфоциты продуцируют различные виды цитокинов, таких как ТФР- $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-12. После активации TCR, наивные Т-клетки дифференцируются в различные субпопуляции в зависимости от цитокиновой среды.

Субпопуляции Т-клеток различаются по мембранным маркерам, а также способу распознавания антигена и функциям. Наивные Т-лимфоциты включают 2 основных варианта клеток, отличающихся по структуре TCR:  $\alpha\beta$ Т-клетки и  $\gamma\delta$ Т-клетки. Т-клетка может нести только один вариант рецептора. В составе  $\alpha\beta$ Т-клеток выявляют 2 субпопуляции:

CD8+Т-лимфоциты (ЦТЛ, Т-киллеры), которые распознают антиген в составе молекул МНС I, выполняют функции цитотоксических клеток и CD4+Т-лимфоциты (Т-хелперы), распознают антиген в составе молекул МНС II, поставляют вспомогательные сигналы при активации В-лимфоцитов и макрофагов. Взаимодействие Т-хелперов с дендритными клетками служит пусковым событием Т-зависимого иммунного ответа.

В течение последних десятилетий было идентифицировано несколько субпопуляций Т-хелперов (Th): Th1, Th2, Th17, Th22, Th9, фолликулярные хелперные Т-клетки (Tfh) и регуляторные Т-клетки (Treg). Эти субпопуляции характеризуются производством различных эффекторных цитокинов и экспрессией транскрипционных факторов, они влияют на различные воспалительные и регуляторные процессы (рис. 3).

Клеточные механизмы адаптивного иммунитета вносят вклад в иммунную защиту слизистых оболочек существенный вклад. В первую очередь это относится к цитотоксическим Т-лимфоцитам (CD8+), играющим основную роль в противовирусной защите слизистых оболочек, особенно в воздухоносных путях.

При реализации иммунного ответа в слизистых оболочках большую роль играют также регуляторные клетки (Treg), которые сдерживают иммунные процессы, предотвращая их деструктивные проявления и развитие аутоагрессии. Пул этих клеток пополняется индуцибельными (адаптивными) регуляторными Т-клетками, к которым относят Treg, продуцирующие ИЛ-10 и ТФР-β [2, 7, 8, 15, 16].

#### Другие субпопуляции интраэпителиальных лимфоцитов (ИЭЛ).

В слизистых оболочках присутствуют γδТ-клетки, которые составляют 20 – 30% от числа интраэпителиальных лимфоцитов; они являются потомками клеток, заселивших барьерные ткани в эмбриональном периоде. С помощью экспрессируемых TLR-1 и TLR-3 γδТ-клетки способны распознавать PAMP; они не экспрессируют CD4 и гетеродимерную форму CD8αβ, однако могут экспрессировать CD8αα. Поскольку большинство γδТ-клеток лишено CD4 и CD8, они распознают антиген без участия ко-рецепторов, т. е. без ограничения по МНС. В то же время γδТ-клетки способны встраивать антигенные пептиды в собственные молекулы МНС. Несмотря на то что мигрирующая способность этих клеток ограничена, при активации они экспрессируют CCR7 и мигрируют в Т-зоны лимфоидных органов, где играют роль АПК. Есть сведения о способности γδТ-клеток оказывать прямое цитотоксическое действие на патогены без предварительной сенсibilизации (первая линия защиты от патогенов). Существуют данные о выполнении γδТ-клетками функции естественных регуляторных Т-клеток, предотвращающих чрезмерные проявления пролиферации и секреторной активности лимфоцитов в барьерных тканях. Они подавляют секрецию ИФН-γ активированными Т-лимфоцитами, ослабляют пролиферацию и миграцию преимущественно CD8+Т-клеток (как уже упоминалось, это преобладающий класс эффекторных Т-лимфоцитов в слизистых оболочках). Эти свойства γδТ-клетки проявляют как в слизистых оболочках, так и в лимфатических узлах. Еще одна важная функция γδТ-клеток – поддержание жизнеспособности и функциональной активности эпителиальных клеток слизистых оболочек и участие в регенерации эпителия за счёт секреции ростовых факторов KGF-1, RGF-2 (*Keratinocyte growth factors*) и IRF (*Insulin-related factor-1*).

**CD8αα.** Как уже отмечалось, γδТ-клетки не экспрессируют корецепторы CD4 и гетеродимерную форму CD8αβ. Однако 20 – 30% (в некоторых случаях до 60%) γδТ-клеток несут на своей поверхности гомодимер CD8αα. CD8αα+γδТ-клетки экспрессируют рецепторы, характерные для NK-клеток и распознают стрессорные молекулы (DAMP). С NK-клетками их сближает и то обстоятельство, что в качестве гомеостати-

ческого фактора, определяющего их численность, выступает ИЛ-15. Также они содержат в своей цитоплазме цитолитические гранулы и экспрессируют гены перфорина и гранзима, что свидетельствует об их способности осуществлять цитотоксическую функцию в отношении инфицированных клеток, а возможно, и патогенов. Кроме того, эти клетки вносят свой вклад в развитие воспалительной реакции, секретируя провоспалительные цитокины.

Кроме всего прочего, αβ-Т-клетки также могут нести на своей поверхности гомодимерную молекулу CD8αα. Этот вариант клеток более характерен для слизистой оболочки кишечника. Присутствие гомодимера CD8αα считается признаком активированного фенотипа, хотя CD8αα также обладают угнетающим действием на активационный сигнал к TCR. TCRαβ+CD8αα+ происходят из двойных негативных тимоцитов TCRαβ+ CD4- CD8-. Важно отметить, что TGF-β контролирует развитие TCRαβ+CD8αα+. Доказано, что TCRαβ+CD8αα+ связаны с толерантностью к антигенам кишечника, иммунной регуляцией и антимикробной функцией. Хотя функция TCRαβ+CD8αα+ остаётся в значительной степени неизвестной, но сегодня понятно, что эти клетки могут обладать иммунными регуляторными функциями, и связаны с толерантностью к антигенам желудочно-кишечного тракта [5, 7, 15].

#### НКТ-клетки

НКТ-клетки – особая субпопуляция Т-лимфоцитов, формирующаяся в процессе Т-лимфопоэза, но на поздних этапах развития приобретающая признаки NK-клеток. В результате они ко-экспрессируют ключевые маркеры Т- и NK-клеток: на их поверхности представлены комплекс TCR-CD3+ и типичные для NK-клеток CD56, CD16, а также ингибирующие и активирующие рецепторы. НКТ-клетки относят к клеткам врождённого иммунитета. Помимо цитотоксической функции они выполняют роль практически единственного источника цитокинов (в первую очередь ИФН-γ) на первом этапе реакции на внедрение патогенов. Также могут выполнять регуляторную функцию, ограничивая интенсивность иммунного ответа, и функцию аутоагрессии [7, 15].

#### В-лимфоциты

Эти клетки выделяют несколько субпопуляций В-лимфоцитов: В1, В2 и В-клетки маргинальной зоны (расположенных в селезёнке, на границе между белой и красной пульпой). Основная из них – В2-лимфоциты, или «обычные» В-клетки. Главное средоточие В2-клеток – лимфоидные фолликулы (отсюда название – фолликулярные В-лимфоциты). В собственной пластине слизистой оболочки и подслизистом слое В-лимфоциты распределены диффузно.

Основное свойство В-лимфоцитов – экспрессия иммуноглобулинового рецептора для распознавания антигенов – BCR. Для зрелых наивных В2-клеток (ранее не контактировавших с антигеном), характерна низкая экспрессия IgM и высокая – IgD. После активации антигеном (т. е. в ходе иммунного ответа) класс антиген-распознающего рецептора В-клеток может изменяться: вместо IgM и IgD на мембране появляются иммуноглобулины других классов – IgG, IgA, IgE.

Особенность популяции эффекторных В-лимфоцитов подслизистого слоя, а также структурированной лимфоидной ткани слизистых оболочек – преобладание IgA+клеток, достаточно редко выявляемых в лимфатических узлах и селезёнке.

Как уже упоминалось, NALT является ведущим регионарным местом иммунного ответа как против воздушно-капельных, так и против пищевых антигенов, и является первичной индуктивной зоной для В-лимфоцитов (которые способны дифференцироваться в димерно/полимерные секреторные плазмоциты) слюнных желез и слизистой оболочки ротовой полости.

На поверхности В-лимфоцитов конститутивно или под влиянием активации экспрессируются также молекулы, необходимые для выполнения функций, не связанных с рас-

познаванием антигена и выработкой антител. Так, В-клетки несут на поверхности молекулы не только МНС I, но и МНС II класса, а также ко-стимулирующие молекулы CD40, CD86, а при активации также и CD80. Благодаря экспрессии этих молекул В-лимфоциты могут выполнять роль «профессиональных» АПК.

В-клетки экспрессируют многочисленные рецепторы для цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-2, ИЛ-1, ИЛ-10). В том числе на их поверхности присутствуют рецепторы для цитокинов семейства ФНО (TNF): BAFF (B-cell activating factor of TNF family) и APRIL (A proliferation inducing ligand), которые защищают В-клетки от апоптоза и выполняют гомеостатическую функцию, поддерживая численность этих клеток на постоянном уровне.

В1-лимфоциты – субпопуляция В-клеток, занимающая промежуточное положение между врождённым и адаптивным иммунитетом. Они отличаются от обычных В2-лимфоцитов особенностями локализации и развития. В1-клетки функционируют в основном в lamina propria слизистых оболочек и селезёнке. Выделяют 2 субпопуляции В1-клеток: В1а и В1б. В1а-клетки одновременно несут на поверхности молекулы IgM и CD5. CD5 отсутствует на всех остальных В-лимфоцитах, в том числе и на В1б-клетках, в остальном очень схожих с В1а-клетками. Для В1-клеток характерен «активированный фенотип», что проявляется в экспрессии на их поверхности ко-стимулирующих молекул CD80 и CD86, обеспечивающих выполнение антиген-презентирующей функции. В1-лимфоциты несут вариабельные рецепторы для антигена, но их вариабельность выражена слабее, чем у классических В-клеток. В1а и В1б-клетки экспрессируют BCR, содержащий мембранную форму IgM. Обе разновидности В1-клеток могут дифференцироваться в антитело-образующие клетки без стимуляции антигеном. При этом они секретуют преимущественно IgM-антитела. Большинство этих антител специфично к собственным белкам организма (ДНК, гистонам, коллагену, компонентам цитоскелета и т. п.); многие из них полиспецифичны, т. е. способны взаимодействовать с несколькими антигенами, включая аутоантигены, и не способны вызывать повреждение тканей. Естественные антитела, продуцируемые В1а-лимфоцитами, часто специфичны к микробным антигенам и опсонизируют патогены, играя важную роль в реакциях врождённого иммунитета. Несмотря на слабую аффинность, защитная роль антител, продуцируемых В1-клетками, достаточно велика, поскольку она реализуется в самый ранний срок после инфицирования, когда более совершенные опсонизирующие средства (пентраксины) отсутствуют.

Эти клетки могут принимать участие в адаптивном иммунном ответе, что в большей степени свойственно В1б-клеткам. Большинство В1-клеток не требует обязательного участия в ответе Т-лимфоцитов. В1-клетки не поступают в фолликулы, поскольку не экспрессируют CXCR5 – рецептор хемокина CXCL13. Поэтому переключение изотипов и повышение аффинности не характерны для В1-клеток [7, 20].

#### Антитела

Главный продукт гуморального иммунного ответа на начальных этапах развития (4 – 7-е сутки) – IgM-антитела, поступающие в системный кровоток и не играющие основной роли в защите слизистых оболочек. Однако уже в ходе первичного иммунного ответа происходит переключение изотипов иммуноглобулинов. ТФР-β, ИЛ-6, ИЛ-10 и BAFF индуцируют переключение синтеза IgM на синтез IgA. Источниками ТФР-β, ИЛ-6, ИЛ-10 и BAFF являются эпителиальные клетки, Т-лимфоциты и дендритные клетки.

В микроокружении слизистых оболочек мигрирующие сюда и образовавшиеся местно плазматические клетки переключают изотип секретруемых антител на IgA. Пик IgA-ответа в слизистых оболочках дыхательных путей приходится на 7 – 10-е сутки иммунного ответа. Избиратель-

ное переключение изотипа антител на IgA характерно для участков слизистых оболочек, заселённых микроорганизмами (так в миндалинах и в кишечнике человека на долю IgA-образующих клеток приходится до 90% антитело-продуцентов). В свободных от микрофлоры слизистых, например, в нижних дыхательных путях, преобладают IgG-продуценты.

Важнейший эффекторный фактор мукозальных лимфоидных тканей – секреторные IgA, формирующиеся из обычных димерных молекул IgA при транспорте через эпителиальный слой слизистых оболочек. На базальной поверхности эпителиальных клеток слизистых оболочек присутствуют так называемые полимерные иммуноглобулиновые рецепторы (pIgR), способные взаимодействовать с димерными молекулами IgA и в меньшей степени – с пентамерами IgM. После связывания pIgR с IgA, образовавшийся комплекс транспортируется через эпителиоцит в составе везикулы от базального к апикальному концу эпителиальной клетки. В процессе транспортировки происходит отщепление большей части рецептора, которая в виде секреторного компонента (SC) становится составной частью молекулы секреторного IgA – sIgA. При достижении апикальной поверхности клетки содержимое везикулы, включая sIgA, выбрасывается в просвет органа. Присутствие SC-цепи в составе sIgA придаёт молекуле устойчивость к действию протеаз, присутствующих в среде. IgA не являются ни опсонизирующим фактором, ни активатором комплемента. Связываясь с микроорганизмами-мишенями, IgA-антитела ослабляют их подвижность, предотвращают адгезию на эпителиальных клетках и, как следствие, проникновение в обход М-клеток. С другой стороны, образование комплекса sIgA с антигенами возбудителя облегчает поглощение последних М-клетками (рис. 4) [7, 19, 20].

#### Организация мукозального иммунного ответа

Таким образом, решающим в судьбе чужеродных веществ, попавшим в организм, является наличие или отсутствие в их составе PAMP: если в проникающих через слизистый барьер молекулах отсутствует PAMP, то сигнал о проникновении патогена не индуцируется. Дендритные клетки захватывают такой материал, но при этом не активируются. Они приобретают толерогенный фенотип и способствуют формированию неотвечаемости на эти молекулы. Когда же через слизистые оболочки поступают патогены, несущие PAMP или свободные PAMP-содержащие молекулы, они распознаются клетками врождённого иммунитета, что служит сигналом для развития воспаления. На этом фоне происходит активация дендритных клеток, а затем их миграция из барьерных тканей в региональные лимфоузлы.

В реализации первой линии защиты в слизистых оболочках решающая роль принадлежит клеткам врождённого иммунитета и прежде всего воспалительным макрофагам. В тоже время определённый вклад в неё вносят «неклассические» лимфоидные клетки. В1-лимфоциты могут секретировать естественные антитела независимо от поступления патогенов. Значительная часть этих антител направлена против распространённых эпитопов патогенных микроорганизмов. Антитела, взаимодействуя с клетками бактерий, связывают комплемент, что облегчает фагоцитоз патогенов и может вызвать комплементзависимый лизис. Свою защитную функцию проявляют также Т-лимфоциты, характерные для слизистых оболочек, – γδТ-клетки и CD8αα+Т-клетки. Оба типа этих клеток, а также естественные регуляторные Т-клетки и НКТ-клетки наряду с резидентными макрофагами обладают регуляторной активностью, направленной на сдерживание слишком интенсивного воспаления, которое могло бы привести к деструкции тканей и разрушению барьеров.

При первичном иммунном ответе на антигены, поступившие из лимфоидных тканей слизистых оболочек, в лимфатических узлах реализуются те же события, что и при ответе на антигены, поступившие из других отделов организма. В Т-зонах лимфатических узлов дендритные клетки презентир-

руют Т-лимфоцитам антигенный пептид в составе молекул МНС II. В результате запускается пролиферация и дифференцировка Т-клеток. В конечном счете в лимфатических узлах CD4+Т-клетки дифференцируются в хелперы типов Th1- и Th2, а CD8+Т-клетки – в цитотоксические лимфоциты. Аналогично происходит дифференцировка В-лимфоцитов в плазматические клетки – продуценты антител.

Известно, что часть событий по обработке антигенного сигнала происходит в локальных лимфоидных образованиях. Однако для формирования полноценного иммунного ответа требуется участие региональных лимфатических узлов [2, 5, 7, 13].

#### Развитие мукозального иммунного ответа при повторном контакте с патогеном

При развитии мукозального иммунного ответа формируются клетки памяти, избирательно мигрирующие в барьерные ткани (особенно в те, в которых они образовались). CD8+Т-клетки памяти локализируются в эпителиальном слое, а CD4+Т- и В-клетки памяти – преимущественно в подслизистом слое, а также в структурированных лимфоидных образованиях. В большинстве отделов лимфоидных тканей слизистых оболочек преобладают В-клетки памяти, экспрессирующие мембранный рецептор IgA-изотипа, а в бронхолегочном отделе – IgG-изотипа.

При повторном поступлении в организм патогена через слизистые оболочки он взаимодействует с иммунной системой, обогащенной клетками памяти. Как известно, презентация антигена Т-клеткам памяти значительно облегчена и не требует вовлечения всех механизмов, необходимых для его презентации наивным Т-клеткам. Именно поэтому антиген Т-клеткам памяти могут презентовать не только дендритные клетки, но и макрофаги, В-лимфоциты и другие клетки, возможно даже эпителиальные.

В-лимфоциты выступают в качестве АПК, за этим следует активация Т-клеток памяти и их дифференцировка в эффекторные лимфоциты. Таким образом, вторичный иммунный ответ в слизистых оболочках может реализовываться «местными» клетками без значительной их миграции извне и его интенсивность существенно выше, чем первичного [7].

#### Заключение

Подводя итоги вышеизложенного, необходимо подчеркнуть, что понимание механизмов мукозального иммунного ответа позволит приблизиться к пониманию многих патологических состояний, связанных с несостоятельностью слизистых оболочек, при ненарушенном системном иммунитете. В настоящее время эта проблема не сегодняшнего, но завтрашнего дня, решение которой назревает в связи с расширением знаний об организации иммунной системы человека. Становится бесспорной необходимость разработки и внедрение в практику методов диагностики нарушений местного иммунитета, как и необходимость разработки и применения средств для их коррекции, включая не только иммуномодулирующие препараты, но и вакцины, действующие через механизмы мукозального иммунитета (оральные, назальные).

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1—6, 8—16, 18—20)

7. Ярилин А.А. *Иммунология*. Учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
17. Пинегин Б.В., Карсонова М.И. Макрофаги: свойства и функции. *Иммунология*. 2009; 4: 241–9.

#### REFERENCES

1. Ruddle N.H., Akirav E.M. Secondary Lymphoid Organs: Responding to Genetic and Environmental Cues in Ontogeny and the Immune Response. *J. Immunol.* 2009; 183(4): 2205–12.
2. Otczyk D.C., Cripps A.W. Mucosal immunization. A realistic alternative. *Human Vaccines*. 2010; 6 (12): 1–29
3. Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol.* 2008; 1: 31–7.
4. Cesta M.F. Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicologic Pathology*. 2006; 34: 599–608
5. Janeway C.A., Travers P, Walport M et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: *Garland Science*; 2001.
6. Dale B.A., Fredericks L.P. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2005; 7(2):119–33.
7. Yarilin A.A. *Immunology: A textbook. [Immunologiya. Uchebnik]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (in Russian)
8. Turvey S.E., Broide D.H. Chapter 2: Innate Immunity. *J. Allerg. Clin. Immunol.* 2010; 125: 24–32.
10. Zuercher A.W., Coffin S.E., Thurnheer M.C. et al. Nasal-associated lymphoid tissue is a mucosal inductive site for virus-specific humoral and cellular immune responses. *J. Immunol.* 2002; 168(4): 1796–803.
11. McClure R., Massari P. TLR-dependent human mucosal epithelial cell responses to microbial pathogens. *Frontiers in Immunology. Microbiol. Immunology*. 2014; 5.
12. Pang I.K., Iwasaki A. Control of antiviral immunity by pattern recognition and the Microbiome. *Immunol. Rev.* 2012; 245(1): 209–26.
13. Akira S., Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* 2003; 85: 85–95.
14. Nikolov P. *Probiotics and Mucosal Immune Response. Licensee InTech*. 2012; Chapter 22.
15. Björkstöm N. K., Kekäläinen E., Mjösberg J. Tissue-specific effector functions of innate lymphoid cells. *Immunology*. 2013; 139: 416–27.
16. Wu Rui-Qing, Zhang Dun-Fang, Tu Eric, Chen Qian-Ming, Chen WanJun. The mucosal immune system in the oral cavity—an orchestra of T cell diversity. *Intern. J. Oral Science*. 2014; 6: 125–32
17. Neurath M.F., Finotto S., Glimcher L.H. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat. med.* 2002; 8(6): 567–73.
18. Pinegin B.V., Karsonova M.I. Macrophages: properties and functions. *Immunologiya*. 2009; 4: 241–9. (in Russian)
19. Cutler C.W., Jotwani R. Dendritic cells at the oral mucosal interface. *J. Dental. Research*. 2006; 85(8): 678–89.
20. Kato A., Hulse K.E., Tan B.K., Schleimer R.P. B lymphocyte lineage cells and the respiratory system. *J. Allerg. Clin. Immunol.* 2013; 131 (4): 933–57
21. Brandtzaeg P. Secretory immunity with special reference to the oral cavity. *J. Oral Microbiol.* 2013; 5: 1–24.