

Российская академия наук

РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Russian Journal of Immunology

Том 13 (22), №1

2019

Январь – Март

Журнал основан в 1996 г.
Выходит 4 раза в год
ISSN 1028-7221

*Журнал издается под руководством отделения биологических наук РАН
при участии Российского научного общества иммунологов*

Главный редактор
В.А. Черешнев

Редакционная коллегия:

В.А. Козлов (*зам. главного редактора*),
И.Г. Козлов (*зам. главного редактора*), А.П. Ризопулу (*отв. секретарь*), Г.А. Бочаров,
Ф.Ю. Гариб, З.Г. Кадагидзе, Э.В. Карамов (*зам. главного редактора*),
А.В. Караулов, Е.А. Корнева, С.А. Недоспасов,
И.В. Нестерова, Р.В. Петров, А.В. Полевщиков, А.П. Продеус, Р.И. Сепиашвили,
А.С. Симбирцев, Н.Ю. Сотникова, А.А. Тотолян, Т.Г. Федоскова, И.С. Фрейдлин, Р.М. Хаитов,
С.Б. Чекнёв, М.В. Черешнева

Редакционный совет:

А.Я. Арион, И.П. Балмасова, А.Н. Глушков, И.С. Гуцин, М.В. Дегтярева,
Н.А. Зорин, И.П. Корюкина, Г.А. Невинский, М.Б. Раев, А.Г. Румянцев,
Л.П. Сизякина, И.А. Тузанкина, В.С. Ширинский, К.В. Шмагель

Международный редакционный совет (по согласованию)

И. Беляков (США), Г.Н. Дранник (Украина), Д.К. Новиков (Белоруссия),
А. Полторак (США), А. Руденский (США), М.С. Vene (Франция),
J.L. Fahey (США), М. Sela (Израиль), Н. Stockinger (Австрия)

Адрес редакции: 119991 ГСП-1 Москва В-334 Ленинский проспект, 32а, каб. 423

Тел.: 8-903-567-0714, Факс: (495) 434-6212

E-mail: ruimm@yandex.ru

Сайт: www.immunoforum.ru

**Журнал включен в перечень изданий, рекомендованных ВАК
для публикации научных результатов диссертации на соискание
ученой степени кандидата и доктора наук**

Журнал цитируется в Chemical Abstracts, Index Medicus/Medline/PubMed

Москва

© Российская академия наук, 2019

© Составление. Редакция

«Российский иммунологический журнал», 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Том 13 (22), № 1, 2019

Оригинальные статьи

- Е. А. Горшкова, Е. О. Губернаторова, А. Д. Медведевская, М. Ю. Высоких, С. Хольце, Т. Б. Хильдебрандт, М. С. Друцкая, С. А. Недоспасов*
Об особенностях лимфоидной ткани голого землекопа 5
- А. А. Аклев, Е. А. Блинова, И. И. Долгушин*
TCR-мутации в лимфоцитах периферической крови и иммунный статус у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдалённые сроки 13
- А. В. Боголюбова, А. Ю. Абросимов, Л. С. Селиванова, Н. Ю. Двинских, Д. В. Купраш, П. В. Белоусов*
Иммуногистохимическая характеристика субпопуляций опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов Уртино-подобного варианта папиллярного рака щитовидной железы 24
- С. А. Шитиков, А. А. Кучмий, Н. А. Быкова, С. Ю. Филькин, Д. С. Романюк, Г. А. Ефимов*
In silico анализ последовательностей Т-клеточных рецепторов, специфичных к минорному антигену гистосовместимости HA-2 31
- А. Н. Глушков, Е. Г. Поленок, С. А. Мун, Л. А. Гордеева, М. В. Костялко, А. В. Антонов, Н. Е. Вержбицкая, И. А. Вафин*
Индивидуальный иммунологический фенотип и риск рака молочной железы у женщин в постменопаузе 44
- Г. А. Чудилова, И. В. Нестерова*
Фенотипический профиль CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов у здоровых новорожденных, условно-здоровых детей различных возрастных групп и условно-здоровых взрослых субъектов 53
- Е. В. Маркелова, Е. В. Шкорик, А. А. Силаев, О. Л. Жданова*
Определение риска возникновения тромбоземболических осложнений у пациентов после аортокоронарного шунтирования на основе кластерного анализа 62
- Я. В. Козичук, А. Г. Ильвес, И. В. Кудрявцев, Д. А. Москаленко, О. М. Новоселова, К. С. Рубаник, М. К. Серебрякова, Д. О. Старов, Б. А. Тимченко, Л. Н. Прахова, И. С. Лобанов*
Статистически значимые популяции Т-клеток при диагностике рассеянного склероза 69
- А. П. Топтыгина, Т. А. Мамаева*
Динамика синтеза и циркуляции субклассов специфических IgG при иммунном ответе на вакцину против кори, краснухи, эпидемического паротита 78
- Л. Г. Алексеева, Е. А. Мещерякова, А. Г. Ламан, Т. М. Андропова, В. Т. Иванов*
Особенности иммунного ответа, индуцированного «GMDP-образнесущим» пептидом RN: сравнительный анализ с мурамилпептидами 86

Новости Российского научного общества иммунологов

- Юбилей академика Арега Артемовича Тотоляна 93

Авторский указатель

95

CONTENTS

Vol. 13 (22), No 1, 2019

Research Articles

- E. A. Gorshkova, E. O. Gubernatorova, A. D. Medvedovskaya, M. Yu. Vyssokikh, S. Holtze, T. B. Hildebrandt, M. S. Drutskaya, S. A. Nedospasov*
About the naked mole rat lymphoid tissues 12
- A. A. Akleyev, E. A. Blinova, I. I. Dolgushin*
TCR-mutations in peripheral blood lymphocytes and immune status in individuals exposed to chronic radiation exposure 23
- F. V. Bogolyubova, A. Yu. Abrosimov, L. S. Selivanova, N. Yu. Dvinskikh, D. V. Kuprash, P. V. Belousov*
Immunohistochemical characteristics of tumor-infiltrating T-lymphocyte subpopulations of the Warthin-like variant of papillary thyroid cancer 30
- S. A. Sheetikov, A. A. Kuchmiy, N. A. Bykova, S. Yu. Filkin, D. S. Romaniuk, G. A. Efimov*
In silico analysis of T-cell receptors specific to the minor histocompatibility antigen HA-2 43
- A. N. Glushkov, E. G. Polenok, S. A. Mun, L. A. Gordeeva, M. V. Kostyanko, A. V. Antonov, N. E. Verzhbitskaya, I. A. Vafin*
Personal immunological phenotype and breast cancer risk in postmenopausal women 52
- G. A. Chudilova, I. V. Nesterova*
Phenotypic profile subset CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ neutrophil granulocytes in healthy newborns, conditionally healthy children of different age groups and conditionally healthy adult individuals 61
- E. V. Markelova, E. V. Shkorik, A. A. Silaev, O. L. Zhdanova*
Determining the risk of thromboembolic complications in patients after coronary artery grafting on the basis of cluster analysis 68
- Y. V. Kozichuk, A. G. Ilves, I. V. Kudryavtsev, D. A. Moskalenko, O. M. Novoselova, K. S. Rubanik, M. K. Serebryakova, D. O. Starov, B. A. Timchenko, L. N. Prakhova, I. S. Lobanov*
Statistically significant T-cell populations during diagnosis of scattered sclerosis 77
- A. P. Toptygina, T. A. Mamaeva*
Dynamics of synthesis and circulation of subclasses specific IgG in the immune response to the vaccine to the vaccine against measles, rubella, mumps 85
- L. G. Alekseeva, E. A. Meshcheryakova, A. G. Laman, T. M. Andronova, V. T. Ivanov*
Characteristics of immune response induced by GMDP peptide mimetic RN: a comparative analysis with muramylpeptides 92

News of Russian Society of Immunology

- Anniversary date of academician Areg A. Totolyan 93
-

Author Index

95

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ ГОЛОГО ЗЕМЛЕКОПА

© 2019 г. Е. А. Горшкова^{1,2,3*}, Е. О. Губернаторова^{1,2}, А. Д. Медведовская¹,
М. Ю. Высоких³, С. Хольце⁴, Т. Б. Хильдебрандт⁴, М. С. Друцкая²,
С. А. Недоспасов^{1,2,3**}

E-mail: *gorshsama@gmail.com; **sergei.nedospasov@gmail.com

¹Кафедра иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Лаборатория молекулярных механизмов иммунитета, Институт молекулярной биологии
им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

³Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия;

⁴Отдел репродуктивной биологии, Институт зоологии и дикой природы
Ассоциации Лейбница, Берлин, Германия

Поступила: 08.12.2018. Принята: 22.01.2019

Голый землекоп (*Heterocephalus glaber*) – эусоциальный грызун известный благодаря своей необычно высокой продолжительности жизни. Биохимические признаки старения и болезни, ассоциированные с возрастом (рак, нейродегенеративные заболевания) у голых землекопов проявляются в меньшей степени, чем у других лабораторных грызунов. Иммунная система участвует в старении организма и регуляции канцерогенеза, однако ее строение и физиологические особенности иммунной системы у голого землекопа пока мало изучены. Нами выявлены следующие структурные отличия по сравнению с мышью: меньшее абсолютное количество иммунных клеток костного мозга и селезенки, малый размер лимфоидных фолликулов селезенки и лимфатических узлов, более высокая представленность миелоидных клеток на периферии. Эти результаты могут послужить основой для будущих исследований иммунитета голого землекопа, и его вклада в его долголетие.

Ключевые слова: голый землекоп, морфология иммунной системы, миелоидные клетки, модели старения

DOI: 10.31857/S102872210005015-1

Адрес: 119334, Москва, улица Вавилова, д. 32, Недоспасов Сергей Артурович. Тел.: +7(499)1352311.

E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

Авторы:

Горшкова Е. А., аспирант, кафедра иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия; Лаборатория молекулярных механизмов иммунитета, Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; Отдел молекулярной иммунологии, Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия;

Губернаторова Е. О., аспирант, кафедра иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия; Лаборатория молекулярных механизмов иммунитета, Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

Медведовская А. Д., студент, кафедра иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Высоких М. Ю., к.б.н., заведующий лабораторией молекулярных механизмов старения, Институт физико-хими-

ческой биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия;

Хольце С., научный сотрудник, отдел репродуктивной биологии, Институт зоологии и дикой природы Ассоциации Лейбница, Берлин, Германия;

Хильдебрандт Т. Б., профессор, заведующий отделом репродуктивной биологии, Институт зоологии и дикой природы Ассоциации Лейбница, Берлин, Германия;

Друцкая М. С., к.б.н., ведущий научный сотрудник, Лаборатория молекулярных механизмов иммунитета, Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

Недоспасов С. А., доктор биологических наук, профессор, академик, заведующий кафедрой иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия; заведующий лабораторией молекулярных механизмов иммунитета, Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; руководитель отдела молекулярной иммунологии, Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Голый землекоп (*Heterocephalus glaber*, Ruppel, 1842) – вид подземных грызунов семейства *Bathyergidae*, распространенный в Восточной Африке (Кения, Сомали, Эфиопия, Джибути). Для голых землекопов характерна эусоциальность [1], то есть жизнь в колонии, где существует разделение на размножающихся и не размножающихся (рабочих) особей. Среди млекопитающих описано только два вида, обладающих подобным устройством общества: собственно, голый землекоп, и родственный ему вид – дамарский пескорой (*Fukomys damarensis*). В колониях присутствует одна фертильная самка (королева) и несколько фертильных самцов, которые на протяжении долгого времени поддерживают размер группы (60–300 особей в дикой природе). Описанная специфичность структуры популяции сказывается на генетическом разнообразии внутри колонии – изолированные популяции землекопов являются высоко инбредными [2]. Переход к подземному образу жизни способствовал уменьшению давления отбора, увеличению продолжительности жизни и снижению темпа эволюции. Вместе с этим, суровые условия дефицита кислорода, пищи и воды, высокие энергетические затраты на строительство тоннелей в твердом грунте, наряду с формирующейся эусоциальностью, привели к тому, что эффективный размер популяций стал небольшим, и, как следствие, в геноме закрепилось большее число несинонимичных замен по сравнению с родственными видами наземных грызунов [3]. Другими словами, благодаря эволюции в экстремальных условиях, голые землекопы приобрели множество удивительных признаков.

При секвенировании генома голого землекопа были открыты мутации, ассоциированные с необычными чертами физиологии данного вида. Например, нехарактерную для млекопитающих пойкилотермию связывают с мутациями в гене термогена (*UCP1*), отвечающего за несократительный термогенез (non-shivering thermogenesis, NST). Замены в нуклеотидной последовательности гена *UCP1* могут приводить к снижению способности термогена переносить протоны, а также к худшему связыванию регулирующих белок молекул – пуриновых оснований и жирных кислот [4]. Различные компоненты клеточного метаболизма голых землекопов обогащены специфическими молекулярными вариациями белков: системы репарации ДНК [5] и стабилизации трансляции [6],

ареста клеточного цикла [7, 8], и клеточного дыхания [9]. Интересно, что гены, ассоциированные с иммунной функцией, также несут следы положительного эволюционного отбора [3].

Таким образом, широкая представленность специфических адаптаций молекулярных процессов голого землекопа дает основания полагать, что иммунная система этих животных может также обладать уникальными для млекопитающих свойствами. Поскольку исследования, посвященные проблеме функционирования иммунной системы голых землекопов, находятся на сегодняшний день в зачаточном состоянии, **целью работы** являлась первичная характеристика морфологии и клеточного состава лимфатической ткани голого землекопа и выявление потенциальных отличий от хорошо изученных лабораторных грызунов. Такие уникальные отличия могли бы выступить объектами для дальнейшего углубленного исследования адаптаций иммунной системы этих удивительных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В работе были использованы образцы от половозрелых рабочих особей голого землекопа возраста от 6 месяцев до 3-х лет, полученных из колоний Института зоологии и дикой природы Лейбница (Берлин, Германия), а также колонии института ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ. В качестве контроля была использована группа половозрелых мышей возраста 6–8 недель дикого типа линии C57B/6, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино». Для оценки морфологии и клеточного состава использовали костный мозг, селезенки и пейеровы бляшки (ПБ) голого землекопа и мыши.

Гистология

Для получения гистологических срезов селезенки и пейеровых бляшек голого землекопа и мышей, ткани фиксировали нейтральным забуференным 10% формалином («BioVitrum», Россия), затем производили обезвоживание в изопропиловом спирте и заключали в парафин Paraplast («Leica», Германия). Срезы органов толщиной 5 мкм были подготовлены на микротоме Slee Cut 4055 («Slee Mainz», Германия) и окрашены гематоксилином и эозином (BioVitrum, Россия). Микрофотографии срезов были получены при помощи микроскопа Leica

DM4000 B LED («Leica», Германия). На изображениях при малом увеличении (25x) оценивали отношение площади фолликулов белой пульпы селезенки к площади селезенки в поле зрения при помощи программы ImageJ.

Выделение иммунных клеток и проточная цитофлуориметрия

Для выделения клеток, селезенки и пейеровы бляшки перетирали через ситечко с размером ячеек 70 мкм («Corning», США) в буфере PBS, содержащем 2% FBS («HyClone», США). Клетки костного мозга вымывали из костей бедра при помощи тонкой иглы (25G). Костный мозг и спленоциты осаждали и затем ресуспендировали в буфере АСК (1x) при температуре 37°C на 2 минуты для лизиса эритроцитов. Клетки подсчитывали при помощи автоматического счетчика Countess («Thermo Fisher», США). Суспензию клеток окрашивали антителами, позволяющими отделить мертвые клетки Fixable Viability Dye—eFluor 506 («eBioscience», США), а также анти-

телами к маркерам миелоидных клеток CD11b—Pe-Cy7 (клон M1/70 («eBioscience», США)) и CD14—APC (клон TM1 (house-made, DRFZ) для клеток голого землекопа и клон Sa14-2 («BioLegend», США) для мыши), для которых было показано кросс-специфическое распознавание поверхностных антигенов голого землекопа. Анализ данных проточной цитометрии проводили в приложении FlowJo («TreeStar», США). Статический анализ результатов проводили в программе GraphPad Prism 6.0 при помощи t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия между группами при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первичные лимфоидные органы голого землекопа

В ходе длительных наблюдений при вскрытии животных в колонии института зоологии и дикой природы Лейбница был установлен факт, что даже у молодых особей голого земле-

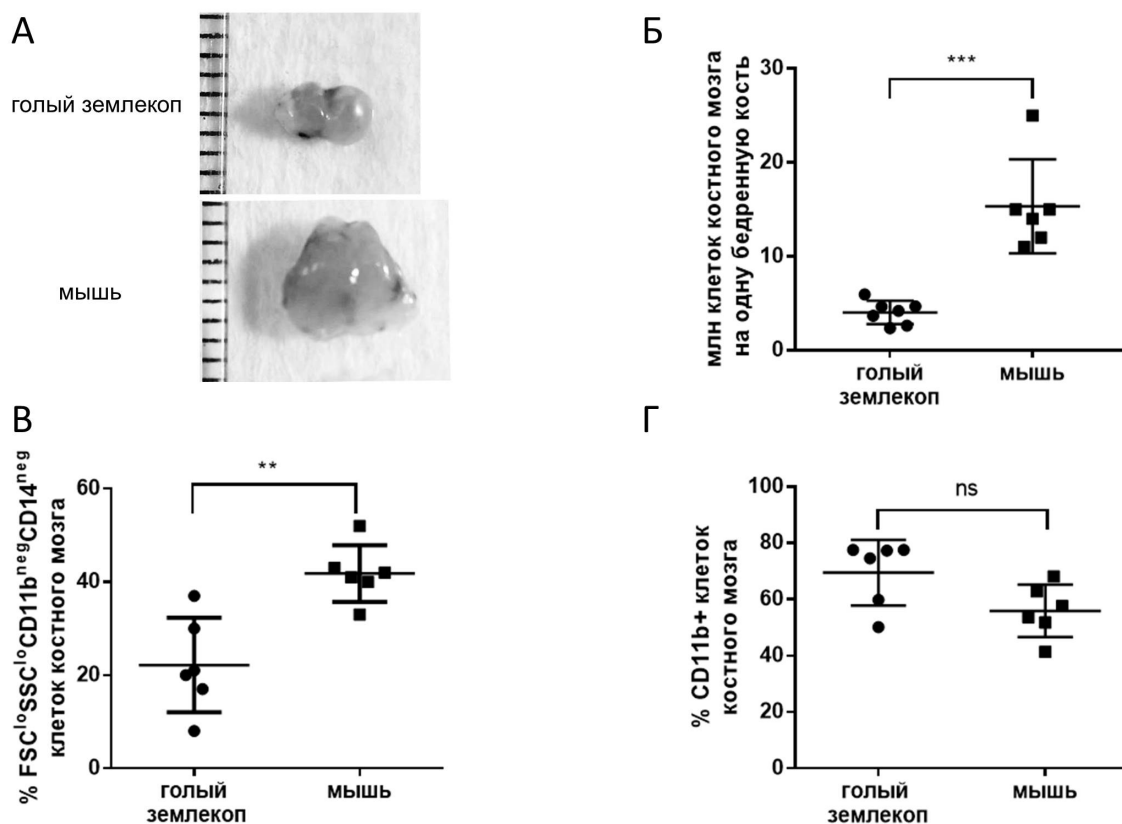


Рис. 1. Тимус и костный мозг голого землекопа содержат меньшее количество клеток по сравнению с мышью.

А — общий вид тимуса молодых голого землекопа и мыши; Б — количество клеток костного мозга при расчете на одну бедренную кость; В — доля смешанной популяции лимфоцитоподобных клеток костного мозга, отрицательных по маркерам Viability Dye, CD11b и CD14; Г — процент CD11b-положительных миелоидных клеток костного мозга. (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

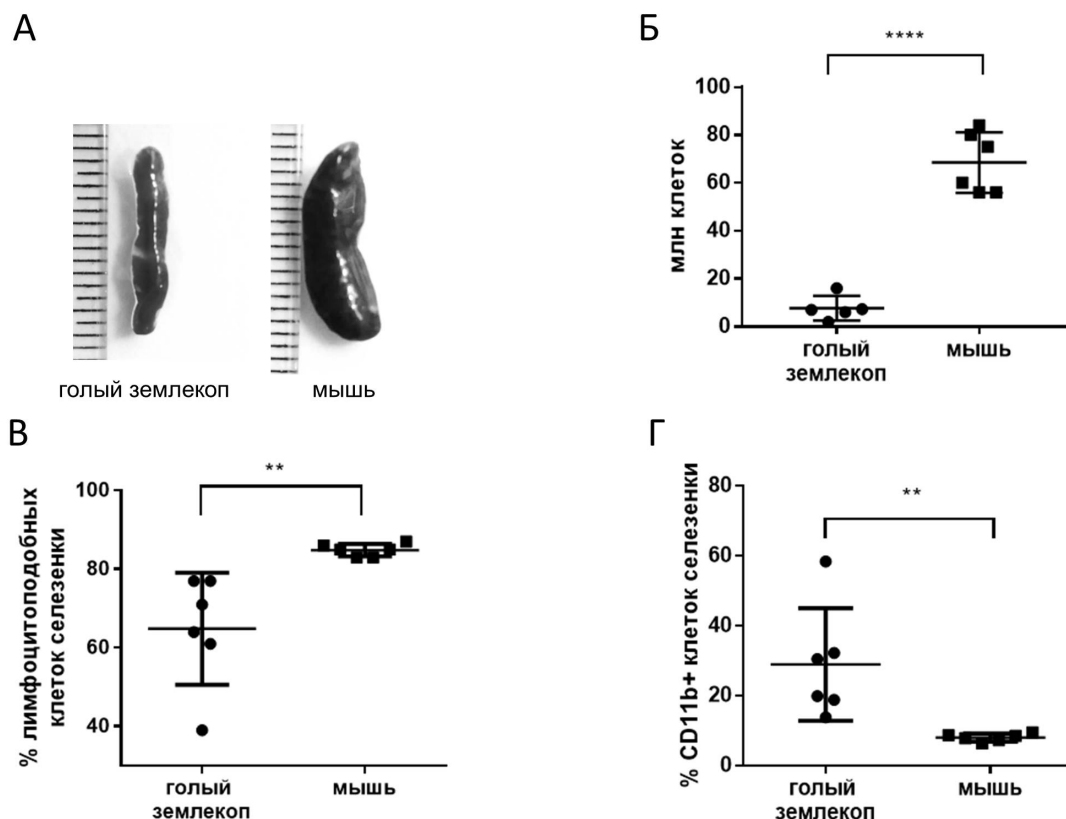


Рис. 2. Селезенка голого землекопа содержит меньшее абсолютное количество клеток относительно мыши за счет снижения доли лимфоцитоподобных клеток.

А – внешний вид органа; Б – абсолютное количество живых спленоцитов после лизиса эритроцитов; В – доля малых лимфоцитов селезенки, отрицательных по маркерам Viability Dye, CD11b и CD14; Г – доля живых CD11b-положительных клеток селезенки; (**) $p < 0,01$; (****) $p < 0,0001$.

копа тимус имеет небольшой размер по сравнению с тимусом мыши (**рис. 1А**).

Другой первичный лимфоидный орган, костный мозг, также отличался в количественном отношении от костного мозга мыши. Так, из двух бедренных (*femur*), двух больших берцовых (*tibia*) и двух плечевых костей (*humerus*) голого землекопа в совокупности удавалось получить только $15,3 \pm 4,7$ млн. клеток ($n=7$), в то время как стандартное количество клеток, которое удается извлечь из одной бедренной кости мыши составляет около 15–20 млн. Если предположить, что соотношение ткани костного мозга в полостях крупных костей конечностей голого землекопа соответствует значениям, наблюдаемым у мышей, то в пересчете на одну бедренную кость у голого землекопа наблюдается значительно меньшее количество клеток костного мозга (**рис. 1Б**). Цитометрический анализ популяций иммунных клеток ограничен набором антител, для которых ранее было установле-

но кросс-специфическое распознавание антигенов голого землекопа: CD11b и CD14. Так как данные маркеры позволяют выявить популяцию миелоидных клеток (в основном, макрофагов, нейтрофилов, моноцитов), смешанную популяцию предшественников и малых лимфоцитов (Т и В-клеток) определяли, как отрицательную по этим маркерам, а её границы уточняли по малому размеру и гранулярности в координатах прямого/бокового светорассеяния (FSC/SSC).

У голого землекопа определялось пониженное, по сравнению с мышью, содержание отрицательных по миелоидным маркерам клеток (**рис. 1В**). Однако частота миелоидных CD11b-положительных клеток в костном мозге голого землекопа не показала значимого различия между видами (**рис. 1Г**).

Вторичные лимфоидные органы голого землекопа

Одним из наиболее крупных иммунных органов голого землекопа является селезенка. По-

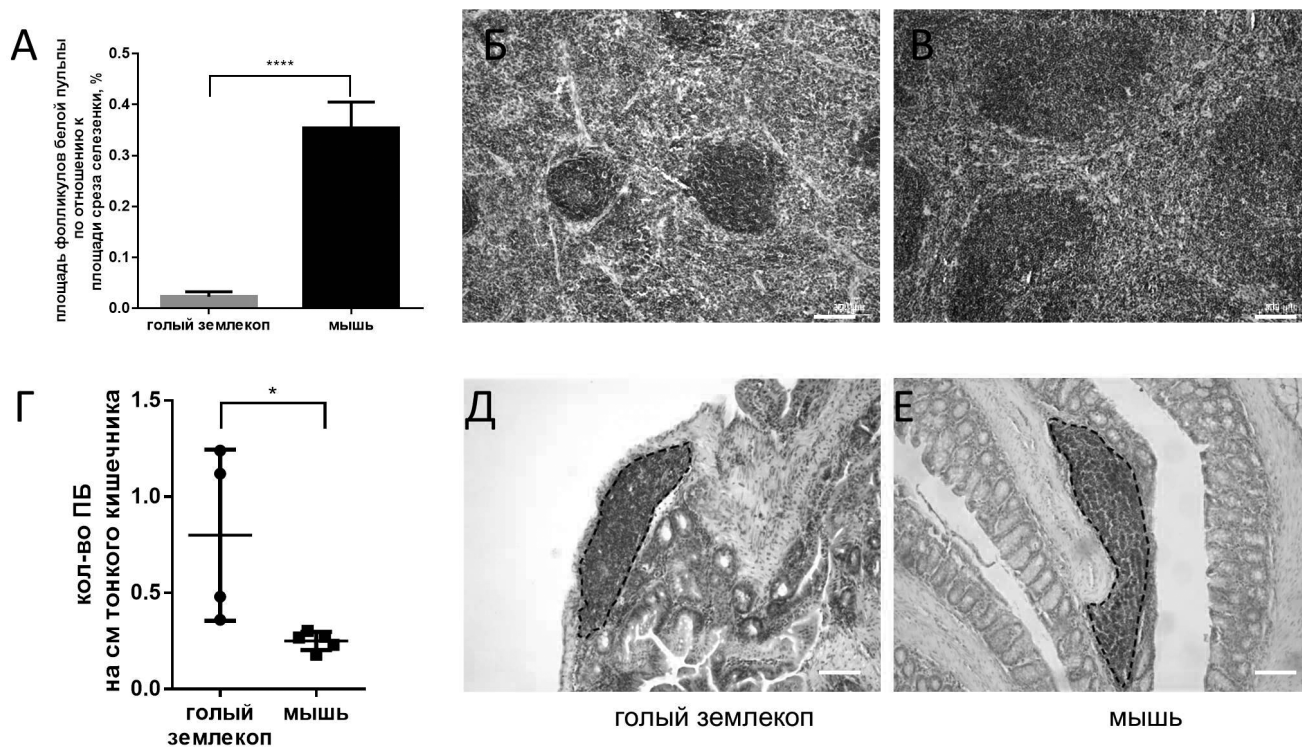


Рис. 3. Структура вторичной лимфоидной ткани голого землекопа – селезенки и пейеровых бляшек.

А – относительная площадь фолликулов белой пульпы, **Б** – структура белой пульпы селезенки голого землекопа; **В** – структура белой пульпы селезенки мыши; **Г** – относительное количество пейеровых бляшек на сантиметр тонкого кишечника у голого землекопа и мыши; **Д** – общий вид пейеровой бляшки голого землекопа; **Е** – общий вид пейеровой бляшки мыши, Масштабная шкала – 300 мкм, окрашивание гематоксилин-эозин. (*) $p < 0,05$; (****) $p < 0,0001$.

мимо визуально отличной от мыши морфологии, меньшей длины и толщины лентовидной селезенки голого землекопа (**рис. 2А**), мы также отметили меньшее абсолютное количество иммунных клеток селезенки после лизиса эритроцитов (**рис. 2Б**). Более точно, доля миелоидных CD11b-положительных клеток в селезенке голого землекопа выше, чем у мышей (**рис. 2Г**), а отрицательная по миелоидным маркерам, смешанная популяция лимфоцитоподобных клеток, напротив, представлена меньшим процентом (**рис. 2В**). Это наблюдение согласуется с данными гистологии: на срезах селезенки заметно, что у голого землекопа снижен относительный объем белой пульпы (**рис. 3А**). Строение белой пульпы также различается: у мыши В-клеточные фолликулы сливаются с параартериальными муфтами, а у голого землекопа – расположены разрозненно посреди красной пульпы (**рис. 3Б, 3В**).

Лимфатические узлы у голого землекопа, как правило, малы, что усложняет их поиск и вы-

деление для последующего цитофлуориметрического анализа. Напротив, лимфоидная ткань кишечника ярко выражена, причем размер и количество пейеровых бляшек у голого землекопа соответствуют таковым у лабораторных мышей. Поскольку длина тонкого кишечника у голого землекопа в несколько раз меньше, чем у мыши, плотность расположения пейеровых бляшек значительно выше (**рис. 3Г**). Интересно, что на поверхности слепой кишки, как у мыши, так и у землекопа находятся 1–2 крупные пейеровы бляшки. Гистологический анализ срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, не выявил отличий в структуре пейеровых бляшек грызунов (**рис. 3Д, 3Е**).

ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему моменту исследователи не пришли к единому мнению даже относительно базовых характеристик иммунной системы

голового землекопа, вероятно, из-за отсутствия методов экспериментальной индукции патологии у животных данного вида [10], а также ограниченного числа иммунологических реагентов, распознающих ткани голового землекопа. Гистопатологические данные, собранные на протяжении 15 лет в одной из крупнейших лабораторных колоний [11] указывают на то, что наиболее распространенной причиной спонтанной гибели являются травмы, нанесенные животными друг другу в результате борьбы за социальный статус в колонии, и их гнойно-септические осложнения, второе место занимают различные патологии почки [12].

В литературе сообщалось о двух случаях крайней чувствительности голового землекопа к вирусным инфекциям. В первом случае экспериментальное заражение рекомбинантным вирусом простого герпеса первого типа (HSV1), непатогенного для мыши, вызывало 100% гибель голых землекопов. Авторы отмечают, что динамика развития заболевания и гистопатологическая картина при летальной инфекции HSV1, наблюдаемая у голых землекопов, сходна с таковыми у людей с иммунодефицитом или находящихся на иммуносупрессивной терапии [13]. В другой работе описано случайное заражение колоний ротавирусом, приведшее к гибели более 60% рабочих особей, что в условиях дикой природы можно было бы приравнять к полному её исчезновению [14], при этом наиболее чувствительными к инфекции оказались животные с высоким коэффициентом инбредности [15]. Стоит отдельно отметить, что в результате эпизоотии погибли в основном рабочие особи, поддержание подчиненного социального статуса которых, по некоторым данным, регулируется глюкокортикоидами [16], и самцы с повышенным уровнем тестостерона, участвующие в размножении [17]. Известно, что как глюкокортикоидные гормоны, так и тестостерон обладают иммуносупрессивными свойствами [18]. Можно предположить, что редуцированность адаптивной ветви иммунитета, а также чувствительность к вирусным инфекциям, могут быть объяснены специфической гормональной композицией, поддерживающей социальную структуру колоний стабильной в течение длительного времени.

Похожие на наблюдаемые нами различия между голым землекопом и лабораторной мышью в размере селезенок и в количестве спленоцитов описаны также при сравнении лабораторных и диких мышей [19]. При меньшем

абсолютном количестве, доля Т-, В- и миелоидных клеток в селезенке диких мышей выше, и содержит пропорционально большее количество активированных популяций. Из этого можно сделать вывод, что полноценный, эффективно противостоящий широкому спектру патогенов иммунитет, как в случае диких мышей, обеспечивается за счет меньшего абсолютного количества клеток и их высокой активации. Сходные с нашими наблюдения касательно морфологии селезенки голового землекопа были сделаны в работе *Cheng et al* [20]. Кроме того, макрофаги костного мозга в первичной культуре также показали более высокую способность к фагоцитозу и продукции TNF в ответ на стимуляцию липополисахаридом, чем у мыши. Возможно, высокая активность макрофагов и их пропорционально большее количество в селезенке голового землекопа позволяет эффективно улавливать антигены из крови, и, таким образом компенсировать относительно низкую представленность компонентов адаптивного иммунитета.

Интересно, что на фоне снижения доли лимфоидных клеток в костном мозге голового землекопа, пейеровы бляшки этих грызунов выражены очень ярко. Можно предположить, что пейеровы бляшки играют исключительную роль в онтогенезе иммунной системы вида. Так, например, у некоторых животных (коровы, овцы) лимфоидная ткань кишечника выступает в качестве первичного органа развития В-клеток [21]. С другой стороны, выраженность лимфоидной ткани кишечника у голового землекопа может свидетельствовать о её важности в контроле микрофлоры. Наиболее крупным отделом кишечника голового землекопа является слепая кишка (*caecum*), занимающая около 8% массы тела и обеспечивающая до 60% энергетических потребностей животного, за счет микробного производства жирных кислот [22]. Показано, что помимо непатогенной флоры, в основном представленной группой *Bacteroides*, в композиции микрофлоры слепой кишки присутствует также патогенная бактерия *Treponema*, участвующая в ферментации пищи [23]. Таким образом, развитая лимфоидная ткань кишечника голового землекопа могла возникнуть как адаптация, позволяющая осуществлять регуляцию обильной микрофлоры, выполняющей важнейшую метаболическую функцию в организме голового землекопа.

Таким образом, в морфологии иммунных органов между голым землекопом и мышью наблюдаются явные отличия: так, селезенка, яв-

ляясь одним из наиболее крупных иммунных органов у голого землекопа, содержит на порядок меньшее количество клеток по сравнению с мышью. Вместе с этим, тимус и лимфатические узлы голого землекопа значительно редуцированы в размере, что может свидетельствовать о преобладании врожденного иммунитета над адаптивным у этих животных. Решающую роль в дальнейшем изучении иммунной системы голого землекопа будет играть получение или идентификация новых специфических антител, которые позволят точнее определять различные популяции иммунных клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят В. П. Скулачева за стимуляцию интереса к изучению голого землекопа, Ю. В. Шебзухова и А. А. Круглова за предоставление кросс-специфических антител против CD14 человека (клон ТМ1), а также О. А. Аверину за помощь при некропсии животных. Работа поддержана грантом РФФ 14-50-00029 и грантом РФФИ 17-04-02112.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Jarvis J. U.* Eusociality in a mammal: cooperative breeding in naked mole-rat colonies. *Science* 1981, 212(4494), 571–573.
2. *Reeve H. K., Westneat D. F., Noon W. A., Sherman P. W., Aquadro C. F.* DNA “fingerprinting” reveals high levels of inbreeding in colonies of the eusocial naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, 87(7), 2496–2500.
3. *Du K., Yang L., He S.* Phylogenomic analyses reveal a molecular signature linked to subterranean adaptation in rodents. *BMC Evol Biol*, 2015. 15: p. 287.
4. *Kim E. B., Fang X., Fushan A. A., Huang Z., Lobanov A. V., Han L., Marino S. M., Sun X., Turanov A. A., Yang P., Yim S. H., Zhao X., Kasaikina M. V., Stoletzki N., Peng C., Polak P., Xiong Z., Kiezun A., Zhu Y., Chen Y., Kryukov G. V., Zhang Q., Peshkin L., Yang L., Bronson R. T., Buffenstein R., Wang B., Han C., Li Q., Chen L., Zhao W., Sunyaev Sh. R., Park T. J., Zhang G., Wang J., Gladyshev V. N.* Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. *Nature* 2011, 479(7372), 223–227. DOI:10.1038/nature10533.
5. *Evdokimov A., Kutuzov M., Petruseva I., Lukjanchikova N., Kashina E., Kolova E., Zemerova T., Romanenko S., Perelman P., Prokopov D., Seluanov A., Gorbunova V., Graphodatsky A., Trifonov V., Khodyreva S., Lavrik O.* Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(6), 1454–1473; doi:10.18632/aging.101482
6. *Azpuruja J., Ke Z., Chen I. X., Zhang Q., Ermolenko D. N., Zhang Z. D., Gorbunova V., Seluanov A.* Naked mole-rat has increased translational fidelity compared with the mouse, as well as a unique 28S ribosomal RNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110(43), 17350–17355. DOI:10.1073/pnas.1313473110.
7. *Tian X., Azpuruja J., Hine C., Vaidya A., Myakishev-Rempel M., Ablaeva J., Mao Z., Nevo E., Gorbunova V., Seluanov A.* High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. *Nature* 2013, 499(7458), 346–349.
8. *Tian X., Azpuruja J., Ke Z. H., Augereau A., Zhang Z. D. D., Vijj J., Gladyshev V. N., Gorbunova V., Seluanov A.* INK4 locus of the tumor-resistant rodent, the naked mole rat, expresses a functional p15/p16 hybrid isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015, 112(4), 1053–1058.
9. *Park T. J., Reznick J., Peterson B. L., Blass G., Omerbasic D., Bennett N. C., Kuich P. H. J. L., Zasada C., Browe B. M., Hamann W., Applegate D. T., Radke M. H., Kosten T., Lutermann H., Gavaghan V., Eigenbrod O., Begay V., Amoroso V. G., Govind V., Minshall R. D., Smith E. S. J., Larson J., Gotthardt M., Kempa S., Lewin G. R.* Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat. *Science* 2017, 356(6335), 307–311.
10. *Manskikh V. N., Averina O. A., Nikiforova A. I.* Spontaneous and Experimentally Induced Pathologies in the Naked Mole Rat (*Heterocephalus glaber*). *Biochemistry (Mosc)* 2017, 82(12), 1504–1512.
11. *Delaney M. A., Nagy L., Kinsel M. J., Treuting P. M.* Spontaneous histologic lesions of the adult naked mole rat (*Heterocephalus glaber*): a retrospective survey of lesions in a zoo population. *Vet. Pathol.* 2013, 50(4), 607–621.
12. *Delaney M. A., Kinsel M. J., Treuting P. M.* Renal Pathology in a Nontraditional Aging Model: The Naked Mole-Rat (*Heterocephalus glaber*). *Vet Pathol*, 2016, 53(2), 493–503.
13. *Artwohl J., Ball-Kell S., Valyi-Nagy T., Wilson S. P., Lu Y., Park T. J.* Extreme susceptibility of African naked mole rats (*Heterocephalus glaber*) to experimental infection with herpes simplex virus type 1. *Comp Med*, 2009, 59(1), 83–90.
14. *Ross-Gillespie A., O’Riain M. J., Keller L. F.* Viral epizootic reveals inbreeding depression in a habitually inbreeding mammal. *Evolution* 2007, 61(9), 2268–2273.
15. *Ingram C. M., Troendle N. J., Gill C. A., Braude S., Honeycutt R. L.* Challenging the inbreeding hypothesis in a eusocial mammal: population genetics of the naked mole-rat, *Heterocephalus glaber*. *Mol Ecol*, 2015, 24(19), 4848–4865.
16. *Bens M., Szafranski K., Holtze S., Sahm A., Groth M., Kestler H. A., Hildebrandt T. B., Platzer M.* Naked mole-rat transcriptome signatures of socially suppressed sexual maturation and links of reproduction to aging. *BMC Biology* 2018, 16(1), 77. Naked mole-rat transcriptome signatures of socially suppressed sexual maturation and links of reproduction to aging. doi.org/10.1186/s12915-018-0546-z
17. *Swift-Gallant A., Mo K., Peragineet D., Monks D. A., Holmes M. M.* Removal of reproductive suppression reveals latent sex differences in brain steroid hormone receptors in naked mole-rats, *Heterocephalus glaber*. *Biol Sex Differ*, 2015, 6, 31.

18. Taneja V. Sex Hormones Determine Immune Response. *Front Immunol.*, 2018, 9, 1931.
19. Abolins S., King E. C., Lazarou L., Weldon L., Hughes L., Drescher P., Raynes J. G., Hafalla J. C.R., Viney M. E., Riley E. M. The comparative immunology of wild and laboratory mice, *Mus musculus domesticus*. *Nat Commun*, 2017, 8, 14811.
20. Cheng J., Yuan Z., Yang W., Xu C., Cong W., Lin L., Zhao S., Sun W., Bai X., Cui S. Comparative study of macrophages in naked mole rats and ICR mice. *Oncotarget* 2017, 8(57), 96924–96934.
21. Yasuda M., Jenne C. N., Kennedy L. J., Reynolds J. D. The sheep and cattle Peyer's patch as a site of B-cell development. *Vet. Res.* 2006, 37(3), 401–415.
22. Suckow M., Stevens K., Wilson R. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents. American College of Laboratory Animal Medicine. 2012: Academic Press.
23. Cong W., Xing J., Feng Y., Wang J., Fu R., Yue B., He Z., Lin L., Yang W., Cheng J., Sun W., Cui S. The microbiota in the intestinal and respiratory tracts of naked mole-rats revealed by high-throughput sequencing. *BMC Microbiol.* 2018, 18(1), 89.

ABOUT THE NAKED MOLE RAT LYMPHOID TISSUES

© 2019 E. A. Gorshkova^{1,2,3*}, E. O. Gubernatorova^{1,2}, A. D. Medvedovskaya¹,
M. Yu. Vyssokikh³, S. Holtze⁴, T. B. Hildebrandt⁴, M. S. Drutskaya²,
S. A. Nedospasov^{1,2,3**}

*E-mail: *gorshsama@gmail.com; **sergei.nedospasov@gmail.com*

¹*Department of Immunology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;*

²*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;*

³*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;*

⁴*Department of Reproduction Management, Leibniz-Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin, Germany*

Received: 08.12.2018. **Accepted:** 22.01.2019

The naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*) is an eusocial rodent living underground, known for its unusually high life expectancy. Biochemical markers of age associated diseases (cancer, neurodegenerative diseases) in naked mole-rat are less pronounced than in other laboratory rodents. The immune system is involved in the aging and carcinogenesis regulation, however, the immune system in the naked mole-rats is yet not investigated well. We found that the immune system of naked mole-rats has structural differences compared to a mouse immune system: a smaller number of the bone marrow cells and splenocytes, the small size of the lymphoid follicles of the spleen and lymph nodes, a higher proportion of myeloid cells in the periphery. Taken together, these data provide a basis for studying the fundamental immunity patterns of the naked mole rat, and their contribution to the extraordinary longevity.

Key words: naked mole rat, immunomorphology, myeloid cells, model of healthy aging

Authors:

Gorshkova E. A., ☒ PhD student, Department of Immunology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia. **E-mail:** gorshsama@gmail.com;

Gubernatorova E. O., PhD student, Department of Immunology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

Medvedovskaya A. D., student, Department of Immunology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Vyssokikh M. Yu., PhD (Biology), head of laboratory, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Holtze S., scientist, Department of Reproduction Management, Leibniz-Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin, Germany;

Hildebrandt T. B., Professor, head of Reproduction Management Department, Leibniz-Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin, Germany;

Drutskaya M. S., PhD (Biology), leading researcher, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

Nedospasov S. A., ☒ MD (Biology), Professor, academician, head of Department of Immunology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; head of laboratory, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; head of laboratory, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

119334, Russia, Moscow, Vavilova str., 32. Phone: +7(499)1352311. **E-mail:** sergei.nedospasov@gmail.com

TCR-МУТАЦИИ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ИММУННЫЙ СТАТУС У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ, В ОТДАЛЁННЫЕ СРОКИ

© 2019 г. А. А. Аклеев^{1,2*}, Е. А. Блинова^{2,3}, И. И. Долгушин¹

*E-mail: andrey.akleev@yandex.ru

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения России, Челябинск, Россия;

²ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России,
Челябинск, Россия;

³ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

Поступила: 29.11.2018. Принята: 22.01.2019

В отдалённые сроки после хронического радиационного воздействия с преимущественным облучением красного костного мозга (средняя доза облучения – $0,89 \pm 0,09$ Гр, диапазон индивидуальных значений: 0,09–1,96 Гр) у лиц с повышенным уровнем TCR-мутантных Т-лимфоцитов отмечено дозозависимое повышение содержания в периферической крови $CD3^+CD16^+CD56^+$ -лимфоцитов, увеличение лизосомальной активности нейтрофилов, уровней сывороточного IL-1 α , интенсивности некроза лимфоцитов и снижение содержания IL-2 и CSF-GM в сыворотке крови. Проведённый анализ показал, что отмеченные изменения следует рассматривать как ответ на повышение частоты мутаций (в т.ч. TCR-мутаций) в облучённых клетках.

Ключевые слова: хроническое облучение, красный костный мозг, TCR-мутации, иммунный статус

DOI: 10.31857/S102872210005016-2

Адрес: 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: + 7 (351) 2327914, Аклеев Андрей Александрович.
E-mail: andrey.akleev@yandex.ru

Авторы:

Аклеев А. А., к. м. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Челябинск, Россия;

Блинова Е. А., к. б. н., зав. лабораторией молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, Челябинск, Россия;

Долгушин И. И., д. м. н., профессор, академик РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Челябинск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что иммунная система является одной из наиболее радиочувствительных в организме человека. До настоящего времени считалось, что причиной данного эффекта явля-

ется апоптотическая гибель лимфоцитов, наступающая в результате действия ионизирующего излучения. Однако последние данные свидетельствуют о том, что реакции клеток и тканей на облучение связаны не только с цитоидным действием радиации, что характерно для острого облучения в высоких дозах, но также обусловлены разнообразными функциональными ответами клеток и тканей на радиационное воздействие. Последнее характерно для малых доз ионизирующей радиации и хронического облучения с низкой мощностью дозы [1].

В ряде исследований показано, что у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, даже в отдалённые сроки после облучения регистрируется повышенный уровень мутаций в генах Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR) [2–4]. Аналогичные результаты отмечались в отдалённые сроки и у жителей прибрежных сёл реки Течи, которые подверглись хроническому многолетнему облучению пре-

имущественно с низкой мощностью дозы [5, 6]. Можно предположить, что радиационно-индуцированные мутации в TCR-генах могут нарушать функцию дефектных Т-лимфоцитов. Поскольку комплекс TCR/CD3 вовлечён на начальном этапе в ряд иммунных ответов, зависящих от Т-лимфоцитов, то потеря или альтерация экспрессии TCR-генов в выживших клетках может способствовать радиационно-индуцированному нарушению Т-клеточного ответа и иммунного статуса облучённого человека в целом [7]. Однако до настоящего времени не получено доказательств, что радиационно-индуцированные TCR-мутации могут вызывать вторичные иммунодефицитные состояния, в т.ч. в периоде отдалённых последствий облучения.

Целью настоящей работы было исследование особенностей системного иммунитета в отдалённые сроки у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в широком диапазоне доз облучения красного костного мозга (ККМ), имеющих повышенный уровень TCR-мутаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 66 жителей прибрежных сёл реки Течи, которая была загрязнена жидкими радиоактивными отходами Производственного объединения «Маяк». Облучение людей носило сочетанный характер и было обусловлено внешним γ -излучением (преимущественно за счёт ^{137}Cs , ^{95}Zr , ^{95}Nb , ^{106}Ru , загрязнивших речную воду, пойменные земли и территории населённых пунктов) и внутренним вследствие поступления радионуклидов в организм людей с речной водой и продуктами питания местного производства (молоко, овощи, картофель и другие). Значительный вклад в формирование дозы внёс остеотропный радионуклид ^{90}Sr , который инкорпорировался в костную ткань и обеспечил наибольшие дозы облучения ККМ – центрального органа гемо- и иммунопоэза. Максимальные значения поглощённой в ККМ дозы облучения достигали 9 Гр, а кровяная и иммунная системы у населения, принимая во внимание их высокую радиочувствительность, являлись критическими в отношении медико-биологических эффектов. Наибольшие мощности доз облучения имели место в период сбросов жидких радиоактивных отходов непосредственно в реку Течу (1950–1956 гг.). [8]. При этом пик сбросов пришёлся на первую и вторую декады октября 1951 года, когда более 60% сум-

марной активности долгоживущих продуктов деления урана (^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{147}Pr , ^{125}Sb , ^{155}Eu и др.) активностью около $1,23 \times 10^6$ Ки, поступили в реку Течу [9].

Группа обследованных лиц, сформированная на основе медико-дозиметрической Базы данных Уральского научно-практического центра радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства (УНПЦ РМ ФМБА России), включала 45 (68,2%) женщин и 21 (31,8%) мужчину. В исследование были включены лица пожилого возраста (средний достигнутый возраст на время обследования составил $70,4 \pm 0,8$ лет, возрастной диапазон: 60–84 года). Все исследования проводились только в случае получения от пациентов информированного согласия в письменном виде. Основную группу составили облучённые люди, у которых отмечалась повышенная частота TCR-мутаций в лимфоцитах периферической крови. В качестве критерия повышения частоты TCR-мутаций принимался их уровень, равный $M + 2\sigma$ (где M – уровень TCR-мутаций, оцененный у необлучённых людей, сопоставимых по возрасту, полу и национальности с представителями основной группы и проживающих в тех же административных районах) [10]. Группа лиц с повышенным уровнем TCR-мутаций включала 29 облучённых человек, среди которых преобладали женщины (18 человек, 62,1%) в возрасте 61–84 года (средний возраст – $71,2 \pm 1,1$ года). Группа сравнения была сопоставима с основной исследуемой группой по достигнутому на момент обследования возрасту (средний возраст составил $69,7 \pm 1,1$ лет, возрастной диапазон: 60–83 года), полу (превалировали женщины – 27 человек, 73%) и включала 37 облучённых жителей прибрежных сёл реки Течи, которые проживали в сходных социально-экономических условиях и имели аналогичный характер медицинского обслуживания. Частота TCR-мутаций в Т-лимфоцитах у представителей группы сравнения не превышала значения спонтанного их уровня, рассчитанного для жителей Уральского региона.

Как видно из **таблицы 1**, средние значения мощности дозы и поглощённой дозы облучения ККМ и мягких тканей (МТ) у облучённых лиц с повышенным уровнем TCR-мутаций не превышали таковые у людей с нормальным их уровнем. Индивидуальные дозы на МТ, которые являются аналогом доз на тимус и периферические органы иммунной системы, как и дозы на ККМ, рассчитывались с использованием дозиметриче-

Таблица 1. Дозиметрические характеристики представителей основной группы и группы сравнения, (M±m)

Группа	Мощность дозы на КKM (1951), Гр/год	Мощность дозы на МТ (1951), Гр/год	Поглощённая доза на КKM, Гр	Поглощённая доза на МТ, Гр
Основная n=29	0,21±0,02 (0–0,42)*	0,02±0,003 (0–0,09)	0,89±0,09 (0,09–1,96)	0,07±0,01 (0,01–0,33)
Сравнения n=37	0,25±0,02 (0,07–0,78)	0,03±0,01 (0,001–0,26)	1,03±0,07 (0,30–2,34)	0,07±0,02 (0,004–0,492)

Примечание: * – указан диапазон варибельности индивидуальных значений доз

ской системы реки Течи TRDS-2009 [8]. Индивидуальные значения поглощённой дозы облучения КKM в группе лиц, имеющих повышенную частоту TCR-мутаций, составляли 0,09–1,96 Гр (среднее значение – 0,89±0,09 Гр), а в группе сравнения (облучённые лица, имеющие нормальный уровень TCR-мутаций в отдалённые сроки) – 0,30–2,34 Гр (среднее значение – 1,03±0,07 Гр). Мощность дозы и поглощённая доза облучения КKM существенно превышали таковые на МТ, так как в значительной мере были обусловлены инкорпорацией в костной ткани остеотропного радионуклида ⁹⁰Sr.

Исследование частоты встречаемости Т-лимфоцитов, имеющих мутации в Т-клеточном рецепторе, проводили методом проточной цитометрии с использованием упрощённого протокола анализа CD3⁺CD4⁺-клеток. Лимфоциты периферической крови человека выделяли в стерильных условиях на градиенте плотности фиколл-урографина (плотность 1077–1078 г/см³) в соответствии со стандартным протоколом [11]. Полученную клеточную суспензию распределяли в две пробирки. В первую пробирку добавляли моноклональные антитела IgG1-FITC/IgG1-PE (изотипический контроль, Beckman Coulter, США), в другую – моноклональные антитела анти-CD3-FITC (Beckman Coulter, США) и анти-CD4-PE (Beckman Coulter, США). После инкубации в темноте в течение 15 минут в каждую пробирку добавляли по 300–400 мкл фосфатно-солевого буфера. Анализ клеток проводился на лазерном (аргон 488 нм) проточном цитофлуориметре Epix XL-MCL (Beckman Coulter, США).

Исследование системного иммунитета включало анализ показателей, характеризующих состояние факторов адаптивного иммунитета (количество клеток в крови с фенотипами CD19⁺, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, соотношение количества CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов, уровни иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке крови), врождённого иммунитета (число

нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов, показатели их фагоцитарной, лизосомальной активности и интенсивности внутриклеточного кислородзависимого метаболизма, количество CD16⁺CD56⁺- и CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов в крови), а также системы цитокинов (содержание IL-1α, IL-1β, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, CSF-GM, CSF-G, TNFα, IFNα, IFNγ в сыворотке крови).

Количество лейкоцитов, нейтрофилов и моноцитов в периферической крови у всех обследованных лиц определяли с помощью автоматического гематологического анализатора Pentra 120 DX (HORIBA ABX S.A.S., Франция). Численность основных популяций и субпопуляций лейкоцитов в крови оценивали методом CD-типирования с использованием стандартной панели меченых флуорохромами моноклональных антител (Beckman Coulter, США). Учёт проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США).

Количественное определение содержания цитокинов и иммуноглобулинов в сыворотке крови человека проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) в твёрдофазном «сэндвич»-варианте [12] с использованием стандартных тест-систем (ВЕКТОР-БЕСТ, Россия и eBioscience, США). Для повышения точности исследования на каждый калибровочный и анализируемый образец выделяли по 2 лунки планшета. Таким образом, для одного пациента по 1 показателю получали 2 значения, после чего находили их среднюю величину. Учёт ИФА проводили на автоматическом микропланшетном ИФА-анализаторе «Lazurite» (DYNEX Technologies, США).

Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови рассчитывали по способности этих клеток поглощать микросферы латекса [13]. Оценку внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов и моноцитов проводили

путём постановки НСТ-теста в модификации А. Н. Маянского и М. К. Виксмана (1979) [14]. Лизосомальную активность нейтрофилов и моноцитов оценивали по методу И. С. Фрейдли (1986) [15]. Учёт данных реакций проводили методом световой иммерсионной микроскопии с помощью микроскопа Axio Imager. A2 (Carl Zeiss, Германия).

Определение интенсивности апоптоза лимфоцитов периферической крови осуществляли методом TUNEL (terminal desoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) в соответствии со стандартными протоколами анализа [16] с использованием коммерческой тест-системы (BD Biosciences, США). Суспензию лимфоцитов, выделенных из периферической крови, пермобилизовали 4%-ным раствором параформальдегида, фиксировали охлаждённым 70%-ным раствором этанола и хранили в морозильной камере при температуре -20°C до 3 месяцев. Непосредственно перед исследованием клетки двукратно отмывали от этанола с использованием wash buffer. Далее к суспензии лимфоцитов добавляли 51 мкл реакционной смеси, содержащей: 10 мкл reaction buffer; 0,75 мкл TdT Enzyme; 8 мкл FITC-dUTP; 32,25 мкл дистиллированной воды. Клетки ресуспендировали в смеси и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После инкубации лимфоциты дважды отмывали с помощью rinsing buffer и добавляли к ним 0,5 мл пропидия йодида (PI/RNase), после чего инкубировали в тёмной камере при 25°C в течение 30 минут. Детекцию лимфоцитов, имеющих признаки фрагментации ДНК (необратимая фаза апоптоза), проводили с помощью проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США). В одной пробе анализировали 30 000 клеток. Методом проточной цитометрии также оценивали интенсивность экспрессии лимфоцитами маркера CD95, характерного для клеток в стадии готовности к апоптозу.

Интенсивность некроза лимфоцитов оценивали методом Annexin V-FITC согласно стандартному протоколу анализа [17]. Перед окрашиванием лимфоциты, выделенные из периферической крови, ресуспендировали в 1 мл охлаждённого фосфатно-солевого буфера, затем центрифугировали 7 минут при 1500 об/мин., после чего удаляли надосадочную жидкость. К суспензии клеток добавляли охлаждённый 1%-ный раствор фиксирующего буфера (Beckman Coulter, США). Затем к 100 мкл суспензии лимфоцитов

добавляли 5 мкл Annexin V-FITC и 5 мкл пропидия йодида (Beckman Coulter, США). Клетки инкубировали в темноте в течение 15 минут при 4°C . После инкубации к лимфоцитам добавляли 400 мкл 1%-ного фиксирующего буфера и проводили анализ на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Лимфоциты, окрашенные только FITC, регистрировались как находящиеся на ранней стадии апоптоза, клетки, окрашенные только йодистым пропидием, детектировались как погибшие путём некроза.

Первичные данные анализировали с использованием табличного редактора «Microsoft Excel 2010» и пакета прикладных программ «Statistica 10.0». Для расчёта средних значений показателей, ошибок средних и диапазонов вариабельности показателей применяли базовые методы описательной статистики. Сравнение исследуемых групп проводилось путём вычисления U-критерия Манна-Уитни. О наличии статистически значимых различий между группами судили при $p < 0,05$. Для описания взаимосвязей между показателями системного иммунитета и величинами кумулятивной дозы и мощности дозы облучения ККМ и МТ применяли метод непараметрического корреляционного анализа по Спирмену. С целью оценки зависимости показателей, для которых были получены статистически значимые корреляции, от дозовых характеристик, использовали метод линейного регрессионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты анализа показателей адаптивного иммунитета у облучённых лиц, имеющих повышенный уровень TCR-мутаций, и в группе сравнения представлены в **таблице 2**. В отдалённые сроки после начала облучения у лиц с повышенным уровнем TCR-мутаций не отмечено каких-либо особенностей со стороны клеточного и гуморального звеньев адаптивного иммунитета. Численность основных популяций и субпопуляций лимфоцитов, соотношение количества $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ - и $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ -лимфоцитов, а также содержание сывороточных иммуноглобулинов А, М, G соответствовало таковому у облучённых в сопоставимых дозах лиц, имеющих нормальный уровень TCR-мутаций.

Как видно из **таблицы 3**, показатели лизосомальной активности нейтрофилов (ЛАН) и содержание НКТ-клеток ($\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$ -лимфоциты) в крови у облучённых лиц с повышенным уровнем TCR-мутаций было статистически

Таблица 2. Средние значения показателей адаптивного иммунитета, интенсивности апоптоза и некроза лимфоцитов у представителей основной группы и группы сравнения, ($M \pm m$)

Показатель	Основная группа n=29	Группа сравнения n=37
Т-звено адаптивного иммунитета		
CD3 ⁺ -лимфоциты, %	68,79±1,63	67,81±1,39
CD3 ⁺ -лимфоциты, ·10 ⁹ /л	1,63±0,10	1,49±0,09
CD4 ⁺ -лимфоциты, %	44,29±1,65	42,53±1,49
CD4 ⁺ -лимфоциты, ·10 ⁹ /л	1,01±0,08	0,91±0,06
CD8 ⁺ -лимфоциты, %	21,05±1,15	22,33±1,59
CD8 ⁺ -лимфоциты, ·10 ⁹ /л	0,50±0,04	0,51±0,06
CD4/CD8	2,31±0,16	2,28±0,18
В-звено адаптивного иммунитета		
CD19 ⁺ -лимфоциты, %	10,27±0,72	11,59±0,96
CD19 ⁺ -лимфоциты, ·10 ⁹ /л	0,24±0,02	0,25±0,03
IgA, мг/мл	2,65±0,30	2,22±0,25
IgG, мг/мл	18,91±2,20	15,35±1,54
IgM, мг/мл	1,61±0,27	1,43±0,15
Интенсивность апоптоза и некроза лимфоцитов		
Апоптоз лимфоцитов, %	0,24±0,05	0,52±0,10
CD95 ⁺ -лимфоциты, %	3,35±0,84	4,73±1,06
CD95 ⁺ -лимфоциты, ·10 ⁹ /л	0,074±0,018	0,106±0,024
Некроз лимфоцитов, %	0,12±0,01 p=0,01	0,02±0,01

значимо выше, чем в группе сравнения. Можно предположить, что изменения вышеуказанных параметров врождённого иммунитета, скорее всего, носят компенсаторный характер и направлены на элиминацию мутантных клеток, повреждения в которых не были репарированы. Необходимо отметить, что уровень CD95⁺-лимфоцитов, находящихся в стадии готовности к апоптозу, в основной группе лиц не был изменён относительно группы сравнения. Анализ интенсивности апоптоза лимфоцитов в сравниваемых группах также не позволил отметить статистически значимых различий (табл. 2). Вместе с тем, у облучённых лиц с повышенной частотой TCR-мутаций в лимфоцитах наблюдалось повышение доли этих клеток, гибнущих посредством некроза, по сравнению с группой облучённых лиц, имеющих нормальный уровень TCR-мутаций (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что TCR-мутантные лимфоциты, по-видимому,

элиминируются не посредством апоптоза, а благодаря цитотоксическому действию клеточных факторов врождённого иммунитета, в частности, нейтрофилов и НКТ-клеток.

Анализ цитокинового профиля (табл. 4) позволил отметить у облучённых лиц с повышенным уровнем TCR-мутантных лимфоцитов в крови разнонаправленный характер изменений в содержании некоторых сывороточных цитокинов: повышение уровней IL-1α одновременно со снижением количеств IL-2 и CSF-GM. Необходимо отметить, что несмотря на более низкий уровень сывороточного CSF-GM, число нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов в периферической крови у людей с повышенной частотой мутаций в генах Т-клеточного рецептора лимфоцитов статистически значимо не отличалось от такового в группе сравнения (табл. 3). Основным эффектом IL-2, вырабатываемого, в основном, Т-хелперами 1 типа, является активация

Таблица 3. Средние значения показателей врождённого иммунитета у представителей основной группы и группы сравнения, ($M \pm m$)

Показатель	Основная группа n=29	Группа сравнения n=37
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	$6,60 \pm 0,39$	$6,28 \pm 0,23$
Гранулоциты		
Нейтрофилы, %	$51,71 \pm 1,84$	$55,64 \pm 1,62$
Нейтрофилы, $10^9/\text{л}$	$3,45 \pm 0,26$	$3,50 \pm 0,18$
Палочкоядерные нейтрофилы, %	$6,24 \pm 0,98$	$4,29 \pm 0,45$
Сегментоядерные нейтрофилы, %	$46,37 \pm 3,02$	$51,29 \pm 1,72$
Базофилы, %	$0,95 \pm 0,16$	$0,63 \pm 0,15$
Эозинофилы, %	$3,08 \pm 0,49$	$2,84 \pm 0,34$
АФН, %	$4,42 \pm 0,62$	$3,90 \pm 0,44$
ИФН, усл. ед.	$11,81 \pm 2,19$	$8,18 \pm 1,40$
Фагоцитарное число, усл. ед.	$2,64 \pm 0,43$	$1,96 \pm 0,21$
НСТ-тест нейтрофилов спонтанный, %	$57,03 \pm 2,58$	$57,38 \pm 2,32$
НСТ-тест нейтрофилов индуцированный, %	$53,58 \pm 2,82$	$52,59 \pm 2,18$
ЛАН, усл. ед.	$439,28 \pm 14,86$ $p=0,049^*$	$390,77 \pm 17,10$
СЛАН, усл. ед.	$14,60 \pm 1,19$	$14,06 \pm 1,04$
Моноциты		
Моноциты, %	$6,93 \pm 0,54$	$6,27 \pm 0,47$
Моноциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	$0,47 \pm 0,06$	$0,39 \pm 0,03$
АФМ, %	$4,80 \pm 0,60$	$4,68 \pm 0,56$
ИФМ, усл. ед.	$10,80 \pm 2,25$	$9,03 \pm 1,55$
Фагоцитарное число, усл. ед.	$1,98 \pm 0,22$	$1,95 \pm 0,25$
НСТ-тест моноцитов спонтанный, %	$58,86 \pm 2,05$	$54,85 \pm 1,93$
НСТ-тест моноцитов индуцированный, %	$55,81 \pm 2,40$	$57,29 \pm 1,97$
ЛАМ, усл. ед.	$316,46 \pm 21,16$	$321,63 \pm 13,23$
СЛАМ, усл. ед.	$1,29 \pm 0,14$	$1,25 \pm 0,12$
Цитотоксические клетки		
CD16 ⁺ CD56 ⁺ -лимфоциты, %	$17,43 \pm 1,48$	$16,08 \pm 1,17$
CD16 ⁺ CD56 ⁺ -лимфоциты, $10^9/\text{л}$	$0,410 \pm 0,039$	$0,373 \pm 0,042$
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ -лимфоциты, %	$5,90 \pm 0,64$ $p=0,036$	$4,43 \pm 0,50$
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ -лимфоциты, $10^9/\text{л}$	$0,138 \pm 0,016$ $p=0,022$	$0,095 \pm 0,011$

Примечания: АФН (АФМ) – активность фагоцитоза нейтрофилов (моноцитов); ИФН (ИФМ) – интенсивность фагоцитоза нейтрофилов (моноцитов); ЛАН (ЛАМ) – лизосомальная активность нейтрофилов (моноцитов); НСТ-тест – тест с нитросиним тетразолием; СЛАН (СЛАМ) – суммарная лизосомальная активность нейтрофилов (моноцитов);

p*обозначает уровень статистической значимости различий средних значений показателей у лиц сравниваемых групп

T-клеточного иммунного ответа (преимущественно Th1-типа), поэтому снижение его уровня в сыворотке крови у представителей основной группы может быть связано с повышением количества у них CD3⁺CD16⁺56⁺-лимфоцитов, либо с определённой функциональной неполноценностью TCR-мутантных T-лимфоцитов. IL-1α является провоспалительным цитокином,

основные функции которого сводятся к активации регенеративных процессов в органах и тканях, усилению пролиферации гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников разных ростков кроветворения, а также к повышению функциональной активности зрелых клеток врождённого и адаптивного иммунитета [18]. Исходя из этого, повышение содержа-

Таблица 4. Средние значения содержания цитокинов в сыворотке крови у представителей основной группы и группы сравнения, (M±m)

Показатель	Основная группа n=29	Группа сравнения n=37
IL-1α, пг/мл	1,66±0,21 p=0,008	0,66±0,20
IL-1β, пг/мл	19,14±6,22	44,71±15,52
IL-1RA, пг/мл	201,45±33,90	182,66±123,61
IL-2, пг/мл	8,90±2,03 p=0,020	17,72±4,56
IL-4, пг/мл	3,04±0,90	4,30±0,94
IL-6, пг/мл	5,86±2,94	19,92±10,32
IL-8, пг/мл	2,43±0,79	4,46±1,13
IL-10, пг/мл	8,88±3,71	11,03±1,71
IL-17, пг/мл	2,32±0,29	2,29±0,52
CSF-GM, пг/мл	1,33±0,39 p=0,012	3,94±0,75
CSF-G, пг/мл	5,98±1,29	9,87±2,76
TNFα, пг/мл	4,00±0,55	4,81±0,42
IFNα, пг/мл	5,20±2,03	5,14±1,06
IFNγ, пг/мл	13,73±3,70	22,83±5,52

Таблица 5. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (R) между иммунологическими показателями и дозиметрическими характеристиками у облучённых лиц, имеющих повышенную частоту TCR-мутаций

Показатель	Мощность дозы на ККМ (1951), Гр/год	Мощность дозы на МТ (1951), Гр/год	Поглощённая доза на ККМ, Гр	Поглощённая доза на МТ, Гр
ЛАН, усл. ед.	0,48 p=0,020*	0,08	0,49 p=0,013	-0,04
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ -лимфоциты, 10 ⁹ /л	0,30	0,43 p=0,025	0,30	0,23
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ -лимфоциты, %	0,03	0,05	0,07	-0,20
IL-1α, пг/мл	-0,44	-0,01	-0,37	-0,06
IL-2, пг/мл	0,04	0,10	0,05	-0,04
CSF-GM, пг/мл	0,19	0,10	0	0,32

Примечание: *p – обозначает уровень статистической значимости корреляций (приведён только для корреляций с уровнем статистической значимости p<0,05).

ния IL-1 α в сыворотке крови у лиц, имеющих повышенную частоту мутаций в TCR-генах, может рассматриваться в качестве компенсаторно-приспособительной реакции организма.

Корреляционный и регрессионный анализ позволил выявить умеренную положительную зависимость показателя лизосомальной активности нейтрофилов от мощности дозы в период максимального радиационного воздействия (1951 год) и кумулятивной дозы облучения ККМ (табл. 5). Абсолютное количество CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов в крови у лиц, имеющих повышенный уровень TCR-мутаций, умеренно положительно коррелировало с мощностью дозы на МТ в период максимального радиационного воздействия. Относительное число CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов в крови, а также уровни сывороточных IL-1 α , IL-2 и CSF-GM не зависели от дозы и мощности дозы облучения ККМ и МТ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о сложной связи между параметрами системного иммунитета и частотой TCR-мутаций в лимфоцитах периферической крови у облучённого человека в отдалённые сроки. До настоящего времени не было показано, что радиация может влиять на процесс созревания иммунокомпетентных клеток. По нашему мнению, возможны два механизма повышения частоты TCR-мутаций в лимфоцитах периферической крови у облучённых людей.

Облучение тимуса, вызванное внешним γ -излучением и внутренним за счёт равномерно распределяющихся радионуклидов (преимущественно ¹³⁷Cs), может влиять на процессы V(D)J-рекомбинации, в процессе которой формируется репертуар T-клеточных рецепторов лимфоцитов [7]. По-видимому, мутантные по TCR-генам T-лимфоциты способны преодолеть позитивную и негативную селекцию в тимусе, следствием чего является регистрация их повышенного уровня в периферической крови. Однако такой механизм индукции TCR-мутаций в отдалённые сроки представляется маловероятным в силу следующих причин. Во-первых, известно, что TCR-мутантные T-лимфоциты достаточно быстро элиминируются из организма — период их полувыведения составляет около двух лет [19]. Во-вторых, поскольку в последние 30 лет мощность дозы облучения ККМ у жителей прибрежных сёл реки Течи не превышает

допустимый уровень (1 мЗв в год), повышенный уровень TCR-мутаций у них в отдалённые сроки невозможно объяснить текущим облучением.

Скорее всего, повышенная частота TCR-мутаций в отдалённом периоде является следствием облучения жителей прибрежных сёл реки Течи в период максимальных сбросов радиоактивных отходов, когда наблюдались наибольшие мощности доз облучения (1950–1956 гг.). Как отмечалось выше, у этих людей наибольшие дозы облучения приходились на ККМ, где локализуются наиболее радиочувствительные гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и костномозговые клетки-предшественники иммуноцитов. Известно, что после облучения в больших дозах может развиваться радиационно-индуцированная нестабильность генома (РИНСГ) [20], в т.ч. и в ГСК и костномозговых клетках-предшественниках. Сублетальные повреждения ГСК, вызванные облучением в период максимального радиационного воздействия, длительное время сохранялись в покоящихся клетках и могли вызывать нестабильность генома в клетках-потомках в отдалённые сроки, когда они начинали пролиферировать. Можно полагать, что следствием РИНСГ в клетках-предшественниках T-лимфоцитов может быть нарушение созревания T-лимфоцитов (в том числе, нарушение формирования репертуара T-клеточных рецепторов), изменение функции зрелых клеток и, как следствие, нарушение иммунных ответов в облучённом организме. Вместе с тем, результаты нашего исследования показывают, что, по-видимому, повышение частоты мутантных по TCR-генам T-лимфоцитов не оказывает существенного влияния на системный иммунитет у облучённых людей в отдалённые сроки.

Корреляционный и регрессионный (данные не представлены) анализ выявленных изменений со стороны иммунной системы от дозы и мощности дозы облучения ККМ и тимуса позволил выявить положительные зависимости показателя ЛАН (от мощности и поглощённой дозы облучения ККМ) и абсолютного количества CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов (от мощности дозы облучения МТ). Поскольку частота TCR-мутаций определяется дозой облучения, можно предположить, что обнаруженные изменения системного иммунитета следует рассматривать как вторичную реакцию иммунной системы на индукцию соматических мутаций в облучённых клетках [5]. TCR-мутации в лимфоцитах периферической крови часто рассматриваются в ка-

честве индикатора соматического радиационно-индуцированного мутагенеза [2–4].

Ранее проведённые исследования свидетельствовали о том, что иммунная система способна отвечать на формирование клона трансформированных клеток после облучения [21]. Известно, что мутации являются важными событиями для индукции канцерогенеза [22]. Однако до настоящего времени неясно, реагирует ли иммунная система на генетические изменения, связанные с формированием мутаций после облучения, которые имеют место значительно раньше, чем злокачественная трансформация стволовых клеток. Ответ на этот вопрос имеет принципиальное значение, так как позволяет понять, на каком этапе после облучения иммунная система включается в процесс поддержания генетического гомеостаза облучённого организма. Результаты данного исследования позволяют предположить, что иммунная система реагирует на повреждения ядерной ДНК достаточно рано, когда после неудачной репарации ДНК имеет место фиксация повреждений ДНК в виде устойчивых мутаций. Характер выявленных изменений иммунитета, которые касаются преимущественно врождённого звена и системы цитокинов, подтверждает данное предположение.

Таким образом, у людей, подвергшихся хроническому аварийному радиационному воздействию и имеющих повышенный уровень TCR-мутаций, в отдалённые сроки отмечено повышение содержания в периферической крови CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов, лизосомальной активности нейтрофилов, сывороточного IL-1α, интенсивности некроза лимфоцитов и снижение уровней IL-2 и CSF-GM в сыворотке крови.

Выявленные изменения можно рассматривать как реакцию иммунной системы на повышение частоты TCR-мутаций в лимфоцитах облучённых людей. Складывается впечатление, что элиминация TCR-мутантных лимфоцитов из организма обеспечивается, главным образом, благодаря цитотоксическим лимфоцитам. Важно отметить, что изменения иммунитета, выявленные у жителей прибрежных сёл реки Течи, имеющих повышенную частоту TCR-мутаций, регистрируются в период реализации отдалённых радиационно-индуцированных эффектов и могут играть определённую роль в их формировании [8].

Благодарность. Авторы благодарят зав.отделом Базы данных «Человек» Н. В. Старцева за помощь в формировании исследуемых групп.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. ICRP Publication 118. Early and late effects of radiation in normal tissues and organs – threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Annals of the ICRP*. Elsevier 2012, 322.
2. Kyoizumi S., Umeki S., Akiyama M., Hirai Y., Kusunoki Y., Nakamura N., Endoh K., Konishi J., Sasaki M. S., Mori T., Fujita S., Cologne J. B. Frequency of mutant T lymphocytes defective in the expression of the T-cell antigen receptor gene among radiation-exposed people. *Mutat. Res.* 1992, 265(2), 173–180.
3. Саенко А. С., Замулаева И. А., Смирнова С. Г. Определение частоты мутаций по локусам гликофорина А и Т-клеточного рецептора: информативность для биологической дозиметрии острого и пролонгированного облучения. *Радиационная биология. Радиоэкология* 1998, 38(2), 171–180. [Sayenko A. S., Zamulayeva I. A., Smirnova S. G. Determining the frequency of mutations at glycoforin A locus and T-cell receptor: informative value for biological dosimetry of acute and prolonged exposure. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologia* 1998, 38(2), 171–180.]
4. Смирнова С. Г., Орлова Н. В., Замулаева И. А., Саенко А. С. Мутации по локусу Т-клеточного рецептора у людей в отдалённые сроки после острого и пролонгированного облучения. *Радиационная биология. Радиоэкология* 2002, 42(6), 624–627. [Smirnova S. G., Orlova N. V., Zamulayeva I. A., Sayenko A. S. Mutations at T-cell receptor locus in humans long after acute or prolonged exposure. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologia* 2002, 42(6), 624–627.]
5. Аклеев А. В., Веремева Г. А., Киозуми С. Влияние хронического радиационного воздействия на уровень соматических мутаций в клетках периферической крови людей в отдалённые сроки. *Радиационная биология. Радиоэкология* 1998, 38(4), 573–586. [Akleyev A. V., Veremeyeva G. A., Kiozumi S. The influence of chronic radiation exposure on the level of somatic mutations in peripheral blood cells of people at later time points. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologia* 1998, 38(4), 573–586.]
6. Блиннова Е. А., Веремева Г. А., Аклеев А. В. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes and mutations in the gene of the T-cell receptor in survivors of chronic radiation exposure. *Health Physics*. 2012, 3(1), 58–60.
7. Израэльсон М., Касацкая С., Погорелый М. Анализ индивидуальных репертуаров Т-клеточных рецепторов. *Иммунология*. 2016; 37 (6): 347–352. [Izraelson M., Kasatskaya S., Pogoreliy M. Analysis of individual repertoires of T-cell receptors. *Immunologia* 2016, 37(6), 347–352.]
8. Дегтева М. О., Толстых Е. И., Шагина Н. Б., Шишкина Е. А., Бугров Н. Г., Воробьева М. И., Возилова А. В. Дозы облучения населения, проживавшего на реке Тече. В кн.: Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи. Книга, Челябинск 2016, 105–147. [Degteva M. O., Tolstykh E. I., Shagina N. B., Shishkina E. A., Bugrov N. G., Vorobyova M. I., Vozilova A. V. In: Consequences of radioactive contamination of the Techa River. *Kniga, Chelyabinsk* 2016, 105–147.]

9. *Глаголенко Ю. В., Дрожко Е. Г., Мокров Ю. Г.* Восстановление параметров источника сбросов жидких радиоактивных отходов радиохимического производства в р. Теча. Сообщение 1. Разработка методики и основные результаты. Вопросы радиационной безопасности 2008, спец. вып. 76–91. [*Glagolenko Yu. V., Drozhko Ye. G., Mokrov Yu. G.* Reconstruction of the source parameters of the releases of liquid radioactive waste of the radiochemical plant into the Techa River. Report 1. Method development and main results. *Voprosy Radiatsionnoi Bezopasnosti* 2008, Special issue, 76–91.]
10. *Блинова Е. А., Веремеева Г. А., Маркина Т. Н., Аклеев А. В.* Апоптоз лимфоцитов периферической крови и мутации в гене Т-клеточного рецептора у лиц, перенесших хроническое радиационное воздействие. Вопросы радиационной безопасности 2011, 4, 38–44. [*Blinova E. A., Veremeyeva G. A., Markina T. N., Akleyev A. V.* Apoptosis of the peripheral blood lymphocytes and mutations in T-cell receptor gene in persons affected by chronic radiation exposure. *Voprosy Radiatsionnoi Bezopasnosti* 2011, 4, 38–44.]
11. *Хейфец Л. Б., Абалакин В. А.* Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографин-фиколл. Лабораторное дело 1973, 10, 579–581. [*Heifets L. B., Abalakin V. A.* Separation of formed elements of human blood on density gradient Ficoll-verografin. *Laboratornoye delo* 1973, 10, 579–581.]
12. *Кишкун А. А.* Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике. Медицинское информационное агентство, Москва 2009, 712. [*Kishkun A. A.* Immunological studies and methods of diagnosing infectious diseases in clinical practice. *Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo*, Moscow 2009, 712.]
13. *Фрейдлин И. С.* Система мононуклеарных фагоцитов. Медицина, Москва 1984, 272. [*Freidlin I. S.* Reticuloendothelial system. Moscow 1984, 272.]
14. *Маянский А. Н., Виксман М. К.* Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: методические рекомендации. Казань 1979, 15. [*Mayansky A. N., Viksman M. K.* Method of assessment of functional activity of human neutrophils using nitroblue tetrazolium reduction test: methodical recommendations. Kazanskiy NIEM, Kazan 1979, 15.]
15. *Фрейдлин И. С.* Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека: учебное пособие. Ленинград 1986, 261. [*Freidlin I. S.* Approaches to studying phagocytosing cells in making an assessment of immunological status of a person: textbook. Leningrad 1986, 261.]
16. *Vermes I.* Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods* 2000, 243, 167–190.
17. *Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C.* A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Method.* 1995, 184(1), 39–51.
18. *Гребенюк А. Н., Леgezа В. И.* Противолучевые свойства интерлейкина-1. Фолиант, Санкт-Петербург 2012, 90. [*Grebenyuk A. N., Legeza V. I.* Radioprotective properties of interleukin-1. Foliant, Saint Petersburg 2012, 90.]
19. *Akiyama M., Kusunoki Y., Umeki S., Hirai Y., Nakamura N., Kyoizumi S.* Evaluation of four somatic mutation assays as biological dosimeter in humans. In: Dewey WC et al (ed) Radiation Research: A Twentieth-Century Perspective. Vol. II: Congress Proceedings. Academic Press, San Diego 1992, 177–182.
20. *Morgan W. F.* Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat. Res.* 2003, 159(5), 581–596.
21. *Seliger B., Abken H. and Ferrone S.* HLA G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends Immunol.* 2003, 24 (2), 82–87.
22. *Алексеев И. В., Кузьмич А. И., Пleshкан В. В., Тюлькина Д. В., Зиновьева М. В., Костина М. Б., Сverdlov Е. Д.* Причина раковых мутаций: поправимая плохая жизнь или неизбежные стохастические ошибки репликации? Молекулярная биология 2016, 50(6): 906–921. [*Alekseenko I. V., Kuzmich A. I., Pleshkan V. V., Tyulkina D. V., Zinovyeva M. V., Kostina M. B., Sverdlov E. D.* The cause of cancer mutations: improvable bad life or inevitable stochastic replication errors? *Molecular Biology* 2016, 50(6), 906–921.]

**TCR-MUTATIONS IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES
AND IMMUNE STATUS IN INDIVIDUALS EXPOSED
TO CHRONIC RADIATION EXPOSURE**

© 2019 A. A. Akleyev^{1,2*}, E. A. Blinova^{2,3}, I. I. Dolgushin¹

*E-mail: andrey.akleev@yandex.ru

¹*Southern-Urals State Medical University of the Russian Federation
Ministry of Public Health, Chelyabinsk, Russia;*

²*Urals Research Center for Radiation Medicine of the FMBA of Russia, Chelyabinsk, Russia;*

³*Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia*

Received: 29.11.2018. **Accepted:** 22.01.2019

Long after the onset of chronic radiation exposure with predominant irradiation of red bone marrow (mean exposure dose was 0.89 ± 0.09 Gy, individual dose range was 0.09–1.96 Gy) in individuals with increased level of TCR-gene mutated T-lymphocytes a dose-dependent increase in the number of peripheral blood CD3⁺CD16⁺CD56⁺-lymphocytes, lysosomal activity of neutrophils, lymphocyte necrosis intensity as well as serum IL-1 α levels were noted. It is assumed that these changes could be immune response to increase in the mutation frequency (including TCR-mutations) in the cells of individuals exposed at a wide dose-range.

Key words: chronic radiation exposure, red bone marrow, TCR-mutations, immunological status

Authors:

Akleyev A. A., ✉ PhD (Medicine), associate professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical laboratory diagnostics, Southern-Urals State Medical University of the Russian Federation Ministry of Public Health, Chelyabinsk, Russia, 454092 Chelyabinsk, 64 Vorovsky st. Phone: + 7 (351) 2327914. **E-mail:** andrey.akleev@yandex.ru

Blinova E. A., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular-cell Radiobiology, Urals Research Center for Radiation Medicine of FMBA of Russia, Chelyabinsk, Russia;

Dolgushin I. I., MD, Professor, Academician of the Russian Academy of Science. Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical laboratory diagnostics, Southern-Urals State Medical University of the Russian Federation Ministry of Public Health, Chelyabinsk, Russia.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИЙ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ УОРТИНО-ПОДОБНОГО ВАРИАНТА ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2018 г. А. В. Боголюбова^{1,2*}, А. Ю. Абросимов^{3,4}, Л. С. Селиванова³, Н. Ю. Двинских⁵, Д. В. Купраш¹, П. В. Белоусов^{1,4}

*E-mail: apollinariya.bogolyubova@gmail.com

¹Лаборатория передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия;

²Образовательный Фонд «Талант и успех», Образовательный центр «Сириус», Сочи, Россия;

³Отдел фундаментальной патоморфологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, Москва, Россия;

⁴Лаборатория «Физические методы, акустооптическая и лазерная аппаратура для задач диагностики и терапии онкологических заболеваний», ФГАУ ВПО «Национальный Исследовательский Технологический Университет МИСиС», Москва, Россия;

⁵Патологоанатомическое отделение, ФГБУ «НМИЦ радиологии», МНИОИ им. П. А. Герцена Минздрава России, Обнинск, Россия

Поступила: 11.12.2018. Принята: 15.01.2019

Опухоль-инфильтрирующие иммунные клетки, в частности, Т-лимфоциты, могут как стимулировать, так и подавлять рост опухолей. Уортино-подобный вариант папиллярного рака щитовидной железы характеризуется аномально большим количеством иммунного инфильтрата. Данная работа представляет собой анализ субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, инфильтрирующих этот тип опухоли.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, Уортино-подобный вариант папиллярного рака щитовидной железы, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, третичные лимфоидные структуры, молекулы иммунологические чекпойнты

DOI: 10.31857/S102872210005017-3

Адрес: 119991, Москва, ул. Вавилова, д.32, Боголюбова Аполлинария Васильевна. Тел.: +79060798364 (моб.), факс: +74991351405.

E-mail: apollinariya.bogolyubova@gmail.com

Авторы:

Боголюбова А. В., м.н.с. лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия; н.с. Образовательного Фонда «Талант и успех», Образовательный центр «Сириус», Сочи, Россия;

Абросимов А. Ю., д.м.н., профессор, зав. отделом фундаментальной патоморфологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, Москва Россия; Лаборатория «Физические методы, акустооптическая и лазерная аппаратура для задач диагностики и терапии онкологических заболеваний», ФГАУ ВПО «Национальный Исследовательский Технологический Университет МИСиС», Москва, Россия;

Селиванова Л. С., к.м.н., с.н.с. отдела фундаментальной патоморфологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, Москва, Россия;

Двинских Н. Ю., к.м.н., зав. патологоанатомическим отделением, ФГБУ «НМИЦ радиологии», МНИОИ им. П. А. Герцена Минздрава России, г. Обнинск, Россия;

Купраш Д. В., д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН, зав. лабораторией передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия;

Белоусов П. В., м.н.с. лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия; Лаборатория «Физические методы, акустооптическая и лазерная аппаратура для задач диагностики и терапии онкологических заболеваний», ФГАУ ВПО «Национальный Исследовательский Технологический Университет МИСиС», Москва, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Клетки иммунной системы являются важным компонентом микроокружения опухолей. Они могут как стимулировать, так и подавлять

прогрессию опухолей в зависимости от спектра вырабатываемых ими цитокинов. Поэтому прогностическая и диагностическая роль иммунного инфильтрата неопластической ткани определяется не только его интенсивностью, но и субпопуляционным составом клеток [1, 2].

Значительную часть иммуноцитов, инфильтрирующих строму опухолей, как правило, составляют Т-лимфоциты. Различные их субпопуляции могут оказывать разнонаправленное действие на опухолевый рост. Так, CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты могут мигрировать в неопластическую ткань под воздействием хемокинов и уничтожать опухолевые клетки путем перфорин/гранзим-зависимого контактного цитолиза. CD4⁺ Т-лимфоциты в опухолевой ткани могут быть представлены как Т-хелперами, так и регуляторными Т-клетками (Treg), характеризующимися экспрессией транскрипционного фактора FoxP3. Как правило, CD4⁺ Т-лимфоциты не могут распознать опухолевые клетки ввиду отсутствия на последних молекул МНС второго класса. В то же время, некоторые опухоли, например, меланома, могут экспрессировать МНС II конститутивно или в условиях индукции IFN- γ [3]. Кроме того, CD4⁺ Т-хелперы могут помогать CD8⁺ Т-киллерам реализовывать их функции. Одна из субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов, фолликулярные Т-хелперы (Tfh), важна для соматического гипермутагенеза В-клеточных рецепторов и индукции синтеза В-лимфоцитами антител против опухоль-ассоциированных антигенов, которые также могут принимать участие в противоопухолевом иммунном ответе [4].

Как правило, наличие опухоль-инфильтрирующих Treg оказывается прогностически неблагоприятным фактором, поскольку эта субпопуляция иммунных клеток оказывает подавляющее действие на активность других клеток иммунной системы [5, 6]. Treg экспрессируют на своей поверхности различные супрессорные молекулы — так называемые иммунологические контрольные точки, или чекпойнты (PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 и др.), инактивирующие эффекторные Т-лимфоциты. Кроме того, Treg секретируют ряд супрессорных цитокинов [7, 8], таким образом подавляя активность цитотоксических Т-лимфоцитов [9]. Повышенное соотношение CD8/FoxP3 Т-лимфоцитов являются прогностически благоприятным фактором для большинства солидных опухолей человека [1].

Среди опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов можно выделить также субпопуля-

цию CD45RO⁺ Т-клеток памяти (как CD4⁺, так и CD8⁺). Многочисленные исследования корреляций между присутствием в опухолевой ткани иммунных клеток различных фенотипов и прогнозом для пациента (так называемый Immunoscore) показали, что наличие CD45RO⁺ Т-лимфоцитов положительно коррелирует с благоприятным прогнозом у пациентов с различными злокачественными новообразованиями [3].

Характер расположения лимфоцитов в строме опухоли может быть различным. Иммунные клетки могут как располагаются диффузно, так и образовывать третичные лимфоидные структуры (ТЛС), сходные по своему строению с фолликулами вторичных лимфоидных органов. В составе ТЛС можно выделить Т- и В-клеточную зоны [10], в которой, по аналогии с лимфоузлами, проходит эффективная презентация опухолевых антигенов, соматический гипермутагенез, пролиферация и переключение изотипов антител В-клеток. На данный момент образование ТЛС рассматривается как один из механизмов иммунного надзора над опухолью [11].

Молекулы — иммунологические чекпойнты CTLA-4 и PD-1 являются важнейшими негативными регуляторами активации Т-лимфоцитов. В лимфоузлах экспрессия обеих молекул отмечается как на поверхности фолликулярных Т-хелперов, необходимых для функционирования герминального центра, так и на фолликулярных регуляторных Т-клетках [12–15]. Немногочисленные работы, посвященные исследованию продукции CTLA-4 и PD-1 Т-клетками ТЛС, указывают на существование корреляции между экспрессией данных молекул с развитием активного иммунного ответа [16].

Уртино-подобный папиллярный рак щитовидной железы (ПРЩЖ) — редкий гистологи-

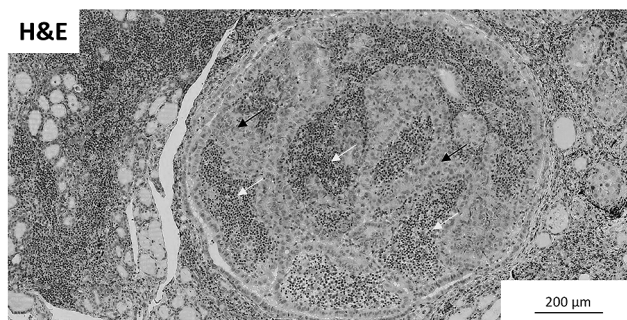


Рис. 1. Типичная гистологическая картина Уртино-подобного варианта ПРЩЖ. Окрашивание гематоксилин-эозином. Черные стрелки указывают на опухолевые клетки, белые — на сопутствующую иммунную инфильтрацию.

ческий вариант ПРЦЖ, определяемый по наличию обильной лейкоцитарной инфильтрации стромы опухоли [17] (рис. 1). Большую часть лимфоцитов стромы опухоли составляют плазматические клетки, однако процент Т-лимфоцитов также значителен. Кроме того, внутри опухолевой массы и на инвазивной границе часто располагаются ТЛС. Таким образом, характеристика субпопуляций опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов важна для понимания противоопухолевого потенциала иммунного инфильтрата Уртино-подобного варианта ПРЦЖ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты

Восемь случаев Уртино-подобного варианта ПРЦЖ были выбраны из архива патологоанатомического отделения МРНЦ им. А. Ф. Цыба (филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, г. Обнинск). Для всех случаев имелся опухолевый материал в виде парафиновых блоков. В таблице 1 приведена клиническая информация о пациентах.

Иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов

Окрашивание срезов ткани антителами к различным маркерам Т- и В-лимфоцитов было проведено по стандартной методике с использованием пероксидазной системы детекции с DAB. Окрашивание антителами к CD3 (Leica, клон LN10), CD4 (Leica, клон 4B12), CD8 (Leica, клон 4B11), CD45RO (Leica, клон UCHL1), CTLA-4 (Bio SB, клон BSB2884), PD-1 (Sigma Aldrich, клон HPA035981) и CD79 α (Leica, клон 11E3) проводили с использованием автоматического иммуногистостейнера Leica BOND и фирменных реактивов Leica. Антитела против CD3, CD4, CD8, CD45RO и CD79 α представляли собой уже разведенные готовые к использованию антитела, для антител против CTLA-4 и PD-1 использовали разведение 1/50.

Получение гистологических изображений

Окрашенные гистологические срезы сканировали с использованием системы Leica SCN400 с 20-кратным увеличением для дальнейшего анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ популяционного состава опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток Уртино-

подобного варианта ПРЦЖ ранее был проведен в нескольких работах, однако количество проанализированных пациентов мало. Наибольшая выборка (3 пациента) была представлена в исследовании D'Antonio с соавторами, в котором иммунный инфильтрат опухолей был визуализирован антителами к CD3, CD4, CD8, CD79 α , CD21 [18]. Кроме того, иммуногистохимическое окрашивание иммуноцитов было осуществлено в четырех статьях формата «описание случая» (case report), а именно в работах Ugano с соавторами [19] (1 пациент, антитела против CD45RO, CD20), Vera-Sempere с соавторами [20] (1 пациент, антитела против CD45RO, CD20, CD3), Lam с соавторами [21] (1 пациент, антитела против CD3, CD20), Amico с соавторами [22] (1 пациент, антитела против CD3, CD20). Все вышеупомянутые работы постулируют наличие окрашивания на использованные ими маркеры лимфоцитов, однако никак его не обсуждают. Кроме того, присутствие в строме опухоли ТЛС было упомянуто только в исследовании D'Antonio с соавторами, однако их структура также не была исследована. В то же время, характеристика основных субпопуляций Т-лимфоцитов может быть важна для понимания функционирования ТЛС, встречающихся внутри и на инвазивной границе опухолей Уртино-подобного строения и, по всей видимости,

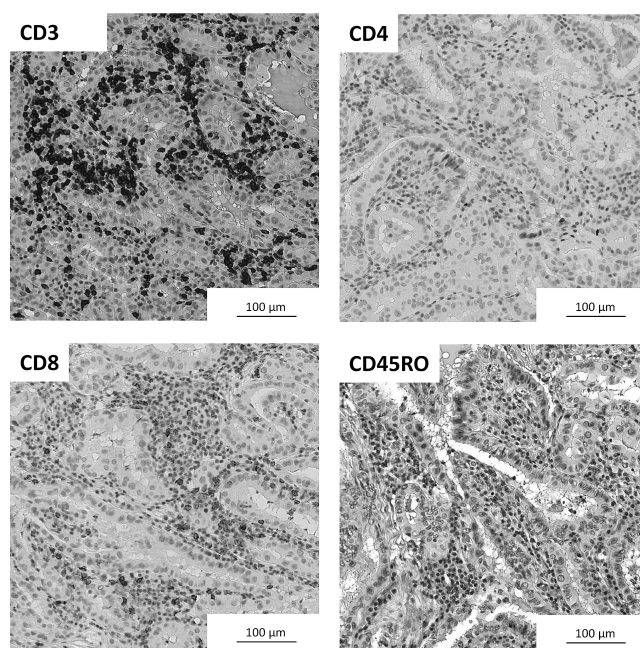


Рис. 2. Иммуногистохимическое окрашивание основных маркеров различных субпопуляций Т-лимфоцитов, инфильтрирующих строму опухолей Уртино-подобного строения.

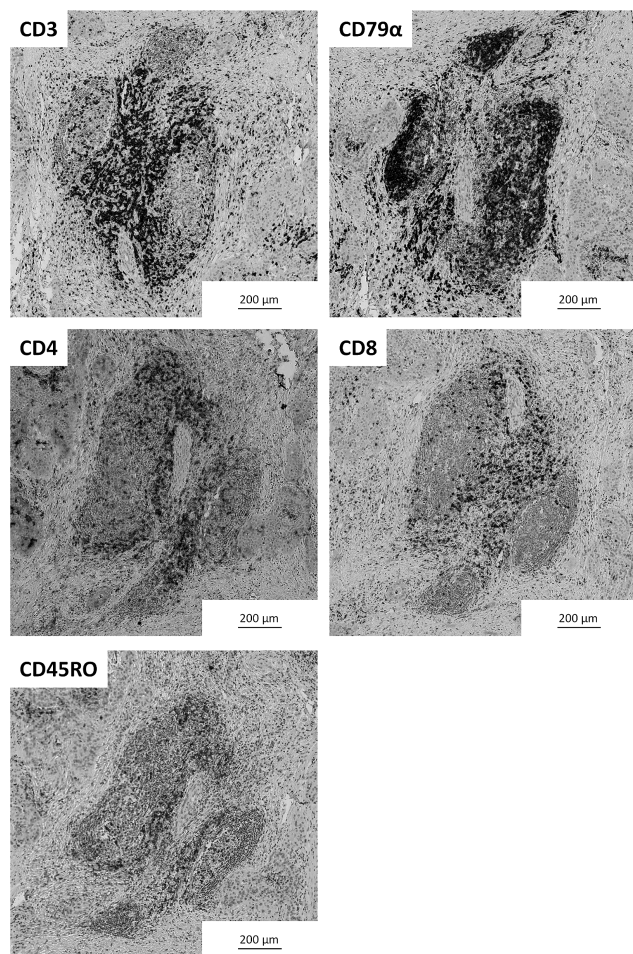


Рис. 3. Строение третичных лимфоидных структур (ТЛС) в Уртино-подобном варианте ПРЩЖ. Иммуногистохимическое окрашивание на CD4, CD8, CD45RO и CD79α.

являющихся важным структурным компонентом противоопухолевого иммунного ответа. Таким образом, данная работа представляет собой первый опыт характеристики гистологической картины опухолей Уртино-подобного строения исходя из особенностей иммунного инфильтрата, являющегося основным диагностическим критерием при выделении данного гистологического варианта ПРЩЖ.

В данной работе методом иммуногистохимии был охарактеризован субпопуляционный состав опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RO^+$) для 8 проб опухолей Уртино-подобного строения из коллекции МРНЦ им. А.Ф.Цыба, г. Обнинск, Россия. Кроме того, впервые была проанализирована экспрессия молекул иммунологических контрольных точек (чекпойнтов) CTLA-4 и PD-1 на опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитах при Уртино-подобном варианте ПРЩЖ.

Распределение $CD3^+$ Т-лимфоцитов по опухолевому очагу Уртино-подобного строения бимодально. Значительное количество Т-клеток диффузно распределено по строме опухоли (рис. 2), тогда как другая часть формирует Т-клеточную зону ТЛС (рис. 3).

Т-лимфоциты, инфильтрирующие строму опухоли, преимущественно представлены $CD8^+$ цитотоксическими Т-клетками. Кроме того, строма опухоли достаточно интенсивно инфильтрирована $CD45RO^+$ Т-клетками и $CD4^+$ Т-лимфоцитами.

Архитектура ТЛС Уртино-подобного ПРЩЖ соответствует организации вторичных лимфоидных органов. Четко выделяются Т- ($CD3^+$) и В-клеточная ($CD79\alpha^+$) зоны (рис. 3А и Б, соответственно). Основной субпопуляцией Т-лимфоцитов являются $CD4^+$ Т-клетки, которые, по-видимому, представлены преимущественно Т-фолликулярными хелперами и фолликулярными регуляторными Т-лимфоцитами (рис. 3В). Цитотоксические Т-лимфоциты и Т-клетки памяти также присутствуют на периферии ТЛС (рис. 3Г и Д, соответственно).

Для понимания функционирования субпопуляций Т-лимфоцитов в Уртино-подобном варианте ПРЩЖ нами был проведен анализ экспрессии молекул – иммунологических контрольных точек (чекпойнтов) CTLA-4 и PD-1 (рис. 4). Было показано наличие специфического окрашивания лишь на редких единичных внутриопухолевых Т-лимфоцитах. Это может указывать на малое количество Трег в строме опухоли.

В то же время, и CTLA-4, и PD-1 интенсивно экспрессируются на Т-лимфоцитах ТЛС. Наличие данных молекул на поверхности лимфоцитов, входящих в состав лимфоузлов и ТЛС, может служить параметром, характеризующим функциональную активность последних, по-

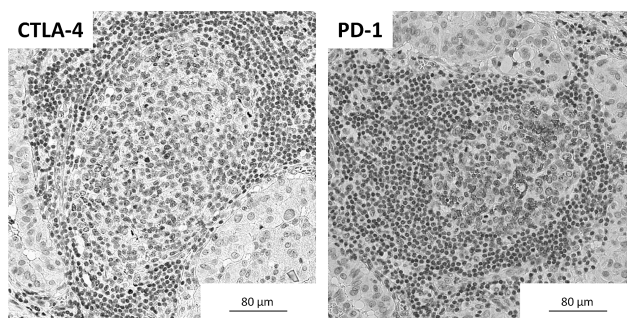


Рис. 4. Иммуногистохимическое окрашивание молекул – иммунологических чекпойнтов CTLA-4 и PD-1, экспрессирующихся на поверхности Т-лимфоцитов в составе ТЛС.

Таблица 1. Клинико-патоморфологические характеристики пациентов, взятых в исследование

Пациент	Возраст на момент постановки диагноза	Пол	Размер опухоли, мм	Т-стадия (AJCC)	N-стадия (AJCC)	Наличие экстрагистеоридного распространения	Сопутствующий аутоиммунный тиреоидит
1	37	Ж	3	T1a	N1a	-	+
2	60	Ж	25	T2	N0	+	+
3	53	Ж	13	T1b	N1a	-	+
4	63	Ж	14	T1b	N0	+	+
5	36	Ж	6	T1a	N0	-	+
6	55	Ж	7	T1a	N0	-	+
7	54	Ж	5	T1a	N1a	-	+
8	57	Ж	17	T1b	N1a	+	+

сколькo для адекватного прохождения процессов созревания В-лимфоцитов в лимфоузлах необходимо наличие отрицательных регуляторов, коими и являются иммунологические чекпойнты. Было показано, что экспрессия PD-1 в лимфоидной ткани имеет комплексный эффект [23]. С одной стороны, она ингибирует привлечение в фолликулы активированных Т-хелперов, в результате чего рекрутируются Т-лимфоциты, имеющие высокий уровень экспрессии костимуляторного рецептора ICOS, необходимого для активации и функционирования Т-клеток. Кроме того, экспрессия PD-1 помогает фолликулярным Т-хелперам концентрироваться в герминальных центрах. Таким образом, экспрессия молекул-иммунологических чекпойнтов может рассматриваться как один из параметров, характеризующих функциональную активность ТЛС опухолей Уортино-подобного строения.

В то же время, экспрессия молекул иммунологических контрольных точек также может наблюдаться на Treg, присутствующих в составе ТЛС. На мышинной модели рака легкого было показано, что данные клетки вносят вклад в подавление противоопухолевого иммунного ответа [24]. Соответственно, уровень экспрессии молекул иммунологических чекпойнтов на поверхности Т-лимфоцитов в составе ТЛС нельзя рассматривать исключительно как благоприятный прогностический признак, поскольку необходимо учитывать субпопуляционный состав экспрессирующих их клеток.

Уортино-подобный вариант ПРЩЖ является уникальной опухолью по степени инфильтрации стромы иммунными клетками и может

служить модельной системой для изучения взаимодействия опухолевых клеток и иммунитета. Т-лимфоциты традиционно находятся под пристальным вниманием современной онкоиммунологии, поскольку являются основными клетками, которые могут как усиливать, так и ингибировать рост опухоли. Представленные в этой работе данные по субпопуляциям опухоли-инфильтрирующих Т-лимфоцитов в опухолях щитовидной железы Уортино-подобного строения указывают на развитие активного иммунного ответа в данных структурах и требуют дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках реализации научной программы при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18–315–00168).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Fridman W.-H., Dieu-Nosjean M.-C., Pagès F., Cremer I., Damotte D., Sautès-Fridman C., Galon J.* The immune microenvironment of human tumors: general significance and clinical impact. *Cancer Microenviron.* 2013. 6 (2), 117–122.
2. *Fridman W.H., Pagès F., Sautès-Fridman C., Galon J.* The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 2012, 12 (4), 298–306.
3. *Hadrup S., Donia M., Thor Straten P.* Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2013, 6 (2), 123–133.
4. *Gu-Trantien C., Loi S., Garaud S., Equeter C., Libin M., de Wind A., Ravoet M., Le Buanec H., Sibille C., Manfouo-Foutsop G., Veys I., Haibe-Kains B., Singhal S. K., Michiels S., Rothé F., Salgado R., Duvallier H., Igna-*

- tiadis M., Desmedt C., Bron D., Larsimont D., Piccart M., Sotiriou C., Willard-Gallo K., Perou C., Sorlie T., Sotiriou C., Pusztai L., Sotiriou C., Ascierto M., Teschendorff A., Miremadi A., Pinder S., Ellis I., Caldas C., Alexe G., Desmedt C., Schmidt M., Rody A., Yau C., Esserman L., Moore D., Waldman F., Sninsky J., Benz C., Ascierto M., Rody A., Rahir G., Moser M., Mahmoud S., Mahmoud S., Lee A., Ellis I., Green A., Bos R., Marquardt K., Cheung J., Sherman L., Bos R., Sherman L., Ruffell B., DeNardo D., Affara N., Coussens L., Zammarron B., Chen W., Gobert M., Wilke C., Ye J., Livergood R., Peng G., deLeeuw R., Kost S., Kakal J., Nelson B., Chaisemartin L. de, Dieu-Nosjean M., Coppola D., Vinuesa C., Cyster J., Ruffell B., Au A., Rugo H., Esserman L., Hwang E., Coussens L., Chtanova T., Miyara M., Lee M., Hanspers K., Barker C., Korn A., McCune J., Ravoet M., Zaunders J., Baniyash M., Fazilleau N., Mark L., McHeyzer-Williams L., McHeyzer-Williams M., Balkwill F., Razis E., Panse J., Link A., Crotty S., Viegas M., Crotty S., Ignatiadis M., Grange C., Hayden M., Ghosh S., Kim T., Chang M., Yu K., Kwon H., Norman D., Vig E., Goebel M., Harrington M., Macian F., Lopez-Rodriguez C., Rao A., Xiao G., Deng A., Liu H., Ge G., Liu X., Ghebeh H., Good-Jacobson K., Szumilas C., Chen L., Sharpe A., Tomayko M., Shlomchik M., Mihalj M., Kellermayer Z., Balogh P., Inozume T., O'Shea J., Paul W., Galon J., Yoon H., Orrock J., Foster N., Sargent D., Smyrk T., Sinicrope F., Shankaran V., Curtis N., Primrose J., Thomas G., Mirnezami A., Ottensmeier C., Haabeth O., Braumuller H., Ji Y., Zhang W., Kryczek I., Curiel T., Ladoire S., Kim M., Watanabe M., Oda J., Amarante M., Voltarelli J. C., Bates G., West N., Breitfeld D., Schaerli P., Willmann K., Lang A., Lipp M., Loetscher P., Moser B., McHeyzer-Williams M., Okitsu S., Wang N., McHeyzer-Williams L., Ramiscal R., Vinuesa C., Nelson B., Lohr M., Mahmoud S., Lee A., Paish E., Macmillan R., Ellis I., Green A., Nielsen J., Ladanyi A., Maletzki C., Jahnke A., Ostwald C., Klar E., Prall F., Linnebacher M., Coronella J., Coronella-Wood J., Hersh E., Bianchini G., Foo S., Phipps S., Martinet L., Muller G., Hopken U., Lipp M., Wang C., Hillsamer P., Kim C., Denkert C., Haibe-Kains B. CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* 2013, 123 (7), 2873–2892.*
5. Bronkhorst I. H. G., Vu T. H. K., Jordanova E. S., Luyten G. P. M., Burg S. H. van der, Jager M. J. Different Subsets of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Correlate with Macrophage Influx and Monosomy 3 in Uveal Melanoma. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 2012, 53 (9), 5370.
 6. Chaudhary B., Elkord E. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines* 2016, 4 (3), 28.
 7. Sakuishi K., Apetoh L., Sullivan J. M., Blazar B. R., Kuchroo V. K., Anderson A. C. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* 2010, 207 (10), 2187–2194.
 8. Park H. J., Kusnadi A., Lee E.-J., Kim W. W., Cho B. C., Lee I. J., Seong J., Ha S.-J. Tumor-infiltrating regulatory T cells delineated by upregulation of PD-1 and inhibitory receptors. *Cell. Immunol.* 2012, 278 (1–2), 76–83.
 9. Schmidt A., Oberle N., Krammer P. H. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front. Immunol.* 2012, 3, 51.
 10. Dieu-Nosjean M.-C., Antoine M., Danel C., Heudes D., Wislez M., Poulot V., Rabbe N., Laurans L., Tartour E., de Chaisemartin L., Lebecque S., Fridman W.-H., Cadranel J. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol.* 2008, 26 (27), 4410–4417.
 11. Dieu-Nosjean M.-C., Giraldo N. A., Kaplon H., Germain C., Fridman W. H., Sautès-Fridman C. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *Immunol. Rev.* 2016, 271 (1), 260–275.
 12. Castan J., Tenner-Racz K., Racz P., Fleischer B., Bröker B. M. Accumulation of CTLA-4 expressing T lymphocytes in the germinal centres of human lymphoid tissues. *Immunology* 1997, 90 (2), 265–271.
 13. Wang C. J., Heuts F., Ovcinnikovs V., Wardzinski L., Bowers C., Schmidt E. M., Kogimtzis A., Kenefeck R., Sansom D. M., Walker L. S. K. CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015, 112 (2), 524–529.
 14. Sage P. T., Paterson A. M., Lovitch S. B., Sharpe A. H. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity* 2014, 41 (6), 1026–1039.
 15. Sage P. T., Francisco L. M., Carman C. V., Sharpe A. H. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat. Immunol.* 2013, 14 (2), 152–161.
 16. Solinas C., Garaud S., De Silva P., Boisson A., Van den Eynden G., de Wind A., Risso P., Rodrigues Vitória J., Richard F., Migliori E., Noël G., Duvillier H., Craciun L., Veys I., Awada A., Detours V., Larsimont D., Piccart-Gebhart M., Willard-Gallo K. Immune Checkpoint Molecules on Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Association with Tertiary Lymphoid Structures in Human Breast Cancer. *Front. Immunol.* 2017, 8, 1412.
 17. Apel R. L., Asa S. L., LiVolsi V. A. Papillary Hürthle cell carcinoma with lymphocytic stroma. «Warthin-like tumor» of the thyroid. *Am. J. Surg. Pathol.* 1995, 19 (7), 810–814.
 18. D'Antonio A., De Chiara A., Santoro M., Chiappetta G., Losito N. S. Warthin-like tumour of the thyroid gland: RET/PTC expression indicates it is a variant of papillary carcinoma. *Histopathology* 2000, 36 (6), 493–498.
 19. Urano M., Abe M., Kuroda M., Mizoguchi Y., Horibe Y., Kasahara M., Tanaka K., Sudo K., Hirasawa Y. Warthin-like tumor variant of papillary thyroid carcinoma: case report and literature review. *Pathol. Int.* 2001, 51 (9), 707–712.
 20. Vera-Sempere F. J., Prieto M., Camañas A. Warthin-like Tumor of the Thyroid: A Papillary Carcinoma with Mitochondrion-rich Cells and Abundant Lymphoid Stroma. A Case Report. *Pathol. – Res. Pract.* 1998, 194 (5), 341–347.

21. Lam K. Y., Lo C. Y., Wei W. I. Warthin tumor-like variant of papillary thyroid carcinoma: a case with dedifferentiation (anaplastic changes) and aggressive biological behavior. *Endocr. Pathol.* 2005, 16 (1), 83–89.
22. Amico P., Lanzafame S., Li Destri G., Greco P., Caltabiano R., Vecchio G. M., Magro G. Warthin tumor-like papillary thyroid carcinoma with a minor dedifferentiated component: report of a case with clinicopathologic considerations. *Case Rep. Med.* 2010, 495281.
23. Shi J., Hou S., Fang Q., Liu X., Liu X., Qi H. PD-1 Controls Follicular T Helper Cell Positioning and Function. *Immunity* 2018, 49 (2), 264–274.e4.
24. Joshi N. S., Akama-Garren E. H., Lu Y., Lee D.-Y., Chang G. P., Li A., DuPage M., Tammela T., Kerper N. R., Farago A. F., Robbins R., Crowley D. M., Bronson R. T., Jacks T. Regulatory T Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Suppress Anti-tumor T Cell Responses. *Immunity* 2015, 43 (3), 579–590.

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF TUMOR-INFILTRATING T-LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS OF THE WARTHIN-LIKE VARIANT OF PAPILLARY THYROID CANCER

© 2018 A. V. Bogolyubova^{1,2*}, A. Yu. Abrosimov^{3,4}, L. S. Selivanova³, N. Yu. Dvinskikh⁵, D. V. Kuprash¹, P. V. Belousov^{1,4}

*E-mail: apollinariya.bogolyubova@gmail.com

¹Laboratory of intracellular signaling in health and disease, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

²Educational Fund “Talent and Success”, Educational center “Sirius”, Sochi, Russia;

³Department of Basic Pathology, National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russia;

⁴Laboratory «Physical methods, acousto-optical and laser devices for diagnosis and therapy of oncological diseases», National University of Science & Technology «MISIS», Moscow, Russia;

⁵Department of Pathology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Ministry of Health of Russian Federation, Obninsk, Russia

Received: 11.12.2018. Accepted: 15.01.2019

Tumor-infiltrating immune cells, in particular T-lymphocytes, can both stimulate and inhibit the tumor growth. Warthin-like variant of papillary thyroid cancer is a unique tumor characterized by an abnormally abundant immune infiltration. We performed the analysis of the composition of T-cell subpopulations in the contexture of this type of cancer.

Key words: T-lymphocytes, Warthin-like papillary thyroid cancer, tumor-infiltrating lymphocytes, tertiary lymphoid structures, immune checkpoints

Authors:

Bogolyubova A. V., ✉ junior staff scientist Laboratory of intracellular signaling in health and disease, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; staff scientist, Educational Fund «Talent and success», Educational center «Sirius», Sochi, Russia;

119991, Russia, Moscow, Vavilova str., 32. Phone: +79060798364 (моб.), Fax: +74991351405.

E-mail: apollinariya.bogolyubova@gmail.com;

Abrosimov A. Yu., PhD, head of the department Department of Basic Pathology, National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russia; Laboratory «Physical methods, acousto-optical and laser devices for diagnosis and therapy of oncological diseases», National University of Science & Technology «MISIS», Moscow, Russia;

Selivanova L. S., PhD, senior staff scientist Department of Basic Pathology, National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russia;

Dvinskikh N. Yu., PhD, head of the Department of Pathology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Ministry of Health of Russian Federation, Obninsk, Russia

Kuprash D. V., PhD, head of the Laboratory of intracellular signaling in health and disease, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

Belousov P. V., junior staff scientist Laboratory of intracellular signaling in health and disease, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; Laboratory «Physical methods, acousto-optical and laser devices for diagnosis and therapy of oncological diseases», National University of Science & Technology «MISIS», Moscow, Russia.

IN SILICO АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К МИНОРНОМУ АНТИГЕНУ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ НА-2

© 2019 г. С. А. Шитиков^{1,2*}, А. А. Кучмий¹, Н. А. Быкова¹,
С. Ю. Филькин¹, Д. С. Романюк¹, Г. А. Ефимов^{1,2}

*E-mail: sheetikov.s@blood.ru

¹ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения РФ, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия;

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Поступила: 25.12.2018. Принята: 21.01.2019

Трансплантация гемопоэтических клеток (ТГСК) от родственного или неродственного донора применяется при терапии опухолей кроветворной системы. Однако, при трансплантации развивается иммунный ответ клеток донора на антигены реципиента. Ответ на здоровые ткани называется реакцией «трансплантат против хозяина» (РТПХ), а ответ на гемопоэтическую ткань в контексте гемобластоза, называется реакцией «трансплантат против опухоли» (РТПО). Развитие РТПО является благоприятным последствием трансплантации, поскольку данная реакция элиминирует остаточные опухолевые клетки и предотвращает рецидив. Было показано, что иммунный ответ возникает на полиморфные пептиды, презентируемые в составе молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA). Такие пептиды являются результатом протеасомной деградации белков, кодируемых генами, содержащими несинонимичные однонуклеотидные полиморфизмы, и называются минорными антигенами гистосовместимости (МАГ). Изучение структуры репертуаров Т-клеточных рецепторов (ТКР), распознающих МАГ, может помочь в идентификации механизмов формирования аллореактивного ответа и является важным для предсказания антигена аллореактивных клонов с неустановленной специфичностью. В данной статье были определены и проанализированы *in silico* генетические последовательности, кодирующие Т-клеточные рецепторы, специфичные к минорному антигену НА-2. Нами было обнаружено преимущественное использование V21 и J42 сегментов α -цепи при формировании CDR3 участка и присутствие V7-8 сегмента в большинстве CDR3 участков β -цепи, что указывает на существование консервативного мотива, ответственного за распознавание антигена НА-2.

Ключевые слова: РТПХ, РТПО, ТГСК, Т-клеточные рецепторы, минорные антигены гистосовместимости, аллореактивный ответ

DOI: 10.31857/S102872210005018-4

Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский пр., д. 4, ФГБУ НМИЦ Минздрава России, Шитиков Савелий Андреевич. Тел.: +7(965)2014787, +7(495)6124443.

E-mail: sheetikov.s@blood.ru

Авторы:

Шитиков С. А., стажер-исследователь, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия; Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Кучмий А. А., к. б. н., научный сотрудник, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия;

Быкова Н. А., научный сотрудник, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Ми-

нистерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия;

Филькин С. Ю., научный сотрудник, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия;

Романюк Д. С., научный сотрудник, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия;

Ефимов Г. А., к. б. н., заведующий лабораторией, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Лаборатория трансплантационной иммунологии, Москва, Россия; Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для терапии тяжелых случаев опухолевых заболеваний кроветворной системы используют трансплантацию гемопоэтических клеток костного мозга от родственного или неродственного донора после курса химиотерапии и/или радиотерапии — трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Использование такого подхода сопряжено с развитием аллореактивного иммунного ответа, который может обеспечить элиминацию опухолевых клеток либо усугубить общую клиническую картину. Лимфоциты донора, попав в организм больного в составе трансплантата, начинают распознавать антигены пациента как чужеродные, что может приводить к поражению здоровых тканей. Этот процесс называется реакцией «трансплантат против хозяина» (РТПХ), и является самым частым сопутствующим эффектом ТГСК, который часто приводит к летальным исходам [1]. Частный случай РТПХ, когда лимфоциты донора специфически распознают остаточные опухолевые клетки в организме больного, называется реакцией «трансплантат против опухоли» (РТПО) [2]. Главной задачей трансплантационной иммунологии является усиление эффективности противоопухолевого иммунного ответа и одновременное снижение ответа на здоровые ткани. Баланс между РТПХ и РТПО зависит от клонального разнообразия трансплантата, изменение клеточного состава трансплантата может сдвинуть аллогенный иммунный ответ от проявления РТПХ к эффективной РТПО [2].

Было замечено, что при HLA-идентичной трансплантации (донор и реципиент полностью совпадают по всем локусам HLA) развитие РТПХ и РТПО сопряжено с распознаванием так называемых минорных антигенов гистосовместимости (МАГ). МАГ представляют собой пептиды в составе молекул HLA, присутствующие у реципиента, но не у донора, и являются результатом наличия полиморфизмов в геноме. В случаях, когда изменение генетического кода влечет за собой изменения аминокислотной последовательности белка (несинонимичный однонуклеотидный полиморфизм, ОНП) или изменение сайтов узнавания для протеасомной деградации, происходит изменение спектра представленных на поверхности клетки пептидов в контексте молекул HLA. В частности, для минорного антигена HA-2 однонуклеотидный полиморфизм в экзон-кодирующем участке гена MYOG1 приводит к замене метионина на валин в белковом транс-

крипте, что приводит к презентации пептида YIGEVLSV в составе молекулы HLA-A*02 [3].

В тимусе, в ходе созревания, среди предшественников наивных Т-клеток элиминируются те, которые не способны распознавать собственные пептид-HLA комплексы (позитивная селекция) и те, которые связывают собственные пептид-HLA комплексы со слишком высокой аффинностью (негативная селекция). Это позволяет убрать из пула клетки, Т-клеточный рецептор которых способен распознавать собственные молекулы HLA слишком хорошо или не распознает вовсе. Таким образом, если в организме донора отсутствует один из аллелей МАГ (МАГ -/-), то такой МАГ не представляется в тимусе, не происходит делеции наивных Т-клеток, способных реагировать на данный пептид. При пересадке такой пептид становится иммуногенным, то есть может вызывать продуктивный иммунный ответ против МАГ +/- или +/+ тканей.

Экспрессия гена, кодирующего МАГ, преимущественно в гемопоэтической ткани реципиента позволяет направить аллореактивный иммунный ответ на опухоль, минимизировав повреждение здоровых тканей больного [4]. Было показано, что различие между донором и реципиентом по одному минорному антигену вызывает эффективный иммунный ответ при лечении гематологических злокачественных новообразований [4]. На сегодняшний день культуры цитотоксических лимфоцитов, распознающих МАГ уже используются в некоторых клинических исследованиях для терапии онкологических заболеваний кроветворной системы [5, 6].

В настоящий момент множество исследований посвящено изучению репертуаров Т-клеточных рецепторов. Использование методов секвенирования нового поколения позволяет получать последовательности большого количества рецепторов одновременно [7], уникальных для каждого человека. На основании этих данных становится возможным изучение структуры репертуаров Т-клеток для отдельных людей, сравнение таких репертуаров у монозиготных близнецов [8], определение фенотипа популяции [9] и видовой принадлежности [10] по их репертуару.

Данное исследование направлено на анализ репертуаров Т-клеточных рецепторов, распознающих минорный антиген HA-2. При помощи протокола антиген-специфичной экспансии нами были получены и проанализированы Т-клеточные клоны, специфичные к антигену

HA-2. Для этого МАГ было показано влияние на клинический исход ТГСК, его наличие у больных и отсутствие у донора повышали вероятность развития РТПО [4]. После *in silico* анализа последовательностей T-клеточных рецепторов, распознающих данный антиген мы обнаружили преимущественное использование конкретных V и J генов в формировании α -цепи (V21 и J42) и высокую частоту использования гена V7-8 при формировании β -цепи, что указывает на существование консервативного мотива, ответственного за распознавание данного минорного антигена. В дальнейшем, изучение репертуаров T-клеточных рецепторов может помочь в понимании механизмов формирования иммунного ответа на различные антигены, а также в идентификации молекулярных механизмов тимусной селекции, ответственных за формирование этих репертуаров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подбор доноров

Образцы цельной крови были получены от здоровых доноров в возрасте >30 лет подписавших информированное согласие, с известным спектром HLA-аллелей, определенных при помощи полимеразной цепной реакции (SSO-ПЦР) на базе ФГБУ ГНЦ Минздрава РФ. Для типирования доноров на наличие однонуклеотидных полиморфизмов, приводящих к появлению минорного антигена HA-2 была проведена ПЦР с использованием аллель-специфичных праймеров (Single (S) Specific (S) Primer (P) – ПЦР) [11]. Реакция проводилась на матрице геномной ДНК с использованием смеси для ПЦР следующего состава: 25 U Taq-полимеразы (EP0402, ThermoScientific, США), 0,01% желатина, 0,2 mM dNTP (R0192, ThermoScientific, США), по 0,5 мкМ праймеров (Евроген, Россия), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) и 6% сахарозы (S7903, SigmaAldrich, Германия). Геномная ДНК выделялась из цельной крови при помощи набора Wizard® Genomic DNA Purification kit (A1120, Promega, США) по инструкции производителя.

Дифференцировка дендритных клеток из моноцитов периферической крови

Из 30 мл периферической крови методом центрифугирования на градиенте плотности фикола (ПанЭко, Россия) [12] была выделена фракция периферических мононуклеарных кле-

ток крови (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC). Далее, в соответствии с протоколом Chapius с соавторами [13]. Для адгезии моноцитов на культуральный пластик, PBMC культивировались в матрасе T25 (83.1810, Sarstedt, Германия) в течение 4 часов в 4 мл полной среды Gibco™ RPMI 1640 (21875-034, Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10% человеческой сыворотки, пенициллин/стрептомицин/глутамин (10378016, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, США), и 1 mM пирувата натрия (100X, Thermo Fisher Scientific, США) при 37°C и 5% CO₂. После неадгезированные клетки отмывали культуральной средой. К моноцитам, прилипшим к пластику, добавлялась полная дифференцировочная среда Gibco™ RPMI 1640, содержащая 800 U/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и интерлейкина-4 (IL-4) (130-095-372 и 130-093-917 Miltenyi Biotec, Германия) в концентрации 10 нг/мл соответственно.

Моноциты дифференцировались в дендритные клетки (ДК) в течение 3-х дней, после чего зрелые ДК нагружались синтетическим пептидом HA-2 (YIGEVLVSV) в концентрации 10 нг/мл в активирующей среде, содержащей 800 U/мл ГМ-КСФ, 10 нг/мл IL-4, 10 нг/мл липополисахарида (ЛПС), 100 U/мл интерферон-гамма (IFN γ). После 16-ти часов инкубации ДК снимали с пластика при помощи фосфатного буфера, содержащего 2 mM ЭДТА и клеточного скребка, и облучали 50 мин суммарной дозой в 50 Грей. ДК, которые активировались без добавления пептида, служили негативным контролем.

Получение и экспансия антигенспецифических T-клеток

Из 50 мл крови выделялись сначала PBMC, затем наивные T-клетки при помощи набора для изоляции наивных CD8⁺ T-клеток (130-093-244, The Naive CD8⁺ T Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с протоколом Wölfel с соавторами [14]. Коротко: в соответствии с инструкцией набора по выделению наивных T-клеток (CCR7⁺CD45RO⁻CD8⁺), на первой стадии производилась деплеция не-наивных T-клеток и НК-клеток при помощи смеси антител (анти-CD45RO, анти-CD56, анти-CD57, анти-CD244), сшитых с биотином, и вторичных антител к биотину, конъюгированных с магнитными частицами. Деплеция проводилась на LD колонке (130-042-901, Miltenyi Biotec, Герма-

ния). На второй стадии происходила непосредственно позитивная селекция наивных CD8⁺ Т-клеток на MS колонке магнитной сепарации (130-042-201, Miltenyi Biotec, Германия) с использованием анти-CD8 антител, конъюгированных с магнитными частицами.

Выделенные наивные Т-клетки смешивали с аутологичными облученными активированными дендритными клетками, в соотношении 2:1 (Т-клетки: дендритные клетки). Клетки рассаживали на 48-луночные культуральные планшеты (677 180, Sigma-Aldrich, Германия), в количестве от $2 \cdot 10^5$ до $1 \cdot 10^6$ CD8⁺ наивных Т-клеток на лунку. Культивация проводилась в стандартной среде с добавлением IL-21 (130-095-767, Miltenyi Biotec, Германия) в концентрации 30 нг/мл в первый день. На 3, 5 и 7 день добавлялись цитокины IL-7 и IL-15 (190-093-937 и 130-095-760, Miltenyi Biotec, Германия) в концентрации 5 нг/мл каждого.

Проточная цитофлуориметрия

Для определения антигенной специфичности Т-клеточных культур на 10–12 день культивации из каждой лунки отбиралось по $1 \cdot 10^6$ клеток для окрашивания HLA-тетрамерами, конъюгированными с флуорохромами и нагруженными HA-2 пептидом. HLA-тетрамеры были получены в нашей лаборатории по протоколу из лаборатории Toebe M. [15]

На предварительной стадии происходила сборка HLA-тетрамеров из мономеров на льду. Для окрашивания $1 \cdot 10^6$ клеток использовали ~200 нг HLA-мономеров, конъюгированных с биотином, которые смешивались с 200 нг стрептавидин-фикоэритрина, осуществляющего сборку (S866, Thermo Fisher Scientific, США) в 10 мкл фотфатного буфера с добавлением 0,5% бычьего сывороточного альбумина (126579, Merck, Германия) и 2 мМ ЭДТА (PBS/BSA/EDTA), в течение 45 минут в темноте.

Параллельно с этим, клеточные суспензии центрифугировались (400 g, 7 минут, 4°C), после чего клеточный осадок суспендировали в 10 мкл PBS/BSA/EDTA, и добавляли по 10 мкл буфера, содержащего собранный тетрамер. Далее происходила инкубация в течение 45 минут на льду в темноте, после чего пробы однократно отмывались, путем разведения в 0,5 мл буфера и центрифугирования. Затем, культуры окрашивались антителами для проточной цитофлуориметрии. Окрашивание производилось в 50 мкл буфера в течение 15 минут на льду. В данной работе исполь-

зовались мышиные антитела к человеческим антигенам: анти-CD3 Alexa Fluor[®] 700 (BD557943), анти-CD8 PerCP-Cy[™]5.5 (BD565310), анти-CCR7 APC-R700 (BD560619), анти-CD45RO PE-Cy[™]7 (BD337168) (BD Biosciences, США), анти-CD137 PE (12-1379-42, eBioscience[™], США). Также был использован интеркалирующий краситель пропидий-йодид (1186276, PI, Thermo Fisher Scientific, США) для разделения живых и мертвых клеток. Анализ производился на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto[™] II. При анализе учитывались только живые одиночные клетки.

Получение лимфобластоидных клеточных линий в качестве антигенпрезентирующих клеток

Для создания аутологичной лимфобластоидной клеточной линии лимфоциты донора выделялись из крови в градиенте плотности фиколла, после чего фракция периферических мононуклеарных клеток осаждалась в центрифуге (350 g, 10 минут, 4°C) и разводилась в 3 мл раствора, содержащего $\sim 3 \cdot 10^6$ частиц вируса Эпштейн-Барр. После 24 часов инкубации при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе, к суспензии добавлялась среда RPMI 1640, содержащая 20% фетальной бычьей сыворотки (SH30071.03HI, FBS HyClone[™], GE Healthcare, США) и 200 нг/мл циклоспорина А. Спустя 2 недели клетки переводились в среду, содержащую 10% FBS.

Рестимуляция Т-клеточной культуры

Для активации антиген специфичных Т-клеток минорным антигеном, пептид HA-2 должен быть представлен в контексте молекул HLA. Для этого В-клетки лимфобластоидной клеточной линии (B-LCL) донора нагружались пептидом в течение 1 часа с в финальной концентрации 10 мМ с последующим облучением в дозе 50 Грей в течение 1 часа.

Непосредственно для стимуляции использовалось $5 \cdot 10^5$ LCL-клеток на каждую лунку культурального планшета, которые добавлялись в лунки с Т-клеточной линией в культуральной среде с добавлением IL-2 в финальной концентрации 50 ед./мл, IL-7 и IL-15 в концентрации 5 нг/мл каждого. Спустя 24 часа после стимуляции, активированные CD8⁺ Т-клетки экспрессировали на поверхности костимуляторную молекулу CD137 (4-1BB) [16].

Получение антиген-специфических клеток, экспрессирующих поверхностный активационный маркер CD137 (4-1BB)

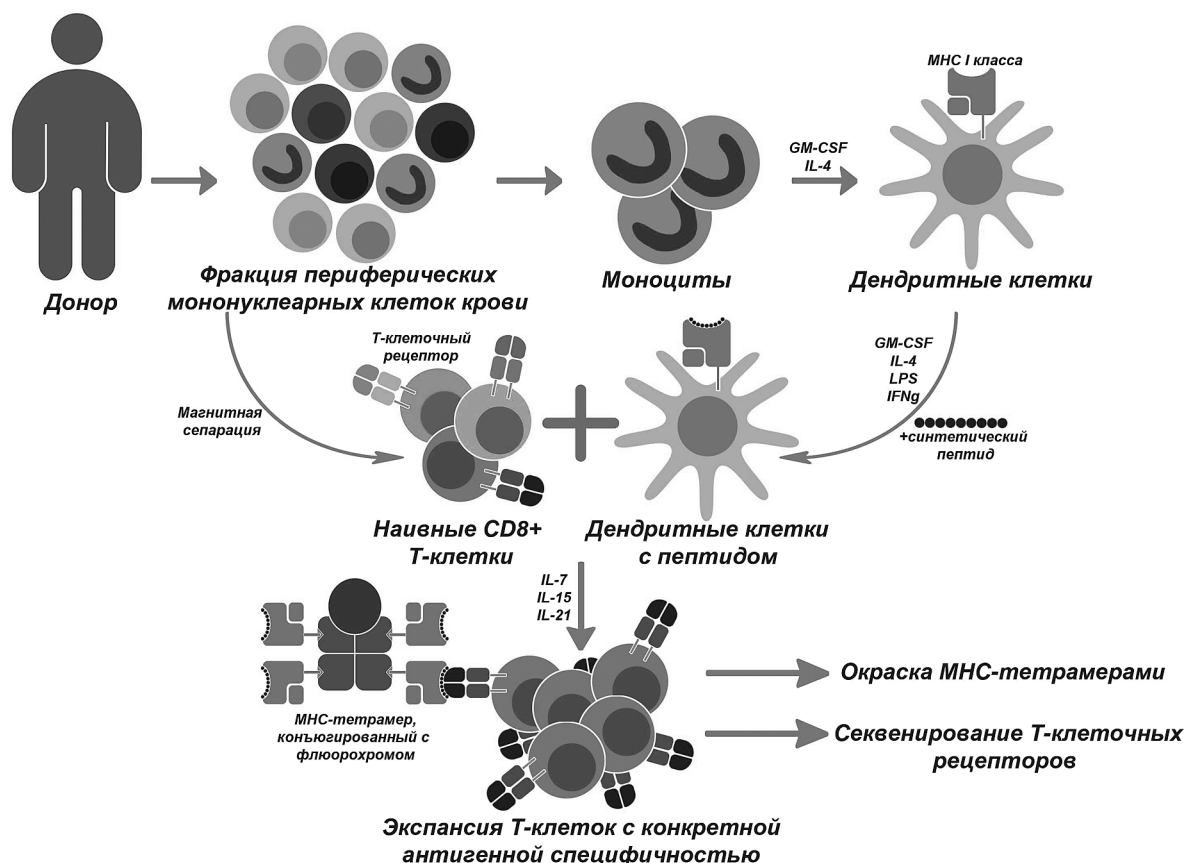


Рис. 1. Общая схема эксперимента. На первом этапе из крови доноров выделялась фракция периферических мононуклеарных клеток. Далее, из этой фракции выделялись моноциты, которые дифференцировались в дендритные клетки, активировались и нагружались синтетическим пептидом. При помощи магнитной сепарации из мононуклеаров выделялись наивные CD8⁺ T-клетки, которые затем ко-культивировались с активированными дендритными клетками, окрашивались HLA-тетрамерами и выделялись при помощи молекулы CD137 для дальнейшего секвенирования T-клеточных рецепторов.

Далее, для анализа свойств T-клеточной культуры, с определенной антигенной специфичностью, активированные T-клетки выделялись из клеточной суспензии методом магнитной сепарации. Поскольку активация происходила антиген-специфично, то и маркер активации CD137 экспрессировался, в основном, на антиген-специфичных T-клетках.

Культура T-клеток окрашивалась анти-CD137 антителом, конъюгированным с фикоэритрином (PE). После отмывки (400 g, 7 минут, 4°C) в смесь добавлялось вторичное антитело, анти-PE, конъюгированное с магнитной частицей (130-048-801, Miltenyi Biotec, Германия). Магнитная сепарация проводилась в соответствии с протоколом производителя на MS-магнитной колонке с использованием OctoMACS-сепаратора (магнит для сепарации) (130-042-109, Miltenyi Biotec, Германия). Итоговая обогащенная фракция CD137⁺ содержала в себе, преимущественно, CD137^{hi} клетки.

Секвенирование α и β цепей T-клеточного рецептора

Полученная после магнитной сепарации фракция CD137^{hi} клеток 0.2-1*10⁶ центрифугировалась (400 g, 7 мин, 4°C) и лизировалась в 0,5 мл TRIzol® LS Reagent (10296028, Thermo Fisher Scientific, США). Далее, по протоколу от производителя, осуществлялась экстракция РНК из лизата. Для получения первой цепи кДНК, кодирующей последовательности α и β цепей T-клеточного рецептора, использовалась РНК-зависимая-ДНК-полимераза MINT-ревертаза (Евроген, Россия) на матрице полученной РНК в количестве 1 мкг по опубликованному протоколу, с использованием праймеров из работы Mamedov et al [7]. Затем следовало 2 последовательных ПЦР с использованием Encyclo полимеразы и праймеров из набора Mint RACE primer set [7]. Далее, каждая из цепей была за-

клонирована в рAL2-Т вектор. Фрагменты рецепторов были вырезаны из 1% агарозного геля и выделены из него с использованием коммерческого набора GeneJet Gel Extraction Kit (K0691, Thermo Scientific, США). Реакция с рAL2-Т вектором проходила с 3-х кратным молярным избытком фрагмента рецептора, лигирование при помощи T4 лигазы проводилось в 20 мкл реакционной смеси в течение 30 минут при комнатной температуре.

Затем, половина смеси после лигирования использовалась для трансформации в компетентные клетки *E.coli* (штамм DH5 α). К компетентным клеткам DH5 α *E.coli* добавлялось 10 мкл лигазной смеси и 4 мкл β -меркаптоэтанола. После 10 минут инкубации на льду у клеток индуцировался термический шок, путем помещения в температуру 42°C на 90 секунд. Далее, после 2-х минутного охлаждения, происходила инкубация при 37°C в течение 30 минут. Бактериальная культура была рассеяна в чашках Петри на LB агар, содержащий карбенициллин в концентрации 50 мкг/мл, и инкубировались 16 часов при температуре 37°C. На следующий день одиночные колонии снимались с чашки Петри, осуществлялась реакция колони-ПЦР и производилась амплификация плазмид, несущих вставку. Полученные плазмиды отправлялись на секвенирование в фирму «Евроген».

Данные по сиквенсам обрабатывались при помощи программного обеспечения ImMuno GeneTics (<http://www.imgt.org/>) и программы CLC Genomics Workbench 7.

In silico анализ последовательностей CDR3 участков был проведен при помощи программы Gephi.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отбор доноров и получение ТКР, распознающих минорный антиген HA-2

Доноры для данного исследования были отобраны по критерию требуемого генотипа по HLA и МАГ. Поскольку минорный антиген HA-2 презентуется в составе молекулы HLA-A*02, то отбирались только доноры, несущие в своем организме данную аллель. Так же необходимо было отобрать доноров, в геноме которых нет однонуклеотидного полиморфизма, приводящего к появлению минорного антигена HA-2. У таких доноров пептид HA-2 не представляется в тимусе, что приводит к тому, что naive T-клетки, специфичные к этому пептиду не элиминируются из репертуара в процессе отрицательной селекций.

Общая схема эксперимента представлена на **рисунке 1**. После 14 дней культивации с добавлением цитокинов IL-21, IL-7, IL-15, наличие HA-2 специфичных клеток детектировано при помощи HLA-тетрамеров, пример такого окрашивания представлен на **рисунке 2**.

На следующей стадии мы использовали рестимуляцию и выделение CD137⁺ клеток при помощи магнитной сепарации с использованием анти-CD137 антитела, поскольку HLA-тетрамеры обладают сравнительно низкой авидностью, и не позволяют выделить T-клеточные популяции с низкой экспрессией ТКР, или потенциальные T-клеточные популяции с низкой аффинностью к антигену [17]. Пример окраски на CD137 до и после сепарации приведен на **рисунке 3**. Для упрощения процедуры выделения CD137^{hi} популяции клетки из всех лунок были



Рис. 2. Пример окрашивания HA-2 тетрамером культур, получивших антигенную стимуляцию. В качестве негативного контроля была сделана культура, не получившая синтетический пептид HA-2 антигена на стадии активации дендритных клеток.

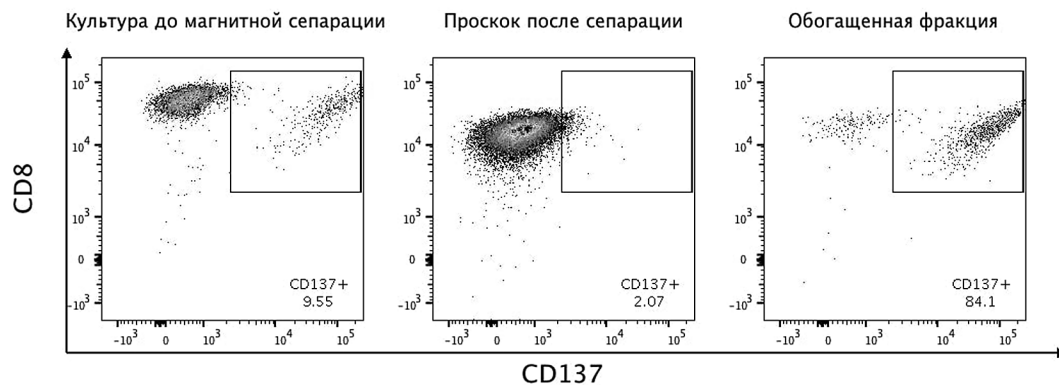


Рис. 3. Окрашивание на маркер CD137 до и после магнитной сепарации.

объединены. В связи с этим, дальнейшие попытки спарить α и β цепи ТКР не представляются возможным, поскольку культура приобрела статус поликлональной.

Для определения клонального состава субпопуляции, обладающей способностью распознавать минорный антиген, нами были отсекужены нуклеотидные последовательности, кодирующие α и β цепи T-клеточных рецепторов [16]. По схеме, изображенной на рисунке 4 производилась пробоподготовка и секвенирование T-клеточных рецепторов данных культур.

Известно, что, не смотря на сниженную экспрессию непродуктивно-перестроенных ТКР, в клетке может обнаруживаться их мРНК. При

помощи CLC Genomics Workbench 7 и программного обеспечения ImMunoGeneTics (<http://www.imgt.org/>) мы проанализировали данные, полученные после секвенирования одиночных бактериальных клонов, проанализировали рамку считывания и наличие стоп-кодона в полученных сиквенсах и отобрали для дальнейшего изучения только продуктивные клоны. Обработанные результаты сиквенсов T-клеточных культур представлены в таблице 1.

Анализ репертуара ТКР, специфически распознающих HA-2 МАГ

Далее был проведен анализ последовательностей HA-2-специфичных рецепторов для того

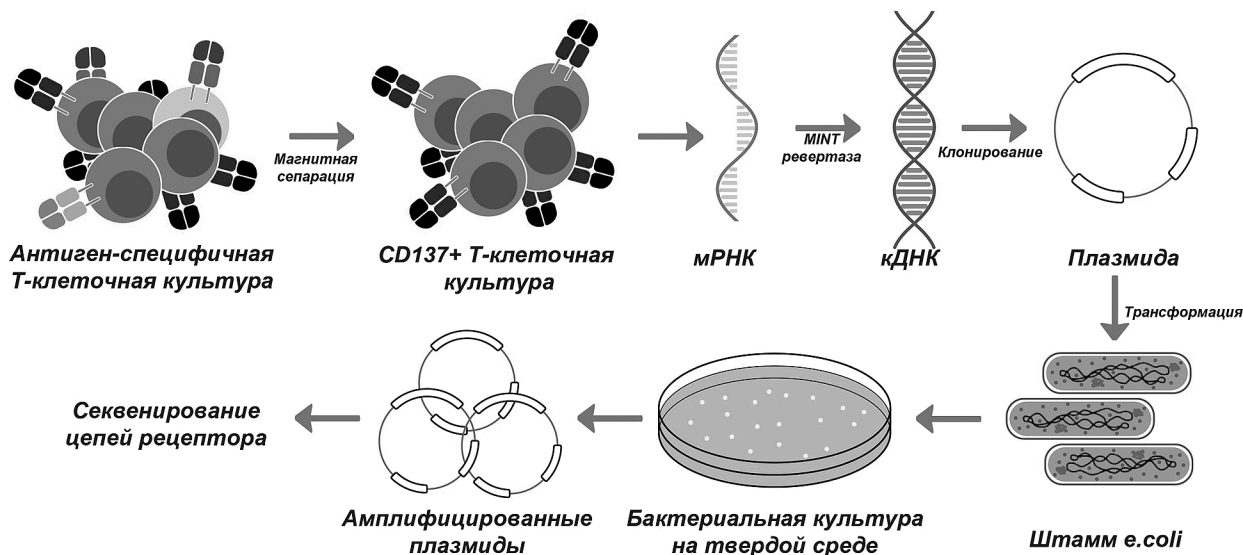


Рис. 4. Схема выделения и секвенирования кодирующей последовательности кДНК из антиген-специфичной T-клеточной культуры. После рестимуляции T-клеточной культуры V-LCL клеточной линией нагруженной пептидом HA-2, специфичные клетки экспрессировали на своей поверхности костимуляторную молекулу CD137. При помощи магнитной сепарации CD137^{hi} клетки отделялись, после чего из них выделялась мРНК и с использованием ревертазы MINT синтезировалась кДНК. Далее кДНК клонировалась в pAL2-T вектор и трансформировалась в E. coli, после чего происходил отбор колоний, амплификация и секвенирование полученных рецепторов.

чтобы выявить имеются ли среди них публичные клоны (одинаковые клоны, обнаруженные у разных людей), консервативные аминокислотные мотивы и преимущественное в использовании определенных V и J генов. Наличие таких закономерностей может указывать на то, что у разных людей ответ на этот МАГ осуществляется при помощи схожих Т-клеточных клонов, которые независимо друг от друга претерпевают одинаковые этапы селекции в тимусе. Ранее, в работе [18] уже были описаны некоторые последовательности Т-клеточных рецепторов, распознающих минорный антиген НА-2, эти опубликованные клоны также были взяты в анализ. Итого, было проанализировано 38 клонов полученных в рамках этой работы лаборатории и 14 ранее описанных клонов [18]. Для α -цепи было обнаружено два публичных клон, а также несколько клонов отличающихся друг от друга на 1 или 2 аминокислотные замены (рис. 5). Наличие таких клонов указывает на присутствие мотива, отвечающего за связывание ТКР с НА-2 пептидом. Мы представили последовательности α -цепи в виде графа последовательностей CDR3 участков (участков, ответственных за узнавание

антигена в контексте HLA-молекулы), в котором последовательности отличающиеся на одну или две замены (или делеции) связаны ребрами (рис. 5). Связная компонента графа (совокупность связанных между собой вершин графа) содержала в себе 12 последовательностей, включая оба публичных клон.

Мы предположили, что данная связная компонента содержит в себе мажорный мотив для связывания НА-2, для этого мы провели аминокислотное выравнивание CDR3 участков α -цепей НА-2-специфичных рецепторов в связной компоненте (рис. 6).

Выравнивание связной компоненты показало, что большую часть вклада в формирование мотива внес ген TCRAJ42 (100% использование), но сопряженная консервативная позиция 6 (G/N) — результат случайных вставок. Анализ использования V генов показал, что в α -цепи наиболее часто встречался ген TCRAV21, который занял 33% всех последовательностей CDR3 и 75% от последовательностей связной компоненты (Рисунок 7А, фиолетовый цвет). Остальные сегменты (TCRAV5, TCRAV16, TCRAV35, TCRAV20 и др.), каждый из которых встреча-

Таблица 1. Результат определения V и J генов неспаренных цепей отсеквенированных НА-2-специфичных Т-клеточных рецепторов.

α -цепь			β -цепь		
V ген	J ген	Длина CDR3	V ген	J ген	Длина CDR3
TRAV5	TRAJ11	10	TRBV28	TRBJ2-2	14
TRAV5	TRAJ42	16	TRBV2	TRBJ2-7	14
TRAV27	TRAJ41	12	TRBV7-8	TRBJ2-1	13
TRAV16	TRAJ29	10	TRBV7-8	TRBJ1-1	13
TRAV19	TRAJ45	15	TRBV7-8	TRBJ2-7	10
TRAV9-2	TRAJ42	14	TRBV18	TRBJ1-5	18
TRAV39	TRAJ43	7	TRBV18	TRBJ1-5	18
TRAV21	TRAJ42	14	TRBV7-8	TRBJ2-5	13
TRAV20	TRAJ42	14	TRBV6-5	TRBJ2-5	15
TRAV20	TRAJ42	14	TRBV28	TRBJ2-2	14
TRAV3	TRAJ5	13	TRBV28	TRBJ2-2	14
TRAV21	TRAJ42	15	TRBV28	TRBJ2-7	12
TRAV21	TRAJ42	15	TRBV15	TRBJ1-6	13
TRAV21	TRAJ42	14	TRBV7-9	TRBJ2-1	13
TRAV16	TRAJ29	10			
TRAV10	TRAJ26	12			

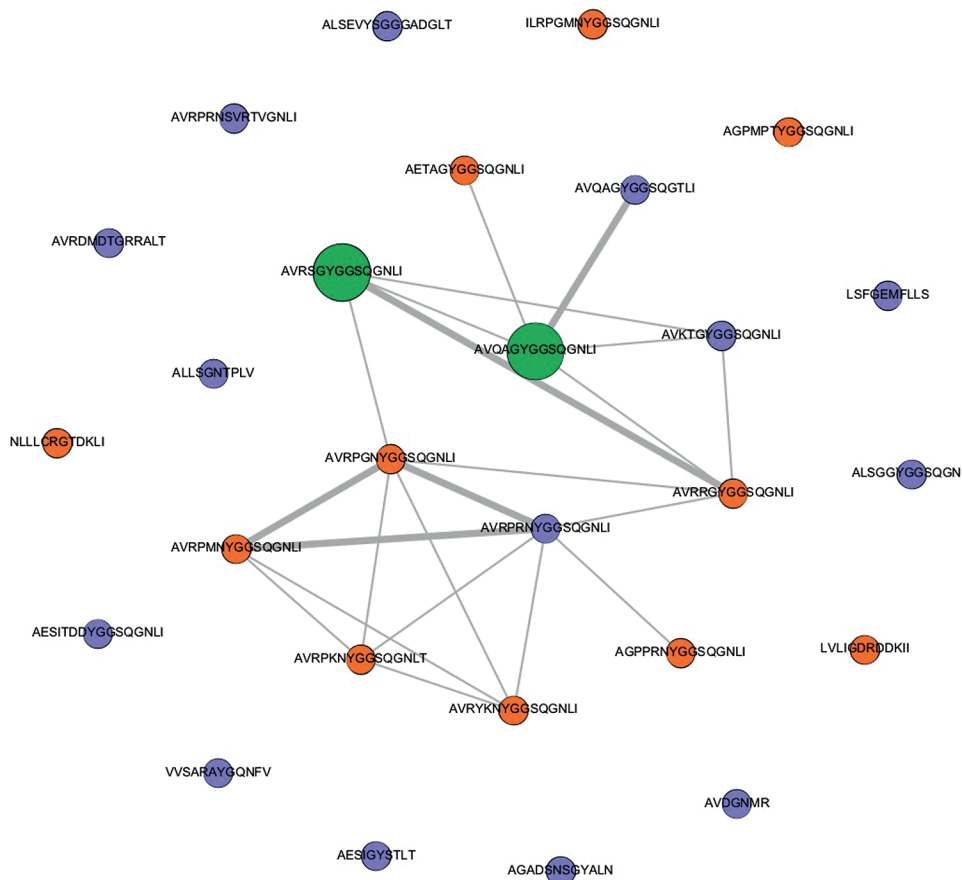


Рис. 5. Кластеризация полученных последовательностей рецепторов с ранее известными. Оранжевым обозначены CDR3 участки α-цепей, описанные группой Heemskerk, фиолетовым обозначены CDR3 участки, полученные нами, зеленым — обнаруженные в обоих исследованиях. Толстые и тонкие линии обозначают одну и две аминокислотные замены соответственно.



Рис. 6. Графическое отображение частот аминокислот, представленных в CDR3 участке α-цепи HA-2-специфичных T-клеточных рецепторов. По горизонтальной оси отложены порядковые номера аминокислот в выровненных CDR3 участках α-цепей HA-2-специфичных рецепторов, по вертикальной оси отложена частота встречаемости аминокислоты среди этих CDR3 участков. Высота и количество букв в каждом положении отражает частоту и количество аминокислот в конкретном положении среди CDR3 участков. С 1 по 6 аминокислоту указан вклад С-конца V гена, с 7 по 15 — вклад N-конца J-гена.

ется примерно в 10% T-клеточных рецепторов, вносят менее существенный вклад. Среди всех J генов α-цепи доминирует ген TCRAJ42, который встречается более чем в 60% всех HA-2 специфичных рецепторов и во всех последова-

тельностьх связанной компоненты (рис. 7B, фиолетовый цвет), что может указывать на то, что существенный вклад в формирование HA-2-специфичного мотива CDR3 участка α-цепи вносит именно ген TCRAJ42.

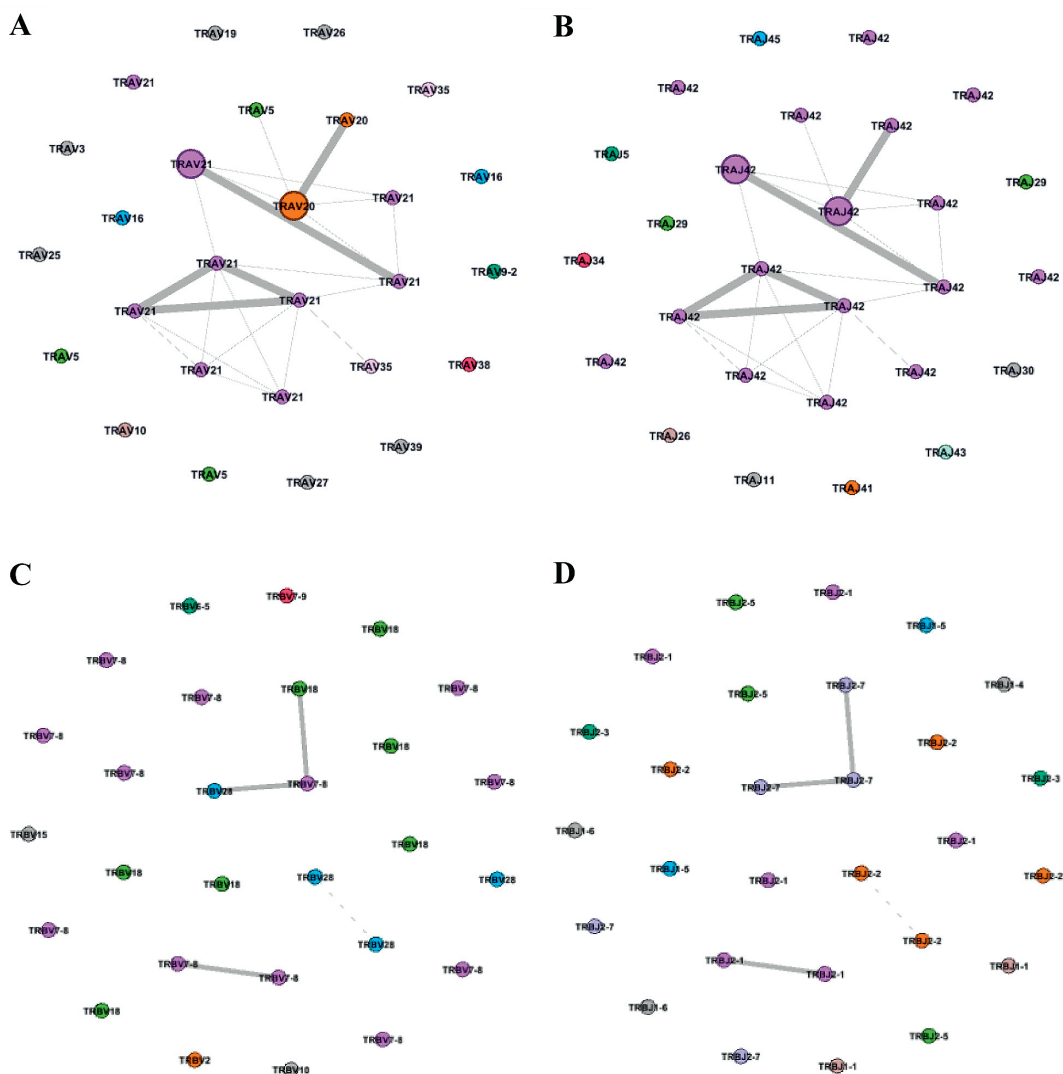


Рис. 7 (A-D). Кластеризация последовательностей CDR3 α и β -цепей HA-2-специфичных Т-клеточных рецепторов по V и J генам рецептора. А – кластеризация по CDR3 участку α -цепи, окрашивание по V гену, В – кластеризация по CDR3 участку α -цепи, окрашивание по J гену, С – кластеризация по CDR3 участку β -цепи, окрашивание по V гену, D – кластеризация по CDR3 участку β -цепи, окрашивание по J гену. На рисунках А и В тонкая линия отражает расстояние между CDR3 участками в одну аминокислотную замену, толстая в две аминокислотных замены. На рисунках С и D толстая линия отражает расстояние в две аминокислотных замены, тонкая в три.

Для β -цепи публичных CDR3 участков обнаружено не было. V ген HA-2 специфических рецепторов для β -цепи не образует ярко выраженного кластера по CDR3 участку, однако было замечено преобладание часто встречающегося гена TCRVB7-8 более чем в 40% CDR3 участках (**рисунок 7 С и D**, фиолетовый цвет). Из этого можно сделать вывод, что узнавание минорного антигена HA-2 происходит в основном при помощи CDR3 α -цепи Т-клеточного рецептора, в то время как в CDR3 участки β -цепи не гомологичны. Преобладание сегмента TCRVB7-8 может указывать на вклад в распознавание этого антигена CDR1 и CDR2 участков β -цепи.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время проблема изучения алло-реактивного иммунного ответа после трансплантации стволовых клеток крови от родственного или неродственного донора является актуальной, поскольку молекулярные механизмы её развития до конца не изучены. Усиление РТПО представляет собой потенциальное дополнение к основной противоопухолевой терапии для предотвращения возникновения рецидива, в то время как РТПХ представляет серьезную опасность для пациентов. При HLA-совместимой трансплантации мишенью для обеих реакций

являются минорные антигены гистосовместимости, профиль экспрессии которых может влиять на развитие иммунного ответа в ту или другую сторону. Изучение иммунного ответа на конкретные минорные антигены может помочь в разработке подходов к снижению частоты развития РТПХ и усилению эффекта РТПО.

В данном исследовании были изучены репертуары Т-клеточных рецепторов, специфичных к минорному антигену гистосовместимости HA-2, презентруемого в контексте аллеля HLA-A*02, для которого была показана экспрессия преимущественно в гемопоэтических клетках. Так же было показано, что HA-2-специфичные Т-клеточные клоны проявляют высокую противоопухолевую активность [4]. Все это потенциально делает HA-2 антиген хорошей мишенью для изучения в контексте РТПО.

Сравнивая данные, полученные нами с данными группы Heemskerk мы обнаружили, что для HA-2-специфичных рецепторов характерно наличие выраженного мотива в CDR3 участке на α -цепи, и отсутствие такового для β -цепи. Образование данного мотива на α -цепи объясняется высокой частотой использования конкретных V и J генов при сборке данной цепи (чаще всего TCRAV21 и TCRAJ42). При выравнивании аминокислотных последовательностей CDR3 участков α -цепи, входящих в состав связной компоненты графа (рис. 6) видно, что C-конец J гена вносит наибольший вклад в формирование доминантного мотива, ответственного за распознавание Т-клеточным рецептором комплекса HLA молекулы с HA-2 пептидом. Для β -цепи похожих закономерностей в формировании CDR3 участка обнаружено не было, однако видно, что в β -цепи превалирует V сегмент TCRVB7-8. Это может указывать на то, что CDR3 участок β -цепи не несет значимой роли в распознавании пептида HA-2, но при этом вероятно важны участки CDR1 и CDR2, обеспечивающие консервативное распознавание молекулы HLA. Какой-либо зависимости в выборе J гена для β -цепи обнаружено не было.

Выводы, сделанные нами на основе *in silico* анализа HA-2-специфичных рецепторов, нуждаются в дополнительном подтверждении. Полученных данных на этом этапе недостаточно, чтобы с абсолютной уверенностью рассуждать о консервативности HA-2-специфичных мотивов α -цепи. Необходимо расширение панели доноров с аллелью HLA-A*02 и генотипом HA-2-/- для получения HA-2-специфичных

культур и секвенирования их рецепторов. В дальнейшем, использование кластерного анализа для культур с известной антигенной специфичностью может помочь в предсказании специфичности произвольного Т-клеточного рецептора по его последовательности [19–21].

Изучение минорных антигенов гистосовместимости может стать основой для персонализированной терапии в отношении опухолевых заболеваний кроветворной системы. На сегодняшний день нет возможности подбирать донора исходя из спектра представленных минорных антигенов в организме донора и реципиента. Однако, в дальнейшем, генная инженерия Т-клеточных рецепторов может сделать возможным создание персонализированных библиотек рецепторов, которые будут распознавать антигены исключительно на гемопоэтических клетках, минимизируя шанс возникновения РТПХ и запуская реакцию против опухолевых клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Barrett A. J., Battiwalla M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol* 2010, 3, 429–441.
2. Birnbaum M. E., Mendoza J. L., Sethi D. K., Dong S., Glanville J., Dobbins J., Özkan E., Davis M. M., Wucherpfennig K. W., Garcia K. C. Deconstructing the peptide-MHC specificity of T cell recognition. *Cell* 2014, 157, 1073–1087.
3. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968, Suppl 97, 77–89.
4. Chapuis F., Rosenzweig M., Yagello M., Ekman M., Biberfeld P., Gluckman J. C. Differentiation of human dendritic cells from monocytes *in vitro*. *European Journal of Immunology* 1997, 27, 431–441.
5. Dash P., Fiore-Gartland A. J., Hertz T., Wang G. C., Sharma S., Souquette A., Crawford J. C., Clemens E. B., Nguyen T. H. O., Kedzierska K. Quantifiable predictive features define epitope-specific T cell receptor repertoires. *Nature* 2017, 547, 89.
6. den Haan J. M., Sherman N. E., Blokland E., Huczko E., Koning F., Drijfhout J. W., Skipper J., Shabanowitz J., Hunt D. F., Engelhard V. H., and et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 1995, 268, 1476–1480.
7. Glanville J., Huang H., Nau A., Hatton O., Wagar L. E., Rubelt F., Ji X., Han A., Krams S. M., Pettus C., et al. Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire. *Nature* 2017, 547, 94–98.
8. Heemskerk M. H., Hoogeboom M., de Paus R. A., Kester M. G., van der Hoorn M. A., Goulmy E., Willemze R., Falkenburg J. H. Redirection of antileukemic reactivity of peripheral T lymphocytes using gene transfer of mi-

- nor histocompatibility antigen HA-2-specific T-cell receptor complexes expressing a conserved alpha joining region. *Blood* 2003, 102, 3530–3540.
9. Heemskerk M. H., Hooigeboom M., Hagedoorn R., Kester M. G., Willemze R., Falkenburg J. H. Reprogramming of virus-specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer. *J Exp Med* 2004, 199, 885–894.
 10. Hobo W., Broen K., van der Velden W. J., Greupink-Draaisma A., Adisty N., Wouters Y., Kester M., Fredrix H., Jansen J. H., van der Reijden B., et al. Association of disparities in known minor histocompatibility antigens with relapse-free survival and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013, 19, 274–282.
 11. Li H. M., Hiroi T., Zhang Y., Shi A., Chen G., De S., Metter E. J., Wood W. H., Sharov A., Milner J. D., et al. TCR β repertoire of CD4(+) and CD8(+) T cells is distinct in richness, distribution, and CDR3 amino acid composition. *Journal of Leukocyte Biology* 2016, 99, 505–513.
 12. Madi A., Poran A. T cell receptor repertoires of mice and humans are clustered in similarity networks around conserved public CDR3 sequences. 2017, 6.
 13. Mamedov I. Z., Britanova O. V., Zvyagin I. V., Turchaninova M. A., Bolotin D. A., Putintseva E. V., Lebedev Y. B., Chudakov D. M. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol* 2013, 4, 456.
 14. Meij P., Jedema I., van der Hoorn M. A., Bongaerts R., Cox L., Wafelman A. R., Marijt E. W., Willemze R., Falkenburg J. H. Generation and administration of HA-1-specific T-cell lines for the treatment of patients with relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation: a pilot study. *Haematologica* 2012, 97, 1205–1208.
 15. Toebes M., Rodenko B., Ovaa H., Schumacher T. N. Generation of peptide MHC class I monomers and multimers through ligand exchange. *Curr Protoc Immunol* 2009, Chapter 18, Unit 18 16.
 16. van Bergen C. A., van Luxemburg-Heijs S. A., de Wree-de L. C., Eefting M., von dem Borne P. A., van Balen P., Heemskerk M. H., Mulder A., Claas F. H., Navarrete M. A., et al. Selective graft-versus-leukemia depends on magnitude and diversity of the alloreactive T cell response. *J Clin Invest* 2017, 127, 517–529.
 17. Vdovin A. S., Postovskaya A. M., Bykova N. A., Romaniuk D. S., Alieva A. K., Yefimova P. R., Sheetikov S. A., Julhakyan H. L., Efimov G. A. Comparative analysis of minor histocompatibility antigens genotyping methods. *Oncohematology* 2016, 11, 40–50.
 18. Warren E. H., Fujii N., Akatsuka Y., Chaney C. N., Mito J. K., Loeb K. R., Gooley T. A., Brown M. L., Koo K. K., Rosinski K. V., et al. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood* 2010, 115, 3869–3878.
 19. Wolfl M., Greenberg P. D. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells. *Nat Protoc* 2014, 9, 950–966.
 20. Wolfl M., Kuball J., Ho W. Y., Nguyen H., Manley T. J., Bleakley M., Greenberg P. D. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8(+) T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood* 2007, 110, 201–210.
 21. Zvyagin I. V., Pogorelyy M. V., Ivanova M. E., Komech E. A., Shugay M., Bolotin D. A., Shelenkov A. A., Kurnosov A. A., Staroverov D. B., Chudakov D. M., et al. Distinctive properties of identical twins' TCR repertoires revealed by high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014, 111, 5980–5985.

IN SILICO ANALYSIS OF T-CELL RECEPTORS SPECIFIC TO THE MINOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN HA-2

© 2019 S. A. Sheetikov^{1,2*}, A. A. Kuchmiy¹, N. A. Bykova¹,
S. Yu. Filkin¹, D. S. Romaniuk¹, G. A. Efimov^{1,2}

*E-mail: sheetikov.s@blood.ru

¹National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC),
laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Received: 25.12.2018. **Accepted:** 21.01.2019

Hematopoietic stem cells transplantation of (HSCT) from the related or unrelated donor is used as a treatment for hematopoietic system malignancies. However, transplantation triggers an immune response of the donor cells to the recipient's antigens. The response to the healthy tissues is called a graft versus host reaction (GVHD), and the response to the hematopoietic tissue in the context of malignant disease is called a graft versus leukemia (GVL) effect. The development of GVL reactivity is a favorable consequence of transplantation, since it eliminates residual tumor cells and prevents the relapse. It was demonstrated that immune response arises towards polymorphic peptides, presented in the molecules of the major histocompatibility complex (HLA). Such peptides are derived from the proteasomal degradation of proteins expressed from the genes with non-synonymous single nucleotide polymorphisms and are referred to as minor histocompatibility antigens (MiHA). Studying the structure of T-cell receptor (TCR) repertoires that recognize MiHAg can help identify the mechanisms for the formation of the alloreactive response and is important for predicting the antigen of alloreactive clones with unknown specificity. In this article the genetic sequences encoding T-cell receptors specific to the HA-2 minor antigen were determined and analyzed *in silico*. We found the predominant use of the V21 and J42 segments in the formation of the CDR3 region of the α -chain and the presence of the V7-8 segment in most CDR3 β -chain regions, which indicates the existence of a conservative motif responsible for recognizing the HA-2 antigen.

Key words: GVHD, GVL, HSCT, T cell receptor, minor antigens of histocompatibility, alloreactive response

Authors:

Sheetikov S. A., ✉ trainee-researcher, National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC), laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia; Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

125167, Moscow, Novy Zykovsky pr. 4, National Research Center for Hematology. Phone: +7(965)2014787 (mob.), +7(495)6124443.

E-mail: sheetikov.s@blood.ru;

Kuchmiy A. A., PhD (Biology), research scientist National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC), laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia;

Bykova N., research scientist National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC), laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia;

Filkin S., research scientist National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC), laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia;

Romanyuk D., research scientist National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC), laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia;

Efimov G., PhD (Biology), Head of Laboratory National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences (HSC), laboratory of transplantation immunology, Moscow, Russia; Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ФЕНОТИП И РИСК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

© 2019 г. А. Н. Глушков^{1*}, Е. Г. Поленок¹, С. А. Мун¹, Л. А. Гордеева¹,
М. В. Костянко², А. В. Антонов³, Н. Е. Вержбицкая³, И. А. Вафин⁴

*E-mail: ihe@list.ru

¹ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН»,
Институт экологии человека, Кемерово, Россия;

²ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»,
Институт фундаментальных наук, Кемерово, Россия;

³ГБУЗ КО Областной клинический онкологический диспансер,
Кемерово, Россия;

⁴Кемеровский областной центр крови, Кемерово, Россия

Поступила: 16.10.2018. Принята: 15.01.2019

Анализ IgA, специфичных к бензо[а]пирену (Bp), эстрадиолу (Es) и прогестерону (Pg), в сыворотке крови 400 здоровых женщин и 1284 больных раком молочной железы (РМЖ) позволил выявить следующие иммунологические фенотипы: «протективный», ассоциированный с минимальным риском РМЖ (OR=0,2–0,6), при котором индивидуальный уровень IgA-Pg превосходит уровни IgA-Bp и IgA-Es; «проканцерогенный» с максимальным риском РМЖ (OR=2,1–6,2), при котором уровни IgA-Bp и IgA-Es превосходят уровень IgA-Pg; и два «компенсаторных» (OR=0,7–1,2) при которых уровень IgA-Pg превосходит уровень IgA-Bp или IgA-Es. Наличие того или иного иммунофенотипа не зависело от возраста и курения. Выявлены различия во взаимосвязях уровней IgA-Bp с IgA-Es и IgA-Pg при различных иммунологических фенотипах. Результаты могут быть полезными при разработке и применении антиканцерогенных вакцин для иммунопрофилактики рака.

Ключевые слова: рак молочной железы, антитела, бензо[а]пирен, эстрадиол, прогестерон

DOI: 10.31857/S102872210005019-5

Адрес: 650065, г. Кемерово, пр-т Ленинградский, 10, Россия, ФИЦ УУХ СО РАН ИЭЧ, Мун Стелла Андреевна. Тел.: + 8(3842)575079.

E-mail: stellamun@yandex.ru

Авторы:

Глушков А. Н., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, Институт экологии человека, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН», Кемерово, Россия;

Поленок Е. Г., к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии, Институт экологии человека, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН», Кемерово, Россия;

Мун С. А., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики, Институт экологии человека, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН», Кемерово, Россия;

Гордеева Л. А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики, Институт экологии человека, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН», Кемерово, Россия;

Костянко М. В., ведущий инженер кафедры органической химии, Институт фундаментальных наук, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», Кемерово, Россия;

Антонов А. В., заместитель главного врача по хирургии, ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», Кемерово, Россия;

Вержбицкая Н. Е., к.м.н., заведующая патологоанатомическим отделением, ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», Кемерово, Россия;

Вафин И. А., главный врач, ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», Кемерово, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) — наиболее распространенное онкологическое заболевание у женщин в России и мире [1, 2]. Разработка новых методов определения индивидуального риска возникновения РМЖ и средств его профилактики, основанная на изучении неизвестных

ранее механизмов канцерогенеза молочной железы, остается актуальной задачей современной биологии и медицины.

Ключевым звеном патогенеза РМЖ является образование ДНК-аддуктов с метаболитами полициклических ароматических углеводородов окружающей среды [3, 4] и эндогенных эстрогенов [5, 6]. Указанные низкомолекулярные соединения в комплексе с макромолекулярным носителем могут служить индукторами синтеза специфических антител (АТ), которые, в свою очередь, способны модулировать содержание химических канцерогенов и стероидных гормонов в сыворотке крови и органах-мишенях и их биологические эффекты, как это было показано в экспериментах по иммунизации животных [7–12].

Таким образом, АТ к химическим канцерогенам и стероидным гормонам в сыворотке крови человека представляются не только биологическими маркерами канцерогенеза, но и активными участниками процессов инициации и промоции. Иммуноанализ таких АТ можно использовать для определения индивидуальных онкологических рисков, а в перспективе станет необходимым для оценки эффективности новых средств иммунопрофилактики рака с помощью антиканцерогенных вакцин [13, 14, 15].

Ранее были выявлены ассоциации уровней АТ к бензо[а]пирену (Вр), эстрадиолу (Еs) и прогестерону (Рg) с РМЖ у женщин в постменопаузе [16, 17]. Однако при этом не учитывали влияние возраста и канцерогенного воздействия (курение) на их образование.

Цель настоящей работы – исследовать особенности образования IgA-Вр, IgA-Еs, IgA-Рg у здоровых женщин и больных РМЖ отдельных возрастных групп с учетом фактора курения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были обследованы 1684 женщины в постменопаузе. В исследуемую группу были включены 1284 женщины с диагнозом инвазивная карцинома молочной железы, которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз РМЖ в каждом случае был подтвержден морфологически. Медиана возраста женщин в исследуемой группе – 62 года (интерквартильный размах 57–69). Среди них было курящих 105 (8%) и некурящих 1179 (92%). В группу сравнения были включены 400 условно здоровых женщин, проживающих на территории

Кемеровской области, и доноры Кемеровского центра крови, без патологии молочной железы. Медиана возраста женщин в группе сравнения – 57 лет (интерквартильный размах 42–80). Среди них было 45 (11%) курящих и 355 (89%) некурящих.

Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинской декларацией 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем.

Иммуноанализ IgA АТ к Вр, Еs и Рg (IgA-Вр, IgA-Еs, IgA-Рg) проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа. В качестве антигенов на полистирольные иммунологические планшеты были иммобилизованы конъюгаты Вр, Еs и Рg с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Конъюгат Вр-BSA был синтезирован по методике, описанной в работе [18]. Конъюгат Еs-BSA был синтезирован путем присоединения BSA к эстрадиолхинонам, полученным окислением Еs солью Фреми. Конъюгат Рg-BSA был получен путем конъюгации гемиглутарата 21-гидроксипрогестерона и BSA карбодиимидным способом. Иммунологические планшеты сенсibilизировали конъюгатами гаптен-BSA по 100 мкл в лунку в концентрации 2 мкг/мл при комнатной температуре в течение ночи. Для оценки фонового связывания АТ с белком-носителем в отдельные лунки вносили неконъюгированный BSA. Для блокировки свободных мест на пластике во все лунки вносили по 250 мкл блокирующего буфера (натрий-фосфатный буфер PBS, содержащий 0,5% BSA и 0,05% Tween-20) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Образцы сыворотки крови разводили 1:20 блокирующим буфером и вносили по 100 мкл в лунки планшета в дублях, инкубировали 1 ч при 37 °С на шейкере. Связавшиеся АТ выявляли с помощью козых АТ против IgA человека, меченных пероксидазой хрена (Novex, США), разведение конъюгата 1:10000. В лунки вносили по 100 мкл меченных АТ и инкубировали 1 ч при 37 °С на шейкере. После каждого этапа инкубации планшеты промывали 4–5 раз PBS, содержащим 0,05% Tween-20. Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводили с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметилбензидин (ТМВ, США), на фотометре Униплан (Пикон, Россия) при длине волны

450 нм. Уровни АТ выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

$$\text{IgA-X} = (\text{ODX-BSA} - \text{ODBSA}) / \text{ODBSA}$$

где X = Bp, Es, Pg; ODX-BSA – связывание АТ с конъюгатом гаптен-BSA, ODBSA – фоновое связывание с BSA.

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Ненормальный характер распределения количественных показателей определили с помощью критерия Шапиро-Уилка и в дальнейшем статистически значимые различия между группами выявляли с помощью непараметрического критерия χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность вариации. За критический уровень значимости принималось значение $p < 0,05$. Для выявления пороговых значений уровней АТ (cut-off) был проведен ROC-анализ [19]. Ассоциации исследуемых АТ с РМЖ оценивали на

основании величины отношения шансов (odds ratio, OR) с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости. Для оценки взаимосвязей между уровнями специфичных АТ использовали ранговую корреляцию по Спирмену.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Индивидуальные иммунологические фенотипы у женщин в постменопаузе

С помощью ROC-анализа рассчитали пороговые значения уровней IgA, специфичных к Bp, Es, Pg, а также индивидуальных соотношений уровней указанных АТ, по которым сравниваемые группы имели наиболее значимые различия (cut-off). В **таблице 1** представлено распределение случаев по числу и частоте встречаемости с низким и высоким значениями уровней АТ и их соотношений в сравниваемых группах без учета возраста и курения.

Таблица 1. Число (n) и частота встречаемости (%) случаев с низким (\leq) и высоким ($>$) уровнями антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону и их соотношений в сыворотке крови у здоровых женщин и больных раком молочной железы (РМЖ) в постменопаузе

Антитела, соотношения, комбинации соотношений	Больные РМЖ N=1284	Здоровые женщины N=400	χ^2 , (p)	OR (95%CI)
	n/%	n/%		
1.1. IgA-Bp \leq 3,0 $>$ 3,0	684/53,3 600/46,7	252/63,0 148/37,0	11,3 (0,0008)	0,7 (0,5–0,8) 1,5 (1,2–1,9)
1.2. IgA-Es \leq 3,0 $>$ 3,0	715/55,7 569/44,3	222/55,5 178/44,5	0,0 (0,994)	1,0 (0,8–1,3) 1,0 (0,8–1,2)
1.3. IgA-Pg \leq 3,0 $>$ 3,0	892/69,5 392/30,5	226/56,5 174/43,5	22,42 (<0,0001)	1,8 (1,4–2,2) 0,6 (0,5–0,7)
2.1. IgA-Bp/IgA-Es \leq 1,0 $>$ 1,0	619/48,2 665/51,8	238/59,5 162/40,5	15,11 (0,0001)	0,6 (0,5–0,8) 1,6 (1,3–2,0)
2.2. IgA-Bp/IgA-Pg \leq 1,0 $>$ 1,0	396/30,8 888/69,2	233/58,3 167/41,7	96,75 (<0,0001)	0,3 (0,2–0,4) 3,1 (2,5–3,9)
2.3. IgA-Es/IgA-Pg \leq 1,0 $>$ 1,0	375/29,2 909/70,8	207/51,8 193/48,2	67,55 (<0,0001)	0,4 (0,3–0,5) 2,6 (2,0–3,3)
3.1. IgA-Bp/IgA-Pg \leq 1,0 IgA-Es/IgA-Pg \leq 1,0	241/18,8	163/40,8	79,6 (<0,0001)	0,3 (0,3–0,4)
3.2. IgA-Bp/IgA-Pg $>$ 1,0 IgA-Es/IgA-Pg \leq 1,0	134/10,4	44/11,0	0,1 (0,820)	0,9 (0,7–1,4)
3.3. IgA-Bp/IgA-Pg \leq 1,0 IgA-Es/IgA-Pg $>$ 1,0	155/12,1	70/17,5	7,3 (0,007)	0,6 (0,5–0,9)
3.4. IgA-Bp/IgA-Pg $>$ 1,0 IgA-Es/IgA-Pg $>$ 1,0	754/58,7	123/30,8	94,5 (<0,0001)	3,2 (2,5–4,1)

Таблица 2. Распределение женщин в сравниваемых группах по факторам «возраст» и «курение»

Возраст (лет) Курение (+/–)	Больные РМЖ N=1284	Здоровые женщины N=400	χ^2 , (p)
	n/%	n/%	
1.1. Курение –	1179/91,8	355/88,8	3,2 (0,746)
1.2. Курение +	105/8,2	45/11,2	
2.1. Возраст \leq 59	476/37,1	268/67,0	109,6 (<0,0001)
2.2. Возраст > 59	808/62,9	132/33,0	

Таблица 3. Число (n) и частота встречаемости (%) низких (\leq) и высоких (>) значений соотношений исследуемых антител в зависимости от фактора курения у здоровых женщин и больных раком молочной железы (РМЖ) в постменопаузе

Комбинация соотношений антител	Больные РМЖ N=1284		Здоровые женщины N=400	
	Курение + N=105	Курение – N=1179	Курение + N=45	Курение – N=355
	n/%	n/%	n/%	n/%
1. IgA-Vp/IgA-Pg \leq 1,0 IgA-Es/IgA-Pg \leq 1,0	13/12,4	228/19,3	15/33,6	148/41,7
2. IgA-Vp/IgA-Pg > 1,0 IgA-Es/IgA-Pg \leq 1,0	9/8,6	125/10,6	2/4,4	42/11,8
3. IgA-Vp/IgA-Pg \leq 1,0 IgA-Es/IgA-Pg > 1,0	14/13,3	141/12,0	13/28,9	57/16,1
4. IgA-Vp/IgA-Pg > 1,0 IgA-Es/IgA-Pg > 1,0	69/65,7	685/58,1	15/33,6	108/30,4
χ^2 (p), df=3	3,970 (0,265)		6,534 (0,089)	

Высокие уровни IgA-Vp у больных РМЖ встречались статистически значимо чаще, а IgA-Pg – реже, чем у здоровых женщин (OR=1,5 и OR=0,6, соответственно). По частоте обнаружения высоких и низких значений уровней IgA-Es сравниваемые группы не различались.

Анализ индивидуальных соотношений уровней исследуемых АТ оказался более информативным (позиции 2.1–2.3). Максимальные различия между здоровыми женщинами и больными РМЖ выявлены для соотношений IgA-Vp/IgA-Pg и IgA-Es/IgA-Pg. Когда уровни IgA-Vp и IgA-Es превышали уровни IgA-Pg значения OR, составляли 3,1 и 2,6 соответственно. Если уровни IgA-Pg превышали таковые IgA-Vp и IgA-Es, риск РМЖ снижался до OR=0,3 и OR=0,4.

Однако, это утверждение соответствовало действительности только при определенных индивидуальных комбинациях указанных соотношений. Риск возникновения РМЖ снижался

(OR=0,3) только тогда, когда уровни и IgA-Vp, и IgA-Es одновременно были ниже, чем уровни IgA-Pg (позиция 3.1). Такой индивидуальный иммунологический фенотип обозначили как «протективный». Высокий риск РМЖ (OR=3,2) выявлен только в тех случаях, когда уровни и IgA-Vp, и IgA-Es одновременно были выше, чем уровень IgA-Pg (позиция 3.4). Такой иммунологический фенотип обозначили как «проканцерогенный». Если уровень IgA-Pg был ниже, чем IgA-Vp, но выше, чем IgA-Es (позиция 3.2), значение OR составляло 0,9 (0,7–1,4), т.е. риск РМЖ отсутствовал. Если уровень IgA-Pg был выше, чем IgA-Vp, но ниже, чем IgA-Es (позиция 3.3) значение OR составляло 0,6 (0,5–0,9). В этих случаях проканцерогенное действие IgA-Vp или IgA-Es было компенсировано высокими уровнями IgA-Pg, поэтому такие иммунологические фенотипы обозначены как «компенсаторные» первого типа и второго типа соответственно.

Таблица 4. Число (n) и частота встречаемости (%) комбинаций низких (\leq) и высоких ($>$) значений соотношений исследуемых антител в зависимости от фактора возраста у здоровых женщин и больных раком молочной железы (РМЖ) в постменопаузе

Комбинация соотношений антител	Больные РМЖ N=1284				Здоровые женщины N=400			
	≤ 50	51–60	61–70	> 70	≤ 50	51–60	61–70	> 70
	N=69	N=475	N=484	N=256	N=47	N=243	N=96	N=14
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%
1. IgA-Bp/IgA-Pg $\leq 1,0$ IgA-Es/IgA-Pg $\leq 1,0$	8/11,6	95/20,0	87/18,0	51/19,9	23/48,9	86/35,4	48/50,0	6/42,9
2. IgA-Bp/IgA-Pg $> 1,0$ IgA-Es/IgA-Pg $\leq 1,0$	10/14,5	44/9,3	52/10,7	28/10,9	3/6,4	31/12,8	8/8,3	2/14,3
3. IgA-Bp/IgA-Pg $\leq 1,0$ IgA-Es/IgA-Pg $> 1,0$	9/13,0	57/12,0	59/12,2	30/11,7	10/21,3	41/16,9	16/16,7	3/21,4
4. IgA-Bp/IgA-Pg $> 1,0$ IgA-Es/IgA-Pg $> 1,0$	42/60,9	279/58,7	286/59,1	147/57,4	11/23,4	85/35,0	24/25,0	3/21,4
χ^2 (p), df=9	4,667 ($>0,05$)				11,133 ($>0,05$)			

Таблица 5. Влияние индивидуальных особенностей образования антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону на риски возникновения рака молочной железы у женщин в постменопаузе в различных возрастных подгруппах

Возраст, комбинация соотношений уровней антител	Больные РМЖ	Здоровые женщины	χ^2 (p)	OR (95% CI)
	n/%	n/%		
1. ≤ 59 лет	N=476	N=268		
1.1. IgA-Bp/IgA-Pg $\leq 1,0$ IgA-Es/IgA-Pg $\leq 1,0$	89/18,7	99/36,9	29,26 ($<0,0001$)	0,4 (0,3–0,6)
1.2. IgA-Bp/IgA-Pg $> 1,0$ IgA-Es/IgA-Pg $\leq 1,0$	48/10,1	32/11,9	0,44 (0,508)	0,8 (0,5–1,3)
1.3. IgA-Bp/IgA-Pg $\leq 1,0$ IgA-Es/IgA-Pg $> 1,0$	60/12,6	48/17,9	3,47 (0,062)	0,7 (0,4–1,0)
1.4. IgA-Bp/IgA-Pg $> 1,0$ IgA-Es/IgA-Pg $> 1,0$	279/58,6	89/33,2	43,26 ($<0,0001$)	2,8 (2,1–3,9)
2. > 59 лет	N=808	N=132		
2.1. IgA-Bp/IgA-Pg $\leq 1,0$ IgA-Es/IgA-Pg $\leq 1,0$	152/18,8	64/48,5	54,78 ($<0,0001$)	0,2 (0,2–0,4)
2.2. IgA-Bp/IgA-Pg $> 1,0$ IgA-Es/IgA-Pg $\leq 1,0$	86/10,6	12/9,1	0,15 (0,698)	1,2 (0,6–2,2)
2.3. IgA-Bp/IgA-Pg $\leq 1,0$ IgA-Es/IgA-Pg $> 1,0$	95/11,8	22/16,7	2,08 (0,149)	0,7 (0,4–1,1)
2.4. IgA-Bp/IgA-Pg $> 1,0$ IgA-Es/IgA-Pg $> 1,0$	475/58,8	34/25,8	48,54 ($<0,0001$)	4,1 (2,7–6,2)

Влияние курения и возраста на формирование иммунологических фенотипов у женщин в постменопаузе

Распределение женщин в сравниваемых группах по курению и возрасту представлено в **таблице 2**. Выяснилось, что доля курящих женщин

среди здоровых (11,2%) соответствовала таковой среди больных РМЖ (8,2%, $p>0,05$). В то же время женщин старше 59 лет (cut-off) среди больных РМЖ было больше (62,9%), чем среди здоровых (33,0%, $p<0,0001$). Частота встречаемости каждой из четырех выделенных выше индивидуаль-

ных комбинаций соотношений исследуемых АТ не различалась значимо ($p > 0,05$) между курящими и некурящими женщинами (таб. 3).

Распределение выделенных комбинаций исследуемых АТ по четырем возрастным подгруппам оказалось равновесным ($p > 0,05$), как у здоровых женщин, так и у больных РМЖ (таб. 4).

Расчет рисков РМЖ у женщин моложе и старше 59 лет показал следующее (табл. 5). Минимальные значения OR (0,4–0,2) выявлены при высоких уровнях IgA-Pg, превышающих уровни и IgA-Bp, и IgA-Es (позиции 1.1 и 2.1). Максимальные значения OR (2,8–4,1) – при высоких уровнях IgA-Bp и IgA-Es, превышающих уровни IgA-Pg (позиции 1.4 и 2.4). С учетом 95% CI по указанным значениям OR риски РМЖ были одинаковыми у женщин моложе и старше 59 лет.

По промежуточным позициям различий между сравниваемыми группами не было.

Влияние сывороточных IgA-Bp на образование IgA-Es и IgA-Pg у женщин в постменопаузе

Исследовали зависимость образования IgA-Es и IgA-Pg от содержания IgA-Bp в сыворотке

крови женщин в постменопаузе с различным иммунологическим фенотипом (таб. 6).

Искомые взаимосвязи с высокими коэффициентами корреляции ($r_s = 0,77–0,95$) были выявлены у здоровых женщин и больных РМЖ при любом иммунологическом фенотипе. Однако, возрастание уровней IgA-Es и IgA-Pg при возрастании уровней IgA-Bp было выражено сильнее при протективном фенотипе и компенсаторном второго типа, чем при проканцерогенном фенотипе и при компенсаторном первого типа, о чем свидетельствуют коэффициенты a в уравнениях линейной регрессии.

Очевидно, что применение антиканцерогенных вакцин показано прежде всего у женщин с проканцерогенным иммунологическим фенотипом, ассоциированным с максимальным риском РМЖ. Влияние IgA-Bp на уровни IgA-Es и IgA-Pg у них значительно меньше, чем у женщин с протективным иммунофенотипом и минимальным риском РМЖ, как это видно по уравнениям линейной регрессии. Однако возрастание уровней IgA-Es при возрастании уровней IgA-Bp оказалось более выраженным (ко-

Таблица 6. Зависимость уровней IgA-Es и IgA-Pg от уровней IgA-Bp при различных иммунологических фенотипах у здоровых женщин и больных раком молочной железы (РМЖ) в постменопаузе

Иммунологический фенотип	x	y	Больные РМЖ N=1284		Здоровые женщины N=400	
			r_s (p)	$y = a \cdot x + b$	r_s	$y = a \cdot x + b$
1. Протективный						
IgA-Bp/IgA-Pg $\leq 1,0$	IgA-Bp	IgA-Es	0,86 ($<0,0001$)	$y = 0,93x + 0,22$	0,83 ($<0,0001$)	$y = 1,05x + 0,33$
IgA-Es/IgA-Pg $\leq 1,0$	IgA-Bp	IgA-Pg	0,84 ($<0,0001$)	$y = 1,58x + 0,46$	0,77 ($<0,0001$)	$y = 1,40x + 1,15$
2. Компенсаторный первого типа						
IgA-Bp/IgA-Pg $> 1,0$	IgA-Bp	IgA-Es	0,86 ($<0,0001$)	$y = 0,29x + 0,94$	0,80 ($<0,0001$)	$y = 0,22x + 1,0$
IgA-Es/IgA-Pg $\leq 1,0$	IgA-Bp	IgA-Pg	0,92 ($<0,0001$)	$y = 0,41x + 1,09$	0,88 ($<0,0001$)	$y = 0,28x + 1,33$
3. Компенсаторный второго типа						
IgA-Bp/IgA-Pg $\leq 1,0$	IgA-Bp	IgA-Es	0,90 ($<0,0001$)	$y = 1,39x + 0,64$	0,89 ($<0,0001$)	$y = 1,91x + 0,02$
IgA-Es/IgA-Pg $> 1,0$	IgA-Bp	IgA-Pg	0,95 ($<0,0001$)	$y = 1,12x + 0,31$	0,90 ($<0,0001$)	$y = 1,31x + 0,32$
4. Проканцерогенный						
IgA-Bp/IgA-Pg $> 1,0$	IgA-Bp	IgA-Es	0,78 ($<0,0001$)	$y = 0,71x + 0,86$	0,83 ($<0,0001$)	$y = 0,73x + 0,91$
IgA-Es/IgA-Pg $> 1,0$	IgA-Bp	IgA-Pg	0,77 ($<0,0001$)	$y = 0,45x + 0,34$	0,84 ($<0,0001$)	$y = 0,44x + 0,54$

эффицент $a=0,73$), чем возрастание уровней IgA-Pg ($a=0,44$) у здоровых, $a=0,71$ и $a=0,45$, соответственно у больных РМЖ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые введено понятие иммунологического фенотипа в отношении химического канцерогенеза у человека. Выделено 4 основных иммунологических фенотипа:

– протективный, ассоциированный с минимальным канцерогенным риском, при котором взаимно усиливающее действие АТ к Vp и к Es, стимулирующее канцерогенез (иммунологическая интерференция), полностью сбалансировано действием АТ к Pg, угнетающим канцерогенез;

– компенсаторные I и II типов, при которых стимулирующие эффекты АТ к Vp или к Es, частично сбалансированы угнетающим действием АТ к Pg;

– проканцерогенный, ассоциированный с высоким канцерогенным риском, при котором имеет место дисбаланс между выраженным совместным стимулирующим действием АТ к Vp и к Es и слабым угнетающим действием к Pg.

Настоящие результаты подтверждают полученные ранее на меньших по количеству выборках (без учета факторов курения и возраста) [17].

Установлено, что формирование индивидуального иммунологического фенотипа не зависит (или слабо зависит) от интенсивности внешнего канцерогенного воздействия (курения) и от возраста и, очевидно, детерминировано персональным генотипом, определяющим образование АТ, специфичных к низкомолекулярным ксено- и эндобактериям, участвующим в химическом канцерогенезе.

Полученный результат соответствует известным данным об отсутствии влияния курения на содержание ДНК-аддуктов с полициклическими ароматическими углеводородами в нормальной и малигнизированной ткани молочной железы и периферических лейкоцитах [3, 4]. Очевидно, индивидуальный фенотип – это конституционная генетически детерминированная характеристика организма, определяющая баланс между АТ с протективными и проканцерогенными функциями.

Основным свойством вакцин для иммунопрофилактики рака по мнению большинства исследователей [13, 14, 15] должна быть способность индуцировать синтез секреторных, но не сывороточных АТ против химических канцерогенов окружающей среды. В то же время у 37%

здоровых женщин выявлен повышенный уровень IgA-Vp в сыворотке крови, у 41,7% уровень IgA-Vp превышал таковой IgA-Pg (таб. 1). Кроме того, превышение уровней IgA-Vp и IgA-Es над IgA-Pg ассоциировано с высоким риском раком легкого у женщин в постменопаузе [17]. Данные свидетельствуют о большой вероятности стимуляции образования сывороточных IgA-Vp под действием вакцин против Vp с последующим возрастанием риска возникновения РМЖ и рака легкого.

Наряду с этим необходимо учитывать наличие прямых взаимосвязей IgA-Vp с IgA-Es и IgA-Pg [20], которые в свою очередь, оказались взаимосвязанными с содержанием Es и Pg в сыворотке крови больных РМЖ [21].

В настоящем исследовании обнаружили характерные особенности взаимосвязей IgA-Es и IgA-Pg с IgA-Vp при различных иммунологических фенотипах. В частности, при проканцерогенном фенотипе возрастание уровней IgA-Es с повышением IgA-Vp более выражено, чем возрастание IgA-Pg.

Содержание иммунологического фенотипа будет дополняться с учетом участия в его формировании соответствующих антиидиотипических АТ, выявленных ранее у здоровых людей и больных раком [22].

Исследование иммунологических фенотипов целесообразно учитывать в разработке перспективных средств активной иммунопрофилактики рака, в первую очередь, для предупреждения возможных негативных последствий применения антиканцерогенных вакцин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2015 (заболеваемость и смертность) Под ред. Каприна А. Д., Старинского В. В., Петровой Г. В. М: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017, 250. [Malignant neoplasms in Russia in 2015 (morbidity and mortality). Kaprin A. D., Starinsky V. V., Petrova G. V. (eds.), M: Moscow oncology institute of Herzen FMRC MHRF, 2017, 250.]
2. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017, 67(1), 7–30. doi: 10.3322/caac.21387
3. Rundle A., Tang D., Hibshoosh H., Estabrook A., Schnabel F., Cao W., Grumet S., Perera F. P. The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. Carcinogenesis 2000, 21(7), 1281–1289. doi: 10.1093/carcin/21.5.281
4. Gammon M. D., Sagiv S. K., Eng S. M., Shantakumar S., Gaudet M. M., Teitelbaum S. L., Britton J. A.,

- Terry M. B., Wang L. W., Wang Q., Stellman S. D., Beyea J., Haich M., Kabat G. C., Wolff M. S., Levin B., Neugut A. I., Santella R. M. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and breast cancer: a pooled analysis. *Arch. Environ. Health*. 2004, 59(12), 640–649. doi: 10.1080/00039890409602948
5. Pruthi S., Yang L., Sandhu N. P., Ingle J. N., Beseler C. L., Suman V. J., Cavalieri E. L., Rogan E. G. Evaluation of serum estrogen-DNA adducts as potential biomarkers for breast cancer risk. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2012, 132(1–2), 73–79. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.02.002
 6. Cavalieri E. L., Rogan E. G. Depurinating estrogen-DNA adducts, generators of cancer initiation: their minimization leads to cancer prevention. *Clinical and Translational Medicine* 2016, 5(12). doi: 10.1186/s40169-016-0088-3
 7. Grova N., Prodhomme E. J., Schellenberger M. T., Farinelle S., Muller C. P. Modulation of carcinogen bioavailability by immunisation with benzo[a]pyrene – conjugate vaccines. *Vaccine* 2009, 27(31), 4142–4151. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.052
 8. Peck R. M., Peck E. B. Inhibition of chemically induced neoplasia by immunization with an antigenic carcinogen-protein conjugate. *Cancer Res.* 1971, 31, 1550–1554.
 9. Černohorská H., Klimešová S., Lepša L., Jinoch P., Milcová A., Schmuzerová J., Topinka J., Lábaj J. Influence of immunization with non-genotoxic PAH-KLH conjugates on the resistance of organisms exposed to benzo[a]pyrene. *Mut. Res.* 2012, 742(1–2), 2–10. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.10.016
 10. Hillier S. G., Groom G. V., Boyns A. R., Cameron E. H. Effects of active immunisation against steroids upon circulating hormone concentrations. *J. Steroid Biochem.* 1975, 6(3–4), 529–535. doi: 10.1016/0022-4731(75)90183-1
 11. Caldwell B. V., Tillson S. A., Esber H., Thorncroft I. H. Survival of tumors after immunization against oestrogens. *Nature* 1971, 231(5298), 118–119. doi: 10.1038/231118a0
 12. Schwartz U., Dyrenfurth I., Khalaf S., Vande Wiele R. L., Ferin M. A comparison of the effects of active immunization of female rhesus monkeys to estradiol-17 or progesterone-20-protein conjugates. *J. Steroid Biochem.* 1975, 6(3–4), 541–545. doi: 10.1016/0022-4731(75)90185-5
 13. Silbart L. K., Rasmussen H. V., Oliver A. R. Immunoprophylactic intervention in chemical toxicity and carcinogenicity. *Vet. Hum. Toxicol.* 1997, 39(1), 37–43.
 14. De Buck S. S., Muller C. P. Immunopropylactic approaches against chemical carcinogenesis. *Vaccine* 2005, 23(17–18), 2403–2406. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.01.020
 15. Schellenberger M. T., Farinelle S., Willième S., Muller C. P. Evaluation of adjuvants for a candidate conjugate vaccine against benzo[a]pyrene. *Hum. Vaccin.* 2011, 7(1), 166–173.
 16. Glushkov A., Polenok E., Kostyanko M., Antonov A., Verzhbitskaya N., Vafin I., Ragozhina S. Postmenopausal breast cancer risk in relation to antibodies specific to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone. *Iran J. Cancer Prev.* 2016, 9(2), e4212. doi: 10.17795/ijcp-4212
 17. Глушков А. Н., Поленок Е. Г., Гордеева Л. А., Мун С. А., Костянко М. В., Антонов А. В., Титов В. А., Вержбицкая Н. Е., Вафин И. А. Иммунологический дисбаланс при раке молочной железы и раке легкого у женщин в постменопаузе. *Медицинская иммунология* 2018, 20(6), 139–146. doi: 10.17795/ijcp-4212 [Glushkov A. N., Polenok E. G., Gordeeva L. A., Mun S. A., Kostyanko M. V., Antonov A. V., Titov V. A., Verzhbitskaya N. E., Vafin I. A. Immunological disbalance in breast cancer and lung cancer in postmenopausal women. *Medical immunology* 2018, 20(6), 139–146. doi: 10.17795/ijcp-4212]
 18. Glushkov A. N., Kostjanko M. V., Chernov S. V., Vasilchenko I. L. Synthesis of polycyclic aromatic hydrocarbon-protein conjugates for preparation and immunoassay of antibodies. *Russ J Immunol.* 2002, 7(1), 42–6.
 19. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J. Intern. Med.* 2013, 4(2), 627–635.
 20. Глушков А. Н., Поленок Е. Г., Костянко М. В., Антонов А. В., Вержбицкая Н. Е., Вафин И. А., Рагожина С. Е. Влияние антител к эстрадиолу и прогестерону на содержание этих гормонов в сыворотке крови у здоровых женщин и больных раком молочной железы. *Российский иммунологический журнал* 2017, 11(20), 1, 26–34. [Glushkov A. N., Polenok E. G., Kostyanko M. V., Antonov A. V., Verzhbitskaya N. E., Vafin I. A., Ragozhina S. E. Effect of antibodies to estradiol and progesterone on the concentrations these hormones in serum of healthy women and breast cancer patients. *Rus. J. Immunol.* 2017. 11(20), 1, 26–34.]
 21. Глушков А. Н., Поленок Е. Г., Костянко М. В., Рагозин А. И., Антонов А. В., Вержбицкая Н. Е. Совместное влияние антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону на содержание женских половых гормонов в сыворотке крови у больных раком молочной железы. *Российский иммунологический журнал* 2018, 12(21), 40–45. [Glushkov A. N., Polenok E. G., Kostyanko M. V., Rogozin A. I., Antonov A. V., Verzhbitskaya N. E. Combination effects of antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone onto concentrations of female sex hormones in blood serum of the breast cancer patients. *Rus. J. Immunol.* 2018. 12(21), 40–45.]
 22. Глушков А. Н., Поленок Е. Г., Костянко М. В., Антонов А. В., Вержбицкая Н. Е., Вафин И. А., Рагожина С. Е. Антитела и анти-антитела к стероидным гормонам и риск рака молочной железы. *Медицинская иммунология* 2017, 19(5), 577–584. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-577-584 [Glushkov A. N., Polenok E. G., Kostyanko M. V., Antonov A. V., Verzhbitskaya N. E., Vafin I. A., Ragozhina S. E. Antibodies and anti-antibodies to steroid hormones and breast cancer risk. *Medical immunology* 2017, 19(5), 577–584. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-577-584]

**PERSONAL IMMUNOLOGICAL PHENOTYPE AND BREAST
CANCER RISK IN POSTMENOPAUSAL WOMEN**

© 2019 A. N. Glushkov^{1*}, E. G. Polenok¹, S. A. Mun¹, L. A. Gordeeva¹,
M. V. Kostyanko², A. V. Antonov³, N. E. Verzhbitskaya³, I. A. Vafin⁴

*E-mail: ihe@list.ru

¹*Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry
SB RAS, Kemerovo, Russia;*

²*Institute of Fundamental Sciences, Kemerovo State University, Kemerovo;*

³*Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russia;*

⁴*Regional Center of Blood, Kemerovo, Russia*

Received: 16.10.2018. **Accepted:** 15.01.2019

The following immunological phenotypes were described using immunoanalysis of blood serum IgA-Bp, IgA-Es and IgA-Pg in 400 healthy women and 1284 breast cancer (BC) patients: “protective” with the minimal BC risk (OR=0.2–0.6) in which personal IgA-Pg level exceeded both IgA-Bp and IgA-Es; “procarcinogenic” with maximal BC risk (OR=2.1–6.2) in which both IgA-Bp and IgA-Es were higher than IgA-Pg; and two “compensatory” (OR=0.7–1.2) in which IgA-Pg levels exceeded IgA-Bp or IgA-Es. Existence of one or the other immunophenotype did not depend from smoking or age. The differences in correlations of IgA-Bp with IgA-Es and IgA-Pg were revealed at these immunophenotypes. The results would be helpful in the creation and clinical application of anticarcinogenic vaccines for cancer immunoprevention.

Key words: breast cancer, antibodies, benzo[a]pyrene, estradiol, progesterone

Authors:

Glushkov A. N., ✉ MD, Professor, Chief Researcher of Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia; **E-mail:** ihe@list.ru;

Polenok E. G., PhD (Candidate of Pharmacy), Leading Researcher of Immunochemistry Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia;

Mun S. A., ✉ PhD (Candidate of Medicine), Senior Researcher Fellow of Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia;

650065, Kemerovo, Leningradsky Avenue, 10, Russia, Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, phone: 8(3842) 575079; **E-mail:** stellamun@yandex.ru;

Gordeeva L. A., PhD (Candidate of Biology), Leading Researcher of Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia;

Kostyanko M. V., Leading Engineer of the Organic Chemistry Chair, Institute of Fundamental Sciences, Kemerovo State University, Kemerovo;

Antonov A. V., Deputy chief physician for surgery, Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russia;

Verzhbitskaya N. E., PhD (Candidate of Medicine), Chief of Pathoanatomy Department, Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russia;

Vafin I. A., Main Physician of Regional center of Blood, Kemerovo, Russia

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ, УСЛОВНО-ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП И УСЛОВНО- ЗДОРОВЫХ ВЗРОСЛЫХ СУБЪЕКТОВ

© 2019 г. Г. А. Чудилова^{1*}, И. В. Нестерова^{1,2}

*E-mail: chudilova2015@yandex.ru

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России»,
отдел клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ,
Краснодар, Россия;

²ФГАБОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования
и науки России, кафедра аллергологии и иммунологии, Москва, Россия

Поступила: 11.01.2019. Принята: 30.01.2019

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) с различной рецепторной оснащенностью, представляют собой гетерогенные субпопуляции отличающиеся по своим биологическим свойствам и роли в патогенезе иммунозависимых заболеваний. В результате исследований нами получены новые данные о фенотипических особенностях субпопуляций НГ, несущих молекулы CD64, CD32, CD16 и CD11b, характерных для новорожденных и детей по сравнению с группой условно-здоровых взрослых субъектов. Установлено, что в периферической крови здоровых доношенных новорожденных, условно-здоровых детей разных возрастных групп и взрослых циркулируют две основные субпопуляции НГ – мажорная с фенотипом CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и минорная CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ с разной плотностью экспрессии рецепторов. Показано, что для каждой из исследуемых групп характерен свой фенотипический профиль, возможно оптимальный, для выполнения НГ эффекторных функций. Так у новорожденных определены субпопуляции с фенотипами CD64⁻CD16^{dim}CD32^{dim}CD11b^{bright}НГ и CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{bright}CD11b^{bright}НГ; у детей 2–4 лет CD64⁻CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}НГ и CD64^{mid}CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}НГ; у детей 5–9 лет CD64⁻CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{dim}НГ и CD64^{dim}CD16^{bright}CD32^{mid}CD11b^{dim}НГ и у группы здоровых взрослых CD64⁻CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{dim}НГ и CD64^{bright}CD16^{dim}CD32^{mid}CD11b^{dim}НГ. Установлено, что НГ новорожденных и детей разных возрастных групп имеют схожую плотность экспрессии рецепторов CD64, CD16, CD32, CD11b на мажорной и минорной субпопуляциях, в то время как субпопуляции НГ здоровых взрослых оснащены по-разному. Изучение рецепторов при физиологических состояниях с учетом возрастных особенностей, необходимо для правильной интерпретации трансформации фенотипа, изменения поверхностной экспрессии при различных патологических состояниях.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, фенотип, субпопуляции

DOI: 10.31857/S102872210005021-8

Адрес: 350061, г. Краснодар, ул. Благоева, д. 14, кв. 11, Чудилова Галина Анатольевна. Тел.: 89184102214 (моб).

E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Авторы:

Чудилова Г. А., к. б. н., доцент, заведующая отделом клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России», г. Краснодар, Россия;

Нестерова И. В., д. м. н., профессор, профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФГАБОУ ВО «Российский уни-

верситет дружбы народов» Министерства образования и науки России, г. Москва, Россия; главный научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России», г. Краснодар, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Гетерогенность нейтрофильных гранулоцитов (НГ), наличие субпопуляций с широким спек-

тром фенотипов и, соответственно, с разными функциями, в настоящее время не вызывают сомнения. Регулирование функций НГ может происходить за счет факторов микроэкологической модуляции, которые влияют на фенотип и функции зрелых клеток, а также изменяют дифференцировку и / или созревание клеток [1–5].

НГ в циркулирующей крови находятся в состоянии покоя, характеризуются минимальной транскрипционной активностью и ограниченной способностью реагировать на активирующие раздражители. При воздействии праймирующих агентов НГ, обладая необычайной пластичностью, быстро подвергаются активации (синтезу цитокинов, медиаторов и ферментов, экспрессии рецепторов), которые опосредуют последующие фенотипические и функциональные изменения, необходимые для осуществления адекватного иммунного ответа. В последнее время растет интерес к исследованию поверхностных антигенов, изучению и идентификации функционально-значимых рецепторов, что имеет большое значение для углубленного анализа как гетерогенных субпопуляций НГ, так и установление их роли в патогенезе иммунозависимых заболеваний.

С этой точки зрения, огромный интерес представляют Fcγ – (CD64, CD32, CD16) и CD11b рецепторы. Активация этих рецепторов приводит к сложным процессам клеточной активации и элиминации, таким как фагоцитоз, экзоцитоз внутриклеточных гранул, продуцирование активных форм кислорода (ROS), антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), высвобождение внеклеточных ловушек НГ (NETs), а также дополнительные ответы, такие как хемотаксическая миграция или выделение хемокинов и цитокинов [6, 7]. Так, низкоаффинные CD16(FcγRIII), CD32(FcγRII) играют важную роль во взаимодействии НГ с иммунными комплексами [8]. FcγRIIb осуществляют начальный контакт и связывание иммунных комплексов *in vivo* [9], затем происходит полная активация НГ посредством синергического лигирования как FcγRIIA, так и FcγRIIb, чтобы получить полное ингибирование ответов НГ необходимо удалить или заблокировать оба рецептора [10]. Высокоаффинный рецептор CD64 (FcγRI), способен связывать IgG1, IgG3 и IgG4 в мономерной форме, на ранних стадиях гранулопоэза, а на зрелых НГ условно здоровых субъектов он представлен на очень низком уровне (~1400 рецепторов на клетку). Экспрессия на поверхности НГ индуцируется в ответ на ком-

поненты микробной стенки (LPS), компоненты комплемента и некоторые цитокины (IFNγ, TNFα, IL8, IL12), которые сопровождают развитие бактериальных инфекций [11, 12].

CD11b (рецептор комплемента 3, CR3) связывает большое количество физиологических лигандов и участвует в многочисленных функциях НГ. Функционально CD11b (в присутствии субъединицы CD18) регулирует адгезию и миграцию НГ, является рецептором для C3bi, опосредующим поглощение и фагоцитоз и воспалительный ответ. Использование CD11b-антител позволило идентифицировать CD11b в качестве рецептора для гамма-цепи фибриногена, фактора X и ICAM1, доказывая участие в клеточно-опосредованной цитотоксичности, хемотаксисе и фагоцитозе [13].

В современной научной литературе существуют разные спорные данные по количеству НГ и плотности экспрессии данных рецепторов. Кроме того, CD64 рецептор был хорошо исследован только в неонатологии, и был предложен для выявления сепсиса у недоношенных и доношенных новорожденных [14–17]. Есть данные, демонстрирующие как более высокие, так и аналогичные параметры экспрессии CD64 НГ новорожденных детей по сравнению со здоровыми взрослыми [18, 19]. Сообщалось о более высоком проценте CD64⁺НГ, но с одинаковой интенсивностью экспрессии у недоношенных новорожденных в сравнении с взрослыми [20]. Опубликованы данные об отсутствии разницы в плотности экспрессии CD64 у недоношенных, здоровых доношенных новорожденных и взрослых субъектов [21].

Аналогичные вариации сравнительных результатов у новорожденных и взрослых о более высокой, более низкой и сходной экспрессии можно найти в работах по изучению CD16 (FcγRIII), CD32 (FcγRII) и CD11b [18–22; 24]. Отмечено, что CD16 антиген может быть шеддингован с поверхности НГ в результате воспаления, при септицемии, респираторном дистресс-синдроме [22, 25]. И наоборот, чрезмерно активная манипуляция с НГ (центрифугирование, выделение на градиенте плотности, шейкерование и т.д.) может высвободить внутриклеточные пулы хранения CD16, что вызывает искусственное увеличение его поверхностной экспрессии [26]. Авторами de Hass M. и др. сообщалось о пациентах с наследственными аутоиммунными заболеваниями, на поверхностной мембране НГ которых полностью отсутствовал

CD16, что, тем не менее, не было связано с повышенным риском инфицирования [27]. Разные данные об экспрессии CD11b также могут быть связаны с тем, что этот антиген имеет обширный внутриклеточный пул хранения, который может высвобождаться на поверхность НГ при активации или чрезмерной манипуляции [28–30].

Имеются спорные литературные данные об уровнях CD64, CD16, CD32, CD11b рецепторов на НГ новорожденных и взрослых лиц. При этом полностью отсутствует научная информация об экспрессии CD64, CD16, CD32, CD11b на поверхностной мембране НГ у детей разных возрастных групп, а также о плотности их экспрессии. В связи с изложенным, изучение этой субпопуляции НГ в процессе постнатального онтогенеза у детей требует дальнейших исследований. Следует подчеркнуть, что изучение данной группы рецепторов НГ при физиологических состояниях, проводимое с учетом возрастных особенностей, необходимо для правильной интерпретации трансформации фенотипа, изменений поверхностной экспрессии рецепторов, при патологических состояниях, а также для уточнения возможностей дальнейшего перепрограммирования НГ в терапевтических целях.

Целью исследования явилось изучение субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов и их фенотипических характеристик у здоровых доношенных новорожденных, условно-здоровых детей различных возрастных групп и условно-здоровых взрослых субъектов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на образцах периферической крови, полученных у 79 человек: 22 здоровых новорожденных обоего пола (10 девочек, 12 мальчиков, в возрасте от 3–6 суток, массой тела 2880–4370 г., гестационный возраст – 38–40 недель); 10 условно-здоровых детей (2–4 лет, 5 девочек и 5 мальчиков); 17 детей (5–9 лет, 10 девочек, 7 мальчиков) и 20 условно-здоровых взрослых добровольцев обоего пола (от 19–48 лет). У всех исследуемых или их родителей (опекунов) было получено информированное согласие на участие в исследовании и забор крови согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). Были сформированы следующие группы: группа 1 – здоровые доношенные новорожденные; группа 2 – условно здоровые дети 2–4 лет;

группа 3 – условно здоровые дети 5–9 лет; группа 4 – условно-здоровые взрослые субъекты. Оценивали %НГ, одновременно экспрессирующих CD64, CD16, CD32, CD11b, интенсивность флуоресценции этих молекул (MFI) методом проточной цитометрии (CYTOMICS FC500, Beckman Coulter, США) с использованием конъюгатов МКАТ CD16-ECD, CD64-FITC, CD32-PE и CD11b-PC5 («Beckman Coulter International S. A.», Франция). Субпопуляции НГ определяли методом последовательного гейтирования. Для отображения статистически значимых различий значений MFI в субпопуляциях НГ, для каждого из изучаемых рецепторов, кроме числовых показателей, использовали условные термины отражающие интенсивность флуоресценции (bright – яркий, mid – средний, dim – низкий). Обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ «IBM SPSS Statistic 20». Для сравнения групп по количественным признакам использовали непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни и критерий Вилкоксона. При статистической обработке данных различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что у детей различных возрастных групп и условно-здоровых субъектов в периферической крови (ПК) циркулируют две основные субпопуляции НГ – мажорная CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и минорная с фенотипом CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ с разной плотностью экспрессии изучаемых рецепторов.

Так выявлено, что у группы доношенных здоровых новорожденных уровень общего количества лейкоцитов составил 12,30 (10,81; 13,71) × 10⁹/л, а относительное количество НГ 52,9 (48,3; 56,26)%. При этом 96,5 (94,85; 97,60)% НГ было представлено субпопуляцией CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ с уровнем экспрессии CD16 – 58,6 (36,23; 77,50), MFI CD32 – 6,66 (5,48; 7,40) и MFI CD11b – 20,05 (17,03; 25,00). Субпопуляция CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ встречалась в группе 1 в 1,28 (0,98; 2,50)% случаев, в норме являлась малочисленной, но хорошо оснащенной, на уровне мажорной субпопуляции, CD16, CD32, CD11b и дополнительным CD64 рецепторами. Так MFI, для CD64 составила 4,9 (3,91; 6,26), а для CD16 – 54,4 (39,08; 73,78), для CD32 – 8,91 (7,76; 9,94) и CD11b – 23,35 (20,20; 27,48). (рис. 1а).

Исследуемые образцы крови группы 2 (детей 2–4 лет) имели морфологические особенности

характерные для этого возрастного периода, когда еще не произошел второй физиологический перекрест: общее количество лейкоцитов – 7,25 (6,67; 8,25) × 10⁹/л, преобладание лимфоцитов – 50,0 (47,50; 55,00)% и сниженный уровень НГ – 41,0 (37,0; 47,0)% в ПК. При этом, относительное содержание как CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, так и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ НГ не отличалось от показателей группы 1 (p>0,05). Однако, обе субпопуляции НГ в этой группе 2, отличались более высоким уровнем плотности экспрессии CD16, особенно выраженном на CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ НГ (таб. 1; рис. 16). Так, субпопуляция CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ НГ группы 2 была в 2,26 раза интенсивней оснащена CD16 (p<0,05) и имела схожие значения MFI CD32 и MFI CD11b с показателями группы 1 (p₁>0,05; p₂>0,05). Субпопуляция

CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ НГ также отличалась достоверным повышением MFI CD16 в 1,68 раза и MFI CD64 в 1,9 раз (p₁<0,05; p₂<0,05) и тенденцией снижения MFI CD32 и MFI CD11b (p>0,05) (таб. 1, рис. 1а, б)

Показатели морфологической картины крови группы 3 (детей 5–9 лет) отражали снижение общего количества лейкоцитов до 5,5 (5,00; 6,15) × 10⁹/л и повышение количества НГ до 48,78 (44,0; 54,0)%, наблюдаемые после второго физиологического перекреста. Анализ изучаемых показателей субпопуляций НГ позволил выявить снижение количества CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ НГ в 2 раза по сравнению с показателями группы 1 новорожденных и 2,92 раза с группой 2 детей младшего возраста (p₁<0,05; p₂<0,05). Так же отмечено незначительное снижение CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ НГ до 93,3

Таблица 1. Субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов и плотность экспрессии поверхностных рецепторов CD64, CD16, CD32, CD11b у здоровых доношенных новорожденных, условно-здоровых детей разных возрастных групп и условно-здоровых взрослых субъектов

	Здоровые доношенные Новорождённые Группа 1	Здоровые дети 2–4 лет Группа 2	Здоровые дети 5–9 лет Группа 3	Здоровые взрослые Группа 4
CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ Me (Q1; Q3)				
%НГ	96,5* (94,85; 97,30)	96,01* (95,58; 97,60)	93,3* ^v (91,30; 95,20)	92,1 (91,08; 92,98)
MFI CD16	58,6 (36,23; 77,50)	132,5* [■] (117,5; 144,50)	83,7* ^v # [•] (79,0; 99,30)	71,05 (62,05; 74,13)
MFI CD32	6,66 (5,48; 7,40)	5,06* (4,34; 6,18)	6,14* (5,63; 9,88)	7,01 (6,31; 7,89)
MFI CD11b	20,05* (17,03; 25,00)	22,4 (12,18; 25,75)	17,5 (14,70; 21,0)	12,75 (10,65; 15,53)
CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ Me (Q1; Q3)				
%НГ	1,25* (0,98; 2,50)	1,75* [■] (1,40; 1,93)	0,6 ^v # (0,20; 0,70)	0,5 (0,40; 0,68)
MFI CD64	4,90* (3,91; 6,26)	9,35* [■] (9,24; 9,57)	6,1* ^v (4,34; 7,03)	12,4 (10,85; 14,63)
MFI CD16	54,4* (39,08; 73,48)	91,55* [■] (82,18; 106,48)	83,4* ^v # [•] (70,20; 99,30)	14,05 (10,08; 32,20)
MFI CD32	8,91* (7,66; 9,94)	6,51* (5,02; 8,92)	9,54 ^v (7,77; 15,40)	11,25 (10,43; 15,9)
MFI CD11b	23,35* (20,2; 27,48)	19,8 (13,40; 26,93)	13,3 (8,80; 25,50)	15,4 (12,65; 17,33)

Примечание: * – достоверность отличия показателей от значений группы 4, p<0,05; ■ – достоверность отличия показателей группы 1 от группы 2, p<0,05; # – достоверность отличия показателей группы 1 от группы 3, p<0,05; ^v – достоверность отличия показателей группы 2 от группы 3, p<0,05; • – достоверность отличия показателей группы 3 от группы 4, p<0,05.

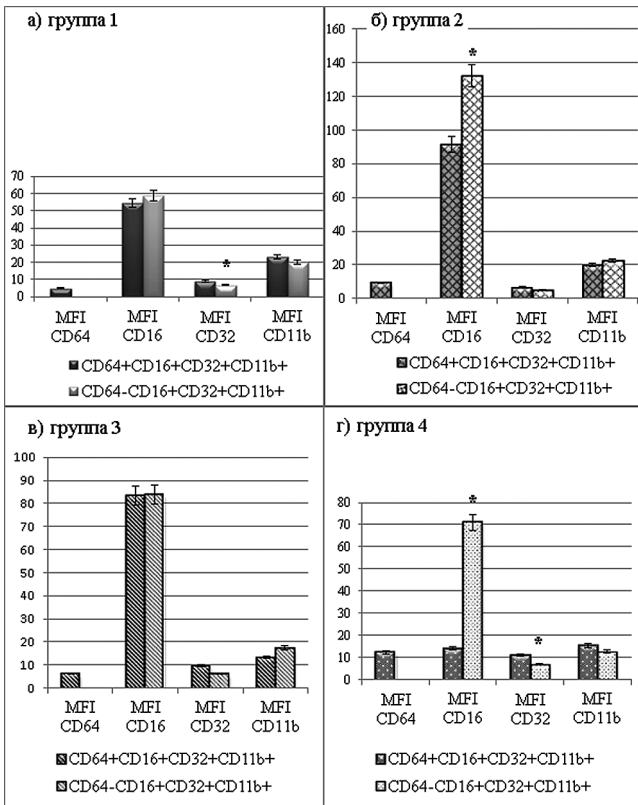


Рис 1. Плотность экспрессии CD64, CD16, CD32, CD11b рецепторов мажорной и минорной субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов у здоровых новорожденных (группа 1), условно-здоровых детей 2–4 лет (группа 2), 5–9 лет (группа 3) и условно-здоровых взрослых субъектов (группа 4).

Примечание: * $p < 0,05$;

(91,30; 95,20)% ($p > 0,05$) (таб. 1, рис. 1а, б, в). НГ мажорной и минорной субпопуляции группы 3 имели сходные значения MFI CD16, CD32, CD11b (рис. 1а, б, в; таб. 1). При этом регистрировалась более высокая MFI CD16 в обеих субпопуляциях НГ по сравнению с показателями группы 1, и напротив, более низкая в сравнении со значениями группы 2 ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$). Показатели MFI CD32 и MFI CD11b субпопуляции CD64-CD16+CD32+CD11b+ НГ сохранялись на том же уровне, что и в группе 1 и 2 (рис. 1а, б, в). Для минорной субпопуляции характерно снижение MFI CD64 и MFI CD11b как в сравнении с показателями группы 1, так и группы 2, на фоне незначительного повышения MFI CD32 (таб. 1).

При исследовании образцов крови условно-здоровых взрослых субъектов показано, что субпопуляция CD64-CD16+CD32+CD11b+ НГ представлена 92,10 (91,08; 92,98)% НГ, а CD64+CD16+CD32+CD11b+ НГ составляют лишь 0,5 (0,40; 0,68)%. В отличие от исследуемых групп детей

субпопуляции НГ в группе 4 были по-разному оснащены изучаемыми рецепторами (рис. 1г). Так, выявлено, что CD64-CD16+CD32+CD11b+ НГ в 5 раз интенсивней экспрессирует CD16 ($p < 0,05$) в 1,6 раз ниже CD32 ($p < 0,05$) по сравнению с субпопуляцией CD64+CD16+CD32+CD11b+ НГ, при одинаковом уровне CD11b ($p > 0,05$). CD64+CD16+CD32+CD11b+ НГ здоровых взрослых имеют наиболее высокий MFI CD64 – 12,4 (10,85; 14,63), самый низкий MFI CD16 – 14,05 (10,08; 32,2) в сравнении с показателями других групп (рис. 1г).

Установлено, что уровень экспрессии CD16 рецепторов НГ с фенотипом CD64-CD16+CD32+CD11b+ здоровых взрослых составил 71,05 (62,05; 74,13), но достоверно не отличался от показателей доношенных новорожденных, был ниже в 1,2 раза значений группы 3 (детей 5–9 лет) и в 2 раза группы 2 (дети 2–4 года) ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$). Уровень экспрессии CD11b на НГ мажорной субпопуляции достоверно не отличался от показателей группы 3 и был в 1,6 раз ниже

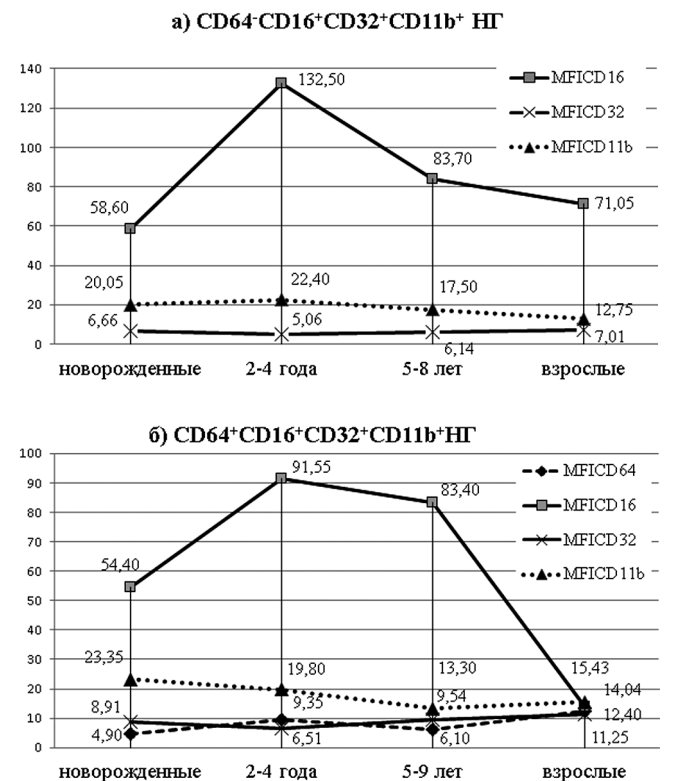


Рис 2. Динамика изменения уровня экспрессии рецепторов субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64-CD16+CD32+CD11b+ (а) и CD64+CD16+CD32+CD11b+ (б) в исследуемых группах здоровых доношенных новорожденных, условно-здоровых детей и условно-здоровых взрослых субъектов.

MFI CD11b группы 1 и в 1,8 раз ниже значений регистрируемых в группе 2 ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$) (рис. 2а).

Выявлено, что MFI CD16 рецепторов НГ субпопуляции с фенотипом CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ здоровых взрослых был в 3,9 раза ниже значений в группе 1, и в 6 раз ниже в группах 2 и 3. ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$; $p_3 < 0,05$) (рис. 2б). Уровень экспрессии CD11b на НГ минорной субпопуляции не отличался от показателей группы 3 и группы 2 и был в 1,5 раз ниже значений MFI CD11b группы 1. При этом, уровень оснащения CD64 в исследуемой группе 1 был в 2,5 раза ниже, в группе 2 — в 1,3 раза, в группе 3 в 3 раза ниже по сравнению с параметрами НГ взрослой группы. (таб. 1; рис. 2б).

Таким образом, сравнительный анализ уровня экспрессии рецепторов субпопуляций НГ с фенотипом CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, и особенно CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ, в изучаемых группах новорожденных детей, детей разных возрастных групп и здоровых взрослых демонстрирует разную оснащенность CD16 и CD11b рецепторами и более стабильный уровень экспрессии CD32 (рис. 2б).

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам сравнительного анализа выявлено, что обе субпопуляции НГ (мажорная и минорная) в исследуемых группах имеют фенотипические особенности, что объясняется состоянием иммунной системы характерной для каждого изучаемого периода, преобладающими или наиболее оптимальными эффекторными механизмами НГ в каждый возрастной период. Используя для визуализации различий плотности экспрессии рецепторов термины, отражающие разницу значений MFI (bright — яркий, mid — средний, dim — низкий), показано, что НГ группы здоровых взрослых представлены субпопуляциями с фенотипами CD64⁻CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{dim}НГ и CD64^{bright}CD16^{dim}CD32^{mid}CD11b^{dim}НГ. Такое оснащение НГ обеспечивает ограниченный ответ и защищает от необоснованных воспалительных реакций и повреждения тканей. Показатели уровня экспрессии НГ мажорной субпопуляции группы детей 5–9 лет после физиологического перекреста представлена фенотипом CD64⁻CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{dim}НГ и имеет значения схожие по оснащению с субпопуляцией взрослых лиц. Минорная субпопуляция этой возрастной группы 3 имеет низкий уровень CD64 и высокий CD16 рецептор, отвечающий за цитотокси-

ческую функцию НГ и представлена фенотипом CD64^{dim}CD16^{bright}CD32^{mid}CD11b^{dim}НГ.

Для группы 1 доношенных новорожденных детей характерны фенотипы CD64⁻CD16^{dim}CD32^{dim}CD11b^{bright}НГ и CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{bright}CD11b^{bright}НГ. Вероятно, такое оснащение объясняется незрелостью иммунной системы, высоким уровнем лейкоцитов, НГ и возможностью реализации эффекторных функций путем запуска фагоцитоза через распознавание неопсонизированного патогена через TLRs, такие как TLR4 (CD284), или взаимодействие с липополисахаридом (LPS) грамотрицательных бактерий и TLR2 (CD282) с пептидогликаном, липотейхоевой кислотой грамположительных бактерий. Это, в свою очередь, может привести к регуляции CD64, повышению экспрессии его на НГ, что приводит к запуску мощного окислительного взрыва и увеличению фагоцитарного потенциала. Эффективность фагоцитоза также обеспечивают поверхностные рецепторы CR3 (CD11b / CD18), способные распознавать опсонизированные компонентами комплемента микробы.

Для группы 2 условно-здоровых детей 2–4 лет характерны фенотипы CD64⁻CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright} и CD64^{mid}CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}НГ. Показатели этой группы имеют самые высокие уровни экспрессии CD16, CD11b, отражающие, по-видимому, компенсаторную активацию и готовность НГ к осуществлению эффекторных функций на фоне значительного физиологического снижения их количества в этот возрастной период.

В результате исследования получены новые данные о субпопуляциях НГ и их количестве и фенотипических особенностях, характерных для здоровых новорожденных и детей разных возрастных групп по сравнению с группой взрослых условно-здоровых лиц.

Выявлено, что в периферической крови здоровых доношенных новорожденных и детей 2–4 содержатся одинаковые уровни мажорной (~96%) и минорной (~1,25–1,75%) субпопуляции НГ. У детей 5–9 лет, после физиологического перекреста и взрослых отмечается снижение более чем в 2 раза количества минорной и снижение мажорной субпопуляции НГ.

Показано, что для каждой из исследуемых групп характерен свой фенотипический профиль, возможно оптимальный, для выполнения НГ своих эффекторных функций (таб. 2).

Установлено, что НГ новорожденных и детей разных возрастных групп имеют схожую

Таблица 2. Фенотипические профили субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов характерных для здоровых доношенных новорожденных, условно-здоровых детей разных возрастных групп и условно-здоровых взрослых субъектов

Группы	Фенотипический профиль	
	CD64 ⁺ CD16 ⁺ CD32 ⁺ CD11b ⁺ мажорная субпопуляция	CD64 ⁺ CD16 ⁺ CD32 ⁺ CD11b ⁺ минорная субпопуляция
Здоровые доношенные новорождённые Группа 1	CD64 ⁺ D16 ^{dim} CD32 ^{dim} CD11b ^{bright}	CD64 ^{dim} CD16 ^{mid} CD32 ^{bright} CD11b ^{bright}
Здоровые дети 2–4 лет Группа 2	CD64 ⁺ D16 ^{bright} CD32 ^{dim} CD11b ^{bright}	CD64 ^{mid} CD16 ^{bright} CD32 ^{dim} CD11b ^{bright}
Здоровые дети 5–9 лет Группа 3	CD64 ⁺ CD16 ^{mid} CD32 ^{dim} CD11b ^{dim}	CD64 ^{dim} CD16 ^{bright} CD32 ^{mid} CD11b ^{dim}
Здоровые взрослые Группа 4	CD64 ⁺ CD16 ^{mid} CD32 ^{dim} CD11b ^{dim}	CD64 ^{bright} CD16 ^{dim} CD32 ^{mid} CD11b ^{dim}

плотность экспрессии рецепторов CD64, CD16, CD32, CD11b на мажорной и минорная субпопуляциях, в то время как субпопуляции НГ здоровых взрослых оснащены по-разному.

Полученные данные, в сочетании с появлением новых знаний о фенотипах НГ и их иммуномодулирующих функциях, ориентируясь на механизмы, которые регулируют эти функции, могут быть многообещающими для выявления дефектов функционирования НГ и разработке новых терапевтических подходов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Leliefeld P. H. C., Pillay J., Vrisekoop N., Heeres M., Tak T., Cox M., Rooijackers S. H. M., Kuijpers T. W., Pickkers P., Leenen L. P. H., Koenderman L. Differential antibacterial control by neutrophil subsets. *Blood Advances* 2018, 2(11), 344–1355. doi:10.1182/bloodadvances.2017015578.
2. Hong C. W. Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Netw.* 2017, 7(5), 298–306. doi.org/10.4110/in.2017.17.5.298.
3. Mortaz E., Alipoor S. D., Adcock I. M., Mumby S., Koenderman L. Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Front. Immunol.* 2018. doi.org/10.3389/fimmu.2018.02171.
4. Garley M., Jabłońska E. Heterogeneity Among Neutrophils. *Archivum Immunologiae and Therapiae Experimentalis*, 2018, 66 (1), 21–30. doi: 10.1007/s00005-017-0476-4.
5. Нестерова И. В., Колесникова Н. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Ковалева С. В., Евлевский А. А., Нгуен Т. З. Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. *Инфекция и иммунитет* 2018, 8(1), 7–18. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18. [Nesterova I. V., Kolesnikova N. V., Chudilova G. A., Lomtadidze L. V., Kovaleva S. V., Yevlevsky A. A., Nguyen T. Z. L. A new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. *Infection and immunity* 2018, 8(1), 7–18.] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18.]
6. Pincetic A., Bournazos S., DiLillo D. J., Maamary J., Wang T. T., Dahan R., Fiebiggerand B. M., Ravetch J. V. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 2014, 15, 707–716. doi:10.1038/ni.2939.
7. Bournazos S., Wang T. T., Ravetch J. V. The Role and Function of Fcγ Receptors on Myeloid Cells. *Microbiol Spectr.* 2016, 4(6), doi:10.1128/microbiolspec.MCHD-0045–2016.
8. Jakus Z., Németh T., Verbeek J. S., Mócsai A. Critical but overlapping role of FcγRIII and FcγRIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J Immunol.* 2008, 180, 618–629. doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.618.
9. Coxon A., Cullere X., Knight S., Sethi S., Wakelin M. W., Stavrakis G. FcγRIII mediates neutrophil recruitment to immune complexes. A mechanism for neutrophil accumulation in immune-mediated inflammation. *Immunity.* 2001, 14, 693–704. doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00150-9.
10. Zhou M. J., Lublin D. M., Link D. C., Brown E. J. Distinct tyrosine kinase activation and Triton X-100 insolubility upon FcγRII or FcγRIIIB ligation in human polymorphonuclear leukocytes. Implications for immune complex activation of the respiratory burst. *J Biol Chem.* 1995, 270, 13553–13560. doi: 10.1074/jbc.270.22.13553.
11. Quayle J. A., Watson F., Bucknall R. C., Edwards S. W. Neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express the high affinity immunoglobulin G receptor, Fc gamma RI (CD64): role of immune complexes and cytokines in induction of receptor expression. *Immunology.* 1997, 91(2), 266–273. doi.org/10.1046/j.1365–2567.1997.00249.x.
12. Gericke G. H., Ericson S. G., Pan L., Mills L. E., Guyre P. M., Ely P. Mature polymorphonuclear leukocytes express high-affinity receptors for IgG (Fc gamma RI) after stimulation with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *J Leukoc Biol.* 1995, 57(3), 455–61. doi.org/10.1002/jlb.57.3.455.

13. Deevi R. K., Koney-Dash M., Kissenpfennig A., Johnston J. A., Schuh K., Walter U. Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates inside-out signaling of $\beta 2$ integrins in neutrophils. *J Immunol.* 2010, 184, 6575–6584. doi.org/10.4049/jimmunol.0903910.
14. Groselj-Grenc M., Ihan A., Pavcnik-Arnol M., Kopitar A. N., Gmeiner-Stopar T., Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children. *Intensive Care Med.* 2009, 35 (11), 1950–1958. doi 10.1007/s00134-009-1637-7.
15. Tang Z., Qin D., Tao M., Lv K., Chen S., Zhu X., Li X., Chen T., Zhang M., Zhong M., Yang H., Xu Y., Mao S. Examining the utility of the CD64 index compared with other conventional indices for early diagnosis of neonatal infection. *Scientific reports.* 2018, 8(1), 9994. doi:10.1038/s41598-018-28352-7.
16. Lam H. S., Wong S. P. S., Cheung H. M., Chu W. C. W., Wong R. P. O., Chui K. M., Liu F. Y. B., Li K., Fok T. F., Ng P. C. Early diagnosis of intra-abdominal inflammation and sepsis by neutrophil CD64 expression in newborns. *Neonatology.* 2011, 99(2), 118–124. doi.org/10.1159/000311289.
17. Нестерова И. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Ковалёва С. В., Сапун О. И., Клещенко Е. И., Смерчинская Т. В. Ремоделирование фенотипа субпопуляций CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов при врожденной пневмонии у глубоко недоношенных новорожденных. *Российский иммунологический журнал.* 2014, 8, 1(17), 48–53. [Nesterova I. V., Chudilova G. A., Lomtadidze L. V., Kovaleva S. V., Sapun O. I., Kleshchenko E. I., Smerchinskaya T. V. Remodeling of the phenotype of CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ and CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ subtypes of neutrophilic granulocytes in congenital pneumonia in deeply preterm infants. *Rossiiskij immunologicheskij zhurnal = Russian journal of immunology,* 2014, 8, 1(17), 48–53.]
18. Mawas F., Wiener E., Ryan G., Soothill P. W., Rodeck C. H. The expression of IgG Fc receptors on circulating leukocytes in the fetus and new-born. *Transfus. Med.* 1994, 4, 25–33. doi.org/10.1111/j.1365–3148.1994.tb00240.x.
19. Maeda M., van Schie R. C., Yuksel B., Greenough A., Fanger M. W., Guyer P. M., Lydyard P. M. Differential expression of Fc receptors for IgG by monocytes and granulocytes from neonates and adults. *Clin. Exp. Immunol.* 1996, 103, 343–347. doi: 10.1046 / j.1365–2249.1996.d01–615.x.
20. Payne N. R., Frestedt J., Hunkeler N., Gehrz R. Cell surface expression of immunoglobulin G receptors on the polymorphonuclear leukocytes and monocytes of extremely premature infants. *Pediatr. Res.* 1993, 33, 452–457. doi: 10.1203/00006450-199305000-00007.
21. Falconer A. E., Carr R., Edwards S. W. Neutrophils from preterm neonates and adults show similar cell surface receptorexpression: analysis using a whole blood assay. *Biol. Neonate* 1995, 67, 26–33. doi.org/10.1159/000244139.
22. Smith J. B., Campbell D. E., Ludomirsky A., Polin R. A., Douglas S. D., Garty B-Z., Harris M. C. Expression of the complement receptor CR1 and CR3 and the type III FC γ receptor on neutrophil from newborn infants and from fetuses with Rh disease. *Pediatr. Res.* 1990, 28, 120–126. doi: 10.1203/00006450-199008000-00009.
23. Carr R., Davies J. M. Abnormal FCRIII expression by neutrophils from very preterm neonates. *Blood.* 1990, 76, 607–611.
24. Fjaertoft G., Håkansson L., Foucard T., Ewald U., Venge P. CD64 (Fc γ receptor I) cell surface expression on maturing neutrophils from preterm and term newborn infants. *Acta Paediatr.* 2005, 94(3), 295–302.
25. Kabutomori O., Iwatani Y., Koh T., Yanagihara T. CD16 antigen density on neutrophils in chronic myeloproliferative disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* 1997, 107, 661–664. doi.org/10.1093/ajcp/107.6.661.
26. Qian W., Huang G. Z. Neutrophil CD64 as a marker of bacterial infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Immunol. Invest.* 2016, 45(6), 490–503. doi: 10.1080/08820139.2016.1177540
27. de Hass M., Kleijer M., van Zwielen R., Roos D., von dem Borne A. E. Neutrophil Fc γ RIIIb deficiency, nature, and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families. *Blood* 1995, 86, 2403–2413.
28. Rebeck N., Gibson A., Finn A. Neutrophil adhesion molecules in term and premature infants: normal or enhanced leukocyte integrins but defective L-selectin expression and shedding. *Clin. Exp. Immunol.* 1995, 101, 183–189. PMC1553291.
29. Reddy R. K., Xia Y., Hanikyrova M., Ross G. D. A mixed population of immature and mature leukocytes in umbilical cord blood results in a reduced expression and function of CR3 (CD11b/CD18). *Clin. Exp. Immunol.* 1998, 114, 462–467. doi: 10.1046/j.1365–2249.1998.00743.x.
30. Falconer A. E., Carr R., Edwards S. W. Neutrophils from preterm neonates and adults show similar cell surface receptor expression: analysis using a whole blood assay. *Biol. Neonate.* 1995, 67, 26–33. doi: 10.1159/000244139.

**PHENOTYPIC PROFILE SUBSET CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺,
CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ NEUTROPHIL GRANULOCYTES IN HEALTHY
NEWBORNS, CONDITIONALLY HEALTHY CHILDREN OF DIFFERENT AGE
GROUPS AND CONDITIONALLY HEALTHY ADULT INDIVIDUALS**

© 2019 G. A. Chudilova^{1*}, I. V. Nesterova^{1,2}

*E-mail: chudilova2015@yandex.ru

¹Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Kuban State Medical University» of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia;

²Department of Allergology and Immunology of Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education “Peoples’ Friendship University of Russia” of Ministry of Education and Science of Russia, Moscow, Russia

Received: 11.01.2019. **Accepted:** 30.01.2019

Neutrophilic granulocytes (NG) with different receptor equipment are heterogeneous subpopulations that have differences in their biological properties and role in the pathogenesis of immune diseases. In result of research we obtained new data on the phenotypic features of NG subpopulations carrying the CD64, CD32, CD16 and CD11b molecules in newborns and children compared to the group of adult healthy individuals. It has been established that in the peripheral blood of healthy full-term newborns, conditionally healthy children of different age and conditionally healthy adults there are two main subpopulations of circulate NG – major with CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ phenotype and minor CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ phenotype, different receptor expression density noted in both subpopulations. It was shown that each of the studied groups has its own phenotypic profile, possibly optimal for performing NG effector functions. In newborns are identified phenotypes CD16^{dim}CD32^{dim}CD11b^{bright}NG and CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{bright}CD11b^{bright}NG, in children 2–4 years old CD64⁻CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}NG and CD64^{mid}CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}NG, in children 5–9 years old CD64⁻CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{dim}NG and CD64^{dim}CD16^{bright}CD32^{mid}CD11b^{dim}NG, in conditionally healthy adults CD64⁻CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{dim}NG and CD64^{bright}CD16^{dim}CD32^{mid}CD11b^{dim}NG. Study shown that the NG of newborns and children of different age groups have a similar expression density of the CD64, CD16, CD32, CD11b receptors in major and minor subpopulations, NG subpopulations of healthy adults are equipped differently. The study of receptors in physiological according to age-related features is necessary for the correct interpretation of the transformation of the phenotype, changes in surface receptors expression in various pathological conditions.

Key words: neutrophilic granulocytes, phenotype, subset

Authors:

Chudilova G. A., ✉ PhD (Biological Sciences), Associate Professor, Head of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Kuban State Medical University» of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia; 350061, Krasnodar, Blagoeva, 14–11, Phone 8–9184102214(mob.), **E-mail:** chudilova2015@yandex.ru;

Nesterova I. V., Doctor of Medical Sciences (DM), Professor, Professor of the Department of Allergology and Immunology of Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education “Peoples’ Friendship University of Russia” of Ministry of Education and Science of Russia, Moscow, Russia; Chief Researcher of Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of Central Research Laboratory of Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Kuban State Medical University» of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИСКА ВОЗНИКНОВЕНИЯ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ АОРТОКОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА

© 2019 г. Е. В. Маркелова¹, Е. В. Шкорик^{1*}, А. А. Силаев²,
О. Л. Жданова³

*E-mail: shkorikev@mail.ru

¹ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Владивосток, Россия;

²ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иркутск, Россия;

³ФГБУН Институт автоматизации и процессов управления ДВО РАН, Владивосток, Россия

Поступила: 02.07.2018. Принята: 28.08.2018

Ишемическая болезнь сердца продолжает оставаться наиболее частой причиной смертности, инвалидности и экономических потерь в современном индустриальном обществе. В настоящее время прослеживается острая необходимость применения информационных технологий в оценке биохимических процессов, протекающих в организме при атеросклеротическом поражении артерий у пациентов с ишемической болезнью сердца и в результате возникновения тромбоэмболических осложнений различной локализации (сердце, мозг, легкие) усовершенствования дифференциальной диагностики. Обследовано 97 больных обоего пола с ИБС до и после реваскуляризации миокарда методом АКШ, в возрасте от 45 до 74 лет. Группу контроля составили 30 здоровых добровольцев, сопоставимых по возрасту и полу. Забор крови осуществлялся за сутки до операции, в 1-е, 3-и, 7-е и 12-е сутки после коронарного шунтирования. Выполнен кластерный анализ по трем выявленным показателям (TNF- α , ММП-1 и IL-10). Кластерный анализ подтвердил, что именно в группе с ТЭО выявлены наиболее статистически значимые изменения уровня TNF- α , IL-10 и ММП-1. Следовательно, увеличение TNF- α в 9–10 раз и более (от 24 пг/мл) в предоперационном периоде, IL-10 выше 65 пг/мл до операции и от 320 пг/мл в 1-е сутки после операции и увеличение ММП-1 в 3 раза (от 3,3 нг/мл) до и после АКШ следует считать дополнительными ранними маркерами риска возникновения тромбоэмболических осложнений после аортокоронарного шунтирования.

Ключевые слова: цитокины, металлопротеиназа, реваскуляризация миокарда, тромбоз

DOI: 10.31857/S102872210005022-9

Адрес: 690002, Владивосток, проспект Острякова 2, Шкорик Елена Валерьевна. Тел.: + 79502928940 (моб.).

E-mail: shkorikev@mail.ru

Авторы:

Маркелова Е. В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной и патологической физиологии, ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Владивосток, Россия;

Шкорик Е. В., аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии, ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Владивосток, Россия;

Силаев А. А., д.м.н., ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Иркутск, Россия;

Жданова О. Л., д.ф.-м.н., научный сотрудник, ФГБУН Институт автоматизации и процессов управления ДВО РАН, Владивосток, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Повышение в крови больных с сердечной недостаточностью содержания провоспалительных цитокинов подтверждает теорию существования системного воспалительного ответа у этой категории больных [1]. Тем не менее, когда тело обнаруживает атаки, такие как – травмы, инфекции, опухоли или хирургические вмешательства, уровни этих цитокинов значительно варьируются [2]. Чрезмерная продукция и секреция провоспалительных цитокинов, индуцирует неконтролируемую цепную реакцию, дальнейшее увеличение их уровня и составляют «вторую атаку» на организм [3]. То есть, после того, как сти-

мулируется производство цитокина, это может вызвать индукцию других цитокинов в больших количествах, стимулируя биохимический каскад. Тромботический каскад является одним из примеров такого биохимического каскада [4].

Ишемическая болезнь сердца продолжает оставаться наиболее частой причиной смертности, инвалидности и экономических потерь в современном индустриальном обществе [5]. Аортокоронарное шунтирование является одним из самых распространенных хирургических вмешательств на сердце, реально снижающим смертность отдельной категории больных и улучшающих качество жизни пациентов, страдающих ИБС. Однако частота осложнений в послеоперационном периоде остается достаточно высокой [6].

Данная работа посвящена определению иммунологических критериев достоверного риска возникновения тромбоэмболических осложнений (ТЭО) у пациентов с ишемической болезнью сердца после выполнения аортокоронарного шунтирования (АКШ) методом кластерного анализа. Кластерный анализ (англ. Cluster – гроздь, скопление) – разбиение множества исследуемых объектов и признаков на однородные группы или кластеры. Из всех методов самыми распространенными являются иерархические агломеративные методы и преимуществом этих методов является визуальное представление результатов кластеризации в виде древовидной системы – дендрограммы. Дендрограмма (dendrogram) – древовидная диаграмма, содержащая n уровней, каждый из которых соответствует одному из шагов последовательного укрупнения кластеров.

В настоящее время прослеживается острая необходимость применения информационных технологий в оценке биохимических процессов, протекающих в организме при атеросклеротическом поражении артерий у пациентов с ишемической болезнью сердца и в результате возникновения тромбоэмболических осложнений различной локализации (сердце, мозг, легкие) усовершенствования дифференциальной диагностики.

В отличие от комбинационных группировок, кластерный анализ приводит к разбиению на группы с учетом всех группировочных признаков одновременно. При этом, как правило, не указаны четкие границы каждой группы, а также неизвестно заранее, сколько же групп целесообразно выделить в исследуемой совокупности.

Цель исследования: подтвердить риск возникновения тромбоэмболических осложнений по трем выявленным показателям у пациентов с ИБС после АКШ с помощью кластерного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 97 больных обоего пола с ИБС до и после реваскуляризации миокарда методом АКШ, в возрасте от 45 до 74 лет. Пациенты были разделены на три группы:

I группа – 25 больных с зарегистрированными ТЭО после АКШ (острый инфаркт миокарда, ишемический инсульт, тромбоэмболия легочных ветвей);

II группа – 26 пациентов с кровотечением по дренажам более 9 мл/кг за ближайшие 12 часов раннего послеоперационного периода;

III группа – 46 больных с ИБС без осложнений после реваскуляризации миокарда.

Группу контроля составили 30 здоровых добровольцев, сопоставимых по возрасту и полу. Забор крови осуществлялся за сутки до операции, в 1-е, 3-и, 7-е и 12-е сутки после АКШ. Сыворотку крови получали после центрифугирования в течение 10 минут при 1500 об/мин, образцы разливали по 1,0 мл и хранили при -36°C . Определение уровня TNF- α , IL-10 и ММП-1 проводилось в сыворотке крови методом твердофазного ИФА, с использованием специфических реактивов «R&D Diagnostics Inc.», USA. Результаты выражали в пг/мл и нг/мл. Данные представляли в виде медианы и двух квартилей (Me , Q_{25} , Q_{75}). Внутри и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна-Уитни, χ^2 критерия в рамках прикладной программы SPSS № 16. Статистически достоверным считали различия между показателями при отклонении нулевой гипотезы и уровне значимости $p < 0,05$. Для исследования значимости изменений выбранных параметров и выбора оптимального значения для прогнозирования развития осложнений у больных с ИБС после АКШ, вычисляли площадь, ограниченную ROC-кривой и осью доли ложных положительных классификаций (AUC) при помощи программы Graph Pad Prism Software Inc., США. С целью распределения исследуемых показателей на однородные группы, применялся метод кластерного анализа. Для анализа использовалась древовидная кластеризация и метод k -средних (R, «Statistica 10»). Качество кластеризации оценивалось методами дисперсионного анализа (R, «Statistica 10»). Объем вы-

полненных исследований позволял оценить результаты с достоверностью 95–99% при использовании соответствующих статистических методов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При характеристике про- и противовоспалительных цитокинов, металлопротеиназ и ТИМП-1 у пациентов с ИБС до и после АКШ были установлены общие закономерности и различия в зависимости от течения послеоперационного периода. Уровень провоспалительных цитокинов во всех четырех исследуемых группах был повышен по сравнению со здоровыми людьми на протяжении всего мониторинга. При этом, уровень TNF- α в III группе был увеличен в 3–4 раза, тогда как, в I и II группах – в 9–12 раз.

В I группе (с тромбоемболическими осложнениями) значение TNF- α было статистически выше уже в дооперационном периоде по сравнению с его уровнем до АКШ во II и III группах, в 1-е сутки после операции снижалось до трехкратного увеличения, на 3-и сутки его уровень снова повышался (в 10 раз, $p < 0,01$), на 7-е сутки отмечалось снижение TNF- α , но сохранялось повышенным в 9 раз на 12-е сутки по сравнению с здоровыми людьми (табл. 1).

Установлена достоверная связь повышенного уровня TNF- α (от 24 пг/мл в предоперационном периоде) и риском возникновения тромбоемболических осложнений после АКШ ($\chi^2 = 4,28$, $p < 0,05$; AUC = 0,91).

То есть, повышенное значение (24 пг/мл и выше до операции) TNF- α может являться ранним диагностическим признаком риска возникновения ТЭО у пациентов после АКШ, что подтверждает мнения авторов о его возможном участии в возникновении ССО у пациентов [7, 8].

В I группе (с тромбоемболическими осложнениями) уровень IL-10 до реваскуляризации был статистически выше (табл. 2), чем во II и III группах ($p < 0,05$). В 1-е сутки зарегистрирована его гиперпродукция (в 17 раз – по сравнению с группой контроля, в 5 раз – по сравнению с III группой и вдвое – по сравнению с его содержанием во II группе, $p < 0,05–0,01$), далее – на 3-и сутки его уровень сохранялся повышенным в 2 раза в сравнении со здоровыми людьми. На 7-е и 12-е сутки после операции концентрация IL-10 во всех исследуемых группах не отличалась от референсного показателя, и его значение на 12-е сутки во II, III и IV группах достигало предоперационного содержания, за исключением I группы (с тромбоемболическими осложнениями), где IL-10 на 12-е сутки был в 2,5 раза ниже по сравнению с предоперационным уровнем ($p < 0,05$), но не отличался от референсного показателя.

То есть исходный уровень IL-10 во II и III группах был практически идентичным, а в I группе (с ТЭО в послеоперационном периоде) его значение до АКШ было увеличено в 3 и более раз по сравнению с другими исследуемыми группами (табл. 2).

Таблица 1. Содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови пациентов с ИБС до и после АКШ

Показатели (Me; Q ₂₅ ; Q ₇₅)	I группа (n=25)	II группа (n=26)	III группа (n=46)	Группа контроля (n= 30)
TNF- α (пг/мл) до АКШ	24,4*** ^o (22,4;89,25) $p_1 < 0,05$	9,5* (9,1; 32,13)	9,46* (4,86;10,98)	
1-е сутки после АКШ	9,36* (2,25; 20,7)	37,6***##+ (13,4; 92,8) $p_{1,5,6} < 0,05$	10,8* (7,3; 24,5)	
3-и сутки после АКШ	28,7** (17,5; 52,7) $p_5 < 0,05$	17,85** (14,6; 35,1)	17,4** (12,4; 53,6)	2,8 (0,8; 10,9)
7-е сутки	11,7* (9,0; 46,8)	20,17** (15,4; 52,3) $p_3 < 0,05$	21,57** (11,1; 51,7) $p_3 < 0,05$	
12-е сутки	26,8** (21,6; 46,5) $p_7 < 0,05$	23,0** (17,5; 38,5) $p_4 < 0,05$	16,02** (9,45; 29,7)	

Примечания:

1. Статистическая достоверность различий показателей с группой контроля (здесь и далее): $p < 0,05$ – *; $p < 0,01$ – **; $p < 0,001$ – ***.
2. Статистическая достоверность различий показателей в динамике: p_1 (до АКШ – 1-е сутки); p_2 (до АКШ – 3-и сутки); p_3 (до АКШ – 7-е сутки); p_4 (до АКШ – 12-е сутки); p_5 (1–3-и сутки); p_6 (1–7-е сутки); p_7 (1–12-е сутки).
3. Статистическая достоверность различий показателей между I и II группами: $p < 0,05$ – #; между I и III группами: $p < 0,05$ – °; между II и III группами: $p < 0,05$ – +.

Выявлена достоверная связь между высоким уровнем IL-10 (≥ 65 пг/мл в дооперационном периоде и ≥ 320 пг/мл в 1-е сутки после операции) и риском возникновения тромбоэмболии у пациентов с ИБС после АКШ ($\chi^2 = 3,97$, $p < 0,05$; AUC=0,829), что позволяет говорить о высокой прогностической ценности диагностического признака у пациентов с ИБС для раннего определения риска возникновения ТЭО после АКШ.

По данным литературы, максимальное увеличение концентрации IL-10 в 1-е сутки после АКШ ($p < 0,05$) свидетельствует о развитии иммуносупрессии в раннем послеоперационном периоде [9, 10] и может являться риском возникновения сердечно-сосудистых событий в послеоперационном периоде [11], что и было нами зарегистрировано в I исследуемой группе.

Кроме того, высокий уровень IL-10 может вызывать состояние функционального иммунопарализа [12] и является предиктором тяжести и смертельного исхода при септических состояниях [13].

Таким образом, выявление значения IL-10 до операции 65 пг/мл и выше 320 пг/мл в 1-е сутки после операции позволяет говорить о достоверном риске возникновения тромбоэмболий в послеоперационном периоде, что подразумевает своевременное назначение соответствующей медикаментозной терапии.

При характеристике концентрации матричных металлопротеиназ у пациентов четырех исследуемых групп – в I группе (с ТЭО в после-

операционном периоде) ММП-1 на протяжении всего мониторинга была повышена в сравнении с группой контроля в 2,5–3,5 раза ($p < 0,05–0,01$), и ее уровень до АКШ (4,35 (3,5; 7,5) нг/мл) был выше ($p < 0,05$), чем в двух других исследуемых группах (2,24 (1,5; 4,2) нг/мл и 1,98 (1,34; 2,61) нг/мл), а на 3-и (3,98 (2,95; 9,5) нг/мл) и 7-е сутки (3,55 (0,994; 6,45) нг/мл) – выше ($p < 0,05$) по сравнению с концентрацией ММП-1 во II (2,0 (1,25; 3,88) и 2,62 (1,68; 2,68) нг/мл) и III группах (2,17 (1,74; 3,97) и 1,89 (1,59; 2,1) нг/мл) соответственно.

В других группах не выявлено значимых различий ММП-1 между группами. Во II группе ее уровень был умеренно повышен до операции (в 2 раза, $p < 0,05$) и на 12-е сутки (в 3 раза, $p < 0,01$) после АКШ по сравнению со здоровыми людьми, что в очередной раз может свидетельствовать о наличии и возобновлении процессов атерогенеза, так как ММП-1 является интерстициальной коллагеназой и выделяется эндотелиальными клетками атеросклеротических бляшек.

По мнению авторов, ММП-1 и ММП-9 могут играть существенную роль в дестабилизации зрелого коллагена [6]. А избыточная экспрессия ММП-1 увеличивает нестабильность уязвимой бляшки и способствует ее разрыву, что впоследствии может приводить к началу острого коронарного синдрома [14].

Обнаруженное существенное увеличение уровня ММП-1 в сыворотке крови пациентов с зарегистрированными ТЭО в послеопераци-

Таблица 2. Содержание противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови обследованных с ИБС до и после АКШ и контрольной группах

Показатели (Me; Q ₂₅ ; Q ₇₅)	I группа (n=25)	II группа (n=26)	III группа (n=46)	Группа контроля (n= 30)
IL-10 (пг/мл) до АКШ	70,27*#° (21,8;274,38)	26,12 (19,3; 115,3)	21,5 (14,4; 32,1)	18,5 (16,7; 27,12)
1-е сутки после АКШ	322,79*° (135,1;654,6) p _{5,6,7} <0,05	240,6*+ (97,06;531,36) p _{1,5,6,7} <0,05	64,79* (32,9;328,5) p _{1,6,7} <0,05	
3-и сутки после АКШ	38,94*(23,23; 112,38)	48,97* (26,26; 70,0)	44,16*(27,5; 68,65)	
7-е сутки	22,69 (19,6; 38,99)	25,46 (23,5; 40,65)	17,35 (17,12; 25,78)	
12-е сутки	28,74 (21,96; 41,32)	19,3 (16,35; 138,2)	19,2 (8,6; 41,32)	

Примечания:

1. Статистическая достоверность различий показателей с группой контроля (здесь и далее): $p < 0,05$ – *; $p < 0,01$ – **; $p < 0,001$ – ***.
2. Статистическая достоверность различий показателей в динамике: p₁ (до АКШ – 1-е сутки); p₂ (до АКШ – 3-и сутки); p₃ (1–3-и сутки); p₆ (1–7-е сутки); p₇ (1–12-е сутки); p₈ (3–7-е сутки); p₉ (3–12-е сутки).
3. Статистическая достоверность различий показателей между I и II группами: $p < 0,05$ – #; между I и III группами: $p < 0,05$ – °; между II и III группами: $p < 0,05$ – +.

онном периоде позволило поставить вопрос об оценке значимости определения данного маркера как предиктора развития вышеуказанных осложнений. Была зарегистрирована достоверная связь между повышенной концентрацией ММП-1 (3,3 нг/мл и выше) и возникновением тромбоэмболических осложнений при $\chi^2=4,8$, $p<0,05$. Использование ROC-анализа подтвердило (AUC=0,963) высокое качество предлагаемого диагностического признака. Мы подтвердили мнения авторов о том, что повышенный уровень ММП-1 в сыворотке крови пациентов с ИБС является сильным и не зависимым предиктором возникновения сердечно-сосудистых осложнений в этой группе высокого риска.

Следовательно, по результатам анализа про- и противовоспалительных цитокинов и матриксных металлопротеиназ у пациентов с ИБС до и после АКШ были получены следующие результаты: увеличение TNF- α в 9–10 раз и более (от 24 пг/мл) в предоперационном периоде, IL-10 выше 65 пг/мл до операции и от 320 пг/мл в 1-е сутки после операции и увеличение ММП-1 в 3 раза (от 3,3 нг/мл) до и после АКШ следует считать дополнительными ранними маркерами риска возникновения ТЭО после реваскуляризации миокарда методом АКШ.

Далее выполнен кластерный анализ (рис. 1) по трем выявленным показателям (TNF- α , ММП-1 и IL-10). Кластер-анализ предназначен для объединения некоторых объектов в классы (кластеры) таким образом, чтобы в один класс попадали максимально схожие, а объекты различных классов максимально отличались друг от друга. Большое достоинство кластерного анализа в том, что

он позволяет производить разбиение объектов не по одному параметру, а по целому набору признаков [15, 16, 17].

По результатам кластеризации (в соответствии с рисунком 1) видно, что есть два крупных кластера: первый (слева) и второй (справа). Сходство между членами этих двух кластеров минимальное. В первый кластер входит вся I группа (с ТЭО), во второй кластер (справа) входят все пациенты третьей группы (со стабильным течением послеоперационного периода) и II группы. То есть зарегистрировано, что сходство по содержанию TNF- α , IL-10 и ММП-1 между первым и вторым кластерами минимальное.

Дисперсионный анализ также подтвердил высоко-значимое разделение по всем переменным ($p<0,01$). Нулевой гипотезой в дисперсионном анализе является утверждение о равенстве средних значений, то есть, наш дисперсионный анализ показал что средние значения в наших группах не равны.

Увеличение TNF- α в 9-10 раз и более (от 24 пг/мл) в предоперационном периоде, IL-10 выше 65 пг/мл до операции и от 320 пг/мл в 1-е сутки после операции и увеличение ММП-1 в 3 раза (от 3,3 нг/мл) до и после АКШ следует считать дополнительными ранними маркерами риска возникновения ТЭО после реваскуляризации миокарда методом АКШ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Каждый выделенный кластер (первый и второй) характеризуется только ему свойственными особенностями иммунологических нарушений

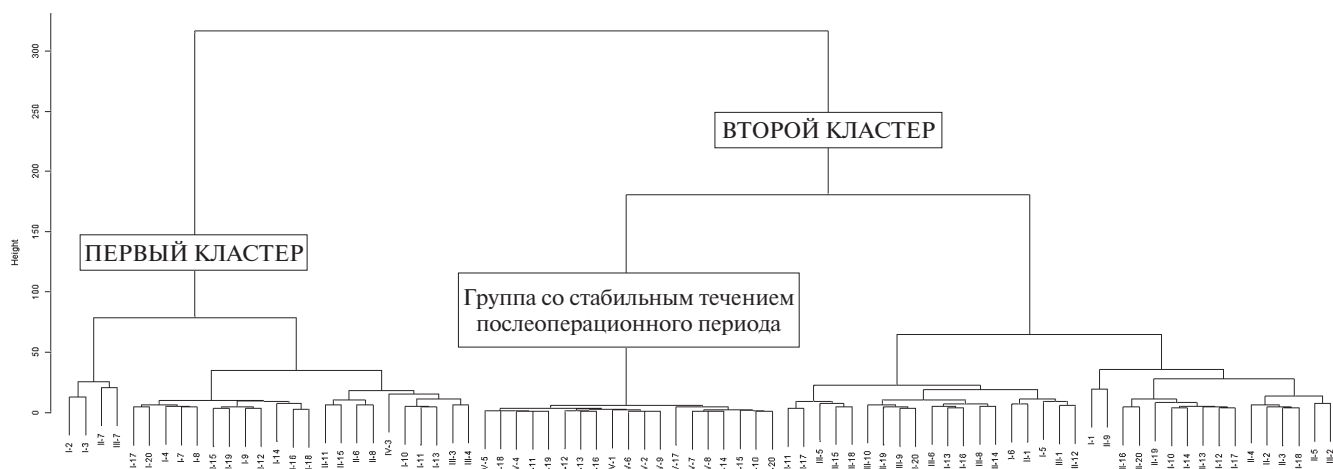


Рис. 1. Кластеризация всех групп пациентов с осложнениями в послеоперационном периоде (I и II) и со стабильным течением послеоперационного периода (III группа).

в зависимости от клинического состояния больных до и после аортокоронарного шунтирования и наличия тромбоэмболических осложнений, что можно использовать для осуществления персонализированной диагностики и лечения пациентов с риском возникновения тромбоэмболических осложнений.

Итак, именно кластерный анализ подтвердил, что в группе с ТЭО выявлены наиболее статистически значимые изменения уровня TNF- α , IL-10 и MMP-1, которые описаны выше, что и положено в основу заявки на изобретение «Способ раннего прогнозирования риска возникновения тромбоэмболических осложнений у пациентов с ишемической болезнью сердца после реваскуляризации миокарда методом аортокоронарного шунтирования» (регистрационный номер: 2017111543, входящий номер: 020402), применение которого позволит дифференцированно относиться к пациентам, поступающим для выполнения реваскуляризации миокарда, и может дать результаты по своевременной диагностике и профилактике вышеуказанных осложнений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Александрова Е. Б. Хроническая сердечная недостаточность у больных гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца: возрастные и тендерные аспекты: Кардиология 2013, 7, 40–44. [Aleksandrova E. B. Chronic heart failure in patients with hypertension and coronary heart disease: age and tender aspects: Cardiology 2013, 7, 40–44.]
2. Chen W., Li Z., Bai L., Lin Y. NF-kappa B in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. Front Biosci. 2011, 16, 1172–1185. doi: 10.2741/3782.
3. Burton-Freeman B. Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: a review of the science. Br J Nutr. 2010, 104 (Suppl 3), S1–S14. doi: 10.1017/S0007114510003909.
4. Frangogiannis N. G. The immune system and cardiac repair. Pharmacol Res. 2008, 58, 88–111.
5. Крукович А. А., Примак Н. В., Захарчук Н. В., Мокшина М. В. Тромбоэмболия легочной артерии: вопросы диагностики и прогноза. Тихоокеанский медицинский журнал 2017, 4, 31–37 [Krukovich A. A., Primak N. V., Zaharchuk N. V., Mokshina M. V. Pulmonary embolism: diagnosis and prognosis. Pacific medical journal 2017, 4, 31–37.]
6. Rao V. H., Kansal V., Stoupa S., Agrawal D. K. MMP-1 and MMP-9 regulate epidermal growth factor-dependent collagen loss in human carotid plaque smooth muscle cells: Physiol. Rep. 2014, 2, 2, e00224.
7. Турмова Е. П., Маркелова Е. В., Силаев А. А. Особенности цитокинового статуса у больных с атеросклерозом. Медицинская иммунология 2014, 16, 4, 323–332. [Turmova E. P., Markelova E. V., Silaev A. A. Features of cytokine status in patients with atherosclerosis. Medicinskaya immunologija 2014, 16, 4, 323–332.]
8. Осипова О. А., Власенко М. А., Годлевская О. М., Суязнова С. Б. Цитокины в развитии и прогрессировании хронической сердечной недостаточности: Вестник новых медицинских технологий 2012, 19, 2, 322–327 [Osipova O. A., Vlasenko M. A., Godlevskaja O. M., Sujaznova S. B. Cytokines in the development and progression of chronic heart failure: Bulletin of new medical technologies 2012, 19, 2, 322–327.]
9. Шальнев В. И., Мазуров В. И. Регуляторные нарушения ИЛ-8, ИЛ-10 при остром коронарном синдроме. Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования 2010, 2, 4, 65–66 [Shal'nev V. I., Mazurov V. I. Regulatory violations of IL-8, IL-10 in acute coronary syndrome. The Bulletin of the St.-Petersburg medical Academy of postgraduate education 2010, 2, 4, 65–66.]
10. Du T., Tan Z. Relationship between deep venous thrombosis and inflammatory cytokines in postoperative patients with malignant abdominal tumors: Braz. J. of Med. and Biol. Res. 2014, Vol. 47, 11, 1003–1007.
11. Malarstig A., Eriksson P., Hamsten A., Lindahl B., Wallentin L., Siegbahn A. Raised interleukin-10 is an indicator of poor outcome and enhanced systemic inflammation in patients with acute coronary syndrome. Heart 2008, 94, 6, 724–729.
12. Abe R., Hirasawa H., Oda S., Sadahiro T., Nakamura M., Watanabe E., Nakada Taka-aki, Hatano M., Tokuhisa T. Up-regulation of interleukin-10 mRNA expression in peripheral leukocytes predicts poor outcome and diminished human leukocyte antigen-DR expression on monocytes in septic patients. J. Surg. Res. 2008, 147, 1, 1–8.
13. Zotova N. V., Cheresnev V. A., Gusev E. Y. Systemic Inflammation: Methodological Approaches to Identification of the Common Pathological Process. PLoS One 2016, 11, 5, e0155138.
14. Jia P., Wu N., Zhang X., Jia D. Association of matrix metalloproteinase-1-519A / G polymorphism with acute coronary syndrome: a meta-analysis. Int. J. Clin. Exp. Med. 2015, 8, 4, 5675–5682.
15. Ниворожкина Л. И., Арженовский С. Б. Многомерные статистические методы в экономике: Учебник. М.: Дашков и К, 2008 [Nivorozhkina L. I., Arzhenovskij S. B. Multidimensional statistical methods in Economics: Textbook. M.: Dashkov I K, 2008.]
16. Силаев А. А., Турмова Е. П., Раповка В. Г. Изменение продукции цитокинов при развитии послеоперационных воспалительных осложнений у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий: Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН 2013, 1 (89), 190–193. [Silaev A. A., Turmova E. P., Rapovka V. G. Changes in cytokine production in the development of postoperative inflammatory complications in patients with atherosclerosis of the coronary arteries: Bulletin of the East Siberian scientific center SB RAMS 2013, 1 (89), 190–193.]

17. Tamayo E., Fernandez A., Almansa R., Carrasco E., Heredia M., Lajo C., Goncalves L., Gómez-Herreras J. I., de Lejarazu R. O., Bermejo-Martin J. F. Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. *Eur. Cytokine Netw.* 2011, 22, 2, 82–87. doi: 10.1684/ecn.2011.0281.

DETERMINING THE RISK OF THROMBOEMBOLIC COMPLICATIONS IN PATIENTS AFTER CORONARY ARTERY GRAFTING ON THE BASIS OF CLUSTER ANALYSIS

© 2019 E. V. Markelova¹, E. V. Shkorik^{1*}, A. A. Silaev²,
O. L. Zhdanova³

*E-mail: shkorikev@mail.ru

¹*Pacific State Medical University*” of the Ministry of Health of the Russian Federation Vladivostok, Russia;

²*FSBEI IN “Irkutsk State Medical University” Ministry of healthcare of the Russian Federation, Irkutsk, Russia;*

³*FSBIS Automation and Control Processes of FEB RAS, Vladivostok, Russia*

Received: 02.07.2018. **Accepted:** 28.08.2018

Ishemic heart disease continues to be the most frequent cause of sluggishness, disability and economic loss in the modern industrial community. At the present time, there is an acute need to use information technologies in evaluating the biochemical processes occurring in the body in the atherosclerotic lesion of arteries in patients with coronary heart disease and as a result of the development of thromboembolic complications of various localizations (heart, brain, lungs) of differential diagnostics. 97 patients of both sexes with IHD before and after myocardial revascularization by CABG were examined at the age of 45 to 74 years. The control group consisted of 30 healthy volunteers, comparable in age and sex. Blood sampling was performed a day before the operation, on days 1, 3, 7 and 12 after coronary artery bypass grafting. Cluster analysis was carried out on three revealed indices (TNF- α , MMP-1 and IL-10). Cluster analysis confirmed that the most significant statistically significant changes in the level of TNF- α , IL-10, and MMP-1 were detected in the TEO group. In addition, the increase in TNF- α by 9–10 times and more (from 24 pg / ml) in the preoperative period, IL-10 is higher than 65 pg / ml before operation and from 320 pg / ml on the 1-st day after the operation and increase of MMP-1 in 3 times (from 3.3 ng / ml) before and after CABG is considered to be an additional early marker of the risk of thromboembolic complications after coronary artery bypass grafting.

Key words: cytokines, metalloproteinases, myocardial revascularization, thrombosis

Authors:

Markelova E. V., MD, professor, Chair of Normal and Pathological Physiology Department, FSBEI HE “Pacific State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Vladivostok, Russia;

Shkorik E. V., ☒ the graduate student of department of Normal and Pathological Physiology Department FSBEI HE “Pacific State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation Vladivostok, Russia;

690106, Russia, Vladivostok, Ostryakova Avenue 4. Phone: 89502928940;

E-mail: shkorikev@mail.ru;

Silaev A. A., PhD, MD, FSBEI IN “Irkutsk State Medical University” Ministry of healthcare of the Russian Federation, Irkutsk, Russia;

Zhdanova O. L., senior researcher, Doctor of Physico-Mathematical Sciences, FSBIS Automation and Control Processes of FEB RAS Vladivostok, Russia.

СТАТИСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ПОПУЛЯЦИИ Т-КЛЕТОК ПРИ ДИАГНОСТИКЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

© 2019 г. Я. В. Козичук¹, А. Г. Ильвес², И. В. Кудрявцев^{3*},
Д. А. Москаленко¹, О. М. Новоселова², К. С. Рубаник², М. К. Серебрякова³,
Д. О. Старов¹, Б. А. Тимченко¹, Л. Н. Прахова², И. С. Лобанов¹

*E-mail: igorek1981@yandex.ru

¹Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 12.11.2018. Принята: 21.01.2019

Цель исследования: поиск статистически значимых популяций Т-клеток при постановке диагноза рассеянный склероз (РС). С применением многоцветной проточной цитометрии был проведен анализ абсолютного содержания различных субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-хелперов, Тх и цитотоксических Т-клеток, Тцит) в периферической крови 61-го условно здорового добровольца и 47-ми больных РС. На основании экспрессии маркеров дифференцировки (CD45RA, CD62L, CD27 и CD28) и эффекторных молекул (CD56 и CD57) Тх и Тцит были разделены на основные популяции, находящиеся на разных стадиях созревания. Выявлены следующие статистически значимые популяции Т-клеток: CD56⁺CD57⁺ Т-лимфоциты, EM Тх, EM3 Тцит, EM Тцит, CD56⁺CD57⁻ Т-лимфоциты, EM2 Тцит. Значимость также была подтверждена при расчете статистики Хи-квадрат. На основе полученной информации было выбрано три группы популяций Т-клеток. На каждой группе популяций была построена модель для диагностики рассеянного склероза на базе алгоритма k ближайших соседей. Точность предсказания построенных моделей варьируется в пределах 0.69–0.90.

Ключевые слова: рассеянный склероз, машинное обучение, алгоритм k-ближайших соседей, Т-клетки, проточная цитометрия

DOI: 10.31857/S102872210005023-0

Адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, 12. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Кудрявцев Игорь Владимирович. Тел.: +78122342929.

E-mail: igorek1981@yandex.ru

Авторы:

Козичук Я. В., студент магистратуры, факультет Систем Управления и Робототехники, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

Ильвес А. Г., к.м.н., с.н.с. лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Кудрявцев И. В., к.б.н., с.н.с. отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

Москаленко Д. А., студент магистратуры, факультет технологического менеджмента и инноваций, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

Новоселова О. М., м.н.с. лаборатории нейрореабилитации ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Рубаник К. С., м.н.с. лаборатории нейрореабилитации ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Серебрякова М. К., н.с. отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, России;

Старов Д. О., студент магистратуры, факультет Систем Управления и Робототехники, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

Тимченко Б. А., студент магистратуры, факультет Систем Управления и Робототехники, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

Прахова Л. Н., д.м.н., заведующая лабораторией нейрореабилитации ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Лобанов И. С., к.ф.-м.н. доц. факультета Систем Управления и Робототехники, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Раннее выявление любого заболевания является залогом успешного лечения и выздоровления пациента, поэтому в современном мире значительные усилия прилагаются к со-

вершенствованию медицинской диагностики. В 2016 году в Российской Федерации было выявлено 519 тысяч случаев злокачественных новообразований, что выше показателя 2016 года на 3% [1]. «Чума XX века» – вирус иммунодефицита человека – всего за 100 лет унес более 20 миллионов жизней. Более 35 миллионов человек в мире в настоящее время стоят на учете с данным диагнозом [2]. В настоящее время существуют ряд заболеваний, тяжело поддающихся диагностике, что частично объясняется недостатком знаний о механизме возникновения заболеваний. К числу таких заболеваний относятся и аутоиммунные заболевания. Для их диагностики нужны новые методы.

Ряд задач, для которых человеку тяжело предложить алгоритм решения, может быть решен методами машинного обучения. Есть примеры успешного использования данных методов в таких областях, как интернет-маркетинг, банковская сфера, сфера связи, а также медицинская диагностика. Современные корпорации, включая такие технологические гиганты, как Google и Amazon, активно проводят исследования в данной области и достигают определенных успехов. Например, сотрудники Google в 2018 году опубликовали работу, в которой они при помощи методов глубокого обучения прогнозируют риски сердечно-сосудистых заболеваний на основе снимков глазного дна [3]. Исследователи из Стэнфорда разработали программный комплекс, который самостоятельно диагностирует пневмонию, используя рентгеновские снимки грудной клетки, причем точность предсказания сравнима с навыками опытного рентгенолога [4]. Группа немецких ученых в 2014 году опубликовала работу, в которой был представлен алгоритм, детектирующий циркулирующие опухолевые клетки в периферической крови [5].

В данной работе мы будем рассматривать рассеянный склероз, являющийся представителем аутоиммунных болезней. Рассеянный склероз (РС) – это широко распространенное нейродегенеративное хроническое заболевание центральной нервной системы. Данному заболеванию, в основном, подвержены лица в возрасте от 10 до 59 лет [6]. В современном мире наблюдается увеличение числа случаев РС, что обусловлено улучшением качества диагностики, повышением возможностей терапии, а также в связи с истинным увеличением больных по неизвестным причинам. По данным Международной Федерации больных рассеянным склерозом в период

с 2008 по 2013 гг глобальная распространенность РС возросла с 30 до 33 случаев на 100 000 населения [7].

Существует ряд научных трудов, в которых рассеянный склероз изучается методами машинного обучения. В 2007 году была опубликована работа, в которой группа ученых из Индии построила симуляцию распространения аутоиммунных очагов демиелинизации в центральной нервной системе [8]. В 2017 году группа ученых из Франкфуртского университета им. Гёте представила работу, в которой они исследовали применимость методов машинного обучения в прогнозировании рассеянного склероза. В качестве исходных данных были использованы демографические и клинические данные, а также результаты МРТ [9]. В этом же году была опубликована работа, где европейские ученые пытались найти статистически значимые различия между формами РС, используя данные МРТ головного мозга [10].

Большинство исследований в данной области сфокусировано на обработке результатов магнитно-резонансной томографии, демографических, клинических, неврологических показателей или их совокупности [11–15]. Но так как РС является системным заболеванием, то при его патогенезе присутствует и изменение иммунологических показателей, таких как размеры популяций Т-клеток.

В данной работе мы рассмотрим различные методы машинного обучения в прогнозировании рассеянного склероза на основе результатов анализа абсолютного содержания различных популяций Т-лимфоцитов у больных с диагнозом рецидивирующего рассеянного склероза.

Целью исследования являлся поиск статистически важных типов Т-лимфоцитов при первичной диагностике рассеянного склероза на основе анализа крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила венозная кровь 47-ми больных с рецидивирующим РС, полученная путем пункции периферической вены и люмбальной пункции, соответственно, и собранная в вакуумные пробирки с содержанием КЗЭДТА. Диагноз РС устанавливался согласно критериям МакДональда [16]. В исследование вошли пациенты, никогда не получавшие препаратов, изменяющих течение РС (ПИТРС) и системных кортикостероидов в течение последних 90 дней. Всем пациентам проводился стандарт-

ный неврологический осмотр с последующей балльной оценкой степени поражения функциональных систем: зрительной, пирамидной, мозжечковой, чувствительной, функций тазовых органов, ствола мозга. Также подсчитывался балл по интегративной шкале EDSS – расширенной шкале инвалидизации [17]. В группу сравнения вошли образцы периферической крови от 61-го условно здорового добровольца. Обе группы пациентов не различались по половому и возрастному составу. Исследования были проведены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследование одобрено Комиссией по этике ФГБУН «Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой» РАН 23 октября 2014 года.

Для выявления основных популяций Т-лимфоцитов периферической крови использовалась следующая панель моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами (все антитела производства Beckman Coulter, США): CD57-FITC (клон NC1, кат. № IM0466U), CD56-PE (клон N901 (NKH-1), кат. № A07788), CD62L-ECD (клон DREG56, кат. № IM2713U), CD28-PC5 (клон CD28.2, кат. № 6607108), CD27-PC7 (клон 1A4CD27, кат. № A54823), CD3-APC (клон UCNT1, кат. № IM2467), CD8-APC-Alexa Fluor 700 (клон B9.11, кат. № A66332), CD45RA-APC-Alexa Fluor 750 (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4), кат. № A86050), CD4-Pacific Blue (клон 13B8.2, кат. № A82789), CD45-Krome Orange (клон J.33, кат. № A96416). Указанным коктейлем антител окрашивали 100 мкл периферической крови в соответствии с рекомендациями производителя. Для удаления эритроцитов из образцов периферической крови использовался лизирующий раствор VersaLyse Lysing Solution (кат. № A09777), к 975 мкл которого *ex tempera* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора ЮТест 3 Fixative Solution (кат. № A07800). Поиск абсолютное содержания клеток исследованных популяций Т-лимфоцитов проводили с помощью реагента FlowCount™ (Beckman Coulter, США).

При построении модели для диагностики РС применялась фенотипическая характеристика основных популяций Т-лимфоцитов, причем

их абсолютное значение (кол-во клеток на моль) из общего пула циркулирующих Т-лимфоцитов. Т-лимфоциты определяли как CD3⁺ лимфоциты. В дальнейшем, на основании коэкспрессии CD3 и CD4 выявляли Т-хелперы (Тх), а на основании коэкспрессии CD3 и CD8 – цитотоксические Т-лимфоциты (Тцит). Тх и Тцит разделяли на «наивные» клетки («N», CD45RA⁺CD62L⁺), клетки центральной («CM», CD45RA⁻CD62L⁺) и эффекторной («EM», CD45RA⁻CD62L⁻) памяти, а также «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные клетки эффекторной памяти («TEMRA», CD45RA⁺CD62L⁻). При анализе Тцит на основании уровня экспрессии ко-стимулирующих молекул CD27 и CD28 среди EM клеток выделяли популяции EM1, EM2, EM3 и EM4 с фенотипами CD27⁺CD28⁺, CD27⁺CD28⁻, CD27⁻CD28⁻ и CD27⁻CD28⁺, соответственно. Среди TEMRA Тцит также определяли содержание «пре-эффекторов» 1 типа («pE1», CD27⁺CD28⁺), «пре-эффекторов» 2 типа («pE2», CD27⁺CD28⁻) и зрелых эффекторных клеток («E», CD27⁻CD28⁻), как это было детально описано ранее [17]. Более того, на общей популяции Т-лимфоцитов определяли уровни коэкспрессии эффекторных молекул CD56 и CD57, разделяя все CD3⁺ лимфоциты периферической крови на четыре субпопуляции с фенотипами CD56⁻CD57⁺, CD56⁺CD57⁺, CD56⁺CD57⁻ и CD56⁻CD57⁻.

Модель для диагностики рассеянного склероза мы строим на базе алгоритма к ближайших соседей (kNN), который успешно справляется с различными задачами машинного обучения – классификация, регрессия, кластеризация. Задачу, поставленную в данной работе, можно формализовать как задачу бинарной классификации. Классификация – раздел машинного обучения, который занимается поиском наилучшей стратегии присвоения классов объектам на основе прошлых наблюдений пар типа объект-класс [18].

Данный алгоритм относится к классу метрических. Такие алгоритмы базируются на поиске сходства между изучаемыми объектами. Если мера сходства введена успешно, то схожим объектам удастся присвоить одинаковые классы. Для формализации понятия сходства вводится метрика $p(u, x)$ – обобщение понятия расстояния между u – изучаемым объектом и x – объектом из выборки в пространстве объектов X . Данная метрика задается различными способами: Манхэттенское расстояние, Евклидово расстояние, расстояние Левенштейна, и прочие.

При классификации нового объекта, алгоритм kNN работает следующим образом: исследуемый объект относится к наиболее часто встречающемуся классу среди его k ближайших соседей в заданной метрике.

В данной задаче в качестве объекта выступает пациент, а в качестве признаков объекта – абсолютные значения популяций Т-лимфоцитов. Для поиска статистически важных признаков мы будем использовать критерий Хи-квадрат, который позволяет найти значимость связи между двумя переменными. На основе данного метода мы можем найти значимость признаков относительно класса объекта. Использование при построении алгоритмов более значащих признаков повышает его качество. Построение моделей было осуществлено при помощи языка программирования Python 3 и библиотека scikit-learn-0.19.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После проведения процедуры отбора значимых признаков при помощи критерия Хи-квадрат, обнаружено, что значимыми показателями для построения моделей диагностики рассеянного склероза являются: (см. **рис. 1**). На представленной гистограмме большие значения у следующих субпопуляций: CD56⁻CD57⁺ Т-лимфоциты, EM Тх, EM3 Тцит, EM Тцит, CD56⁺CD57⁻ Т-лимфоциты, EM2 Тцит.

Так, абсолютное содержание Т-лимфоцитов с фенотипом CD56⁻CD57⁺ в группе больных РС снижалось ($p=0,015$) с 117 (69; 196) до 80 (45; 113) клеток в 1 мкл периферической крови. Параллельно отмечалось уменьшение ($p<0,001$) концентрации EM Тх, концентрация которых у больных РС находилось в пределах 138 (100; 198) кл/мкл, а в группе сравнения составляло 207 (157; 248) кл/мкл. Кроме того, третьим по значимости показателем в рамках использованной модели являлось абсолютное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов популяции EM3. Уровень этих клеток в периферической крови больных РС был значимо ниже такого условно здоровых добровольцев (22 (11; 33) и 28 (14; 71) клеток в 1 мкл периферической при $p=0,046$, соответственно).

Во вторую группу значимых признаков попали абсолютные значения по содержанию в периферической крови EM Тцит, Т-клеток с фенотипом CD56⁺CD57⁻ и Тцит популяции EM1. Так, уровень EM Тцит у больных РС был ниже значений, полученных для группы сравнения (117 (81; 182) и 163 (119; 204) кл/мкл при $p=0,005$, соответственно). Тогда как абсолютное содержание Т-лимфоцитов, экспрессировавших CD56, но негативных по CD57, при РС возрастало при сравнении с контролем (40 (20; 65) и 26 (17; 40) кл/мкл при $p=0,008$, соответственно). Уровень CD27⁺CD28⁺ EM Тцит при

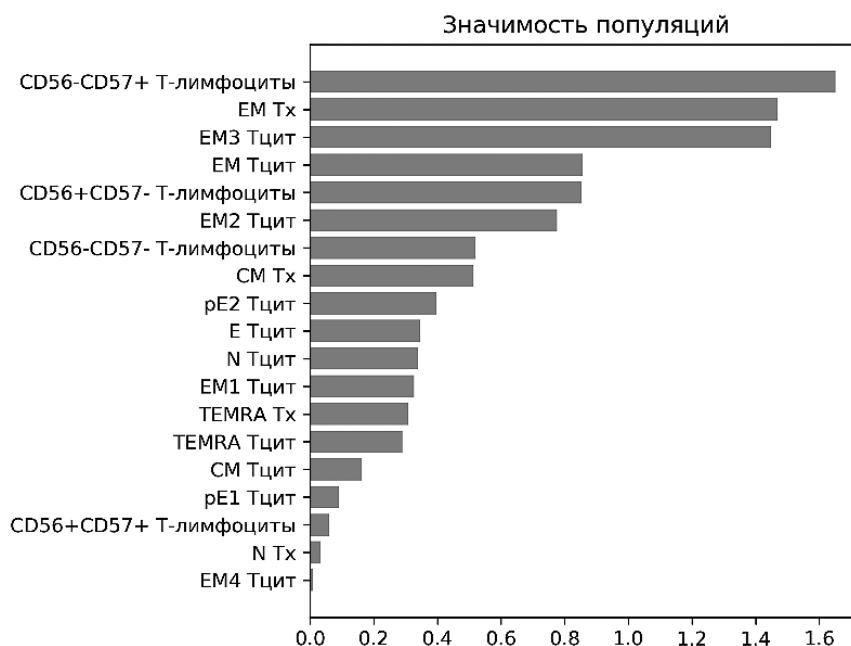


Рис 1. Значимость популяций, рассчитанных на основе статистики Хи-квадрат

РС достоверно ($p=0,002$) понижался с 23 (15; 29) до 15 (9; 25) кл/мкл.

На основе этой информации было построено 3 модели на основе алгоритма kNN для 3, 6 и 20 признаков. Исходные данные были нормированы алгоритмом мини-макс. Необходимость данной нормировки обусловлена тем, что при ее отсутствии признаки с наибольшим разбросом значений будут доминировать в метрике, а остальные практически не будут иметь влияния.

В процессе обучения, для контроля качества получаемой модели был использован метод скользящего контроля [20]. В качестве реализации метода нами был выбран так называемый q-fold, где параметр q мы взяли равным 10. Для оценки качества моделей мы использовали точность, чувствительность и F-меру. Они рассчитываются на основе трех показателей: количество истинно-положительных ответов (ИП), количество истинно-негативных ответов (ИН), количество ложно-позитивных ответов (ЛП). Их формулы расчета выглядят следующим образом:

$$\text{Точность} = \frac{\text{ИП}}{\text{ИП} + \text{ЛП}}$$

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{ИН}}{\text{ИН} + \text{ЛП}}$$

$$F\text{-мера} = \frac{2 * \text{точность} * \text{чувствительность}}{\text{точность} + \text{чувствительность}}$$

Результаты работы алгоритма k-средних зависят от числа соседей k и от метрики $p(u, x)$. Мы оптимизировали параметры алгоритма, методом случайного поиска [21]. В результате мы получили модели со следующими характеристиками (см. таб. 1)

ОБСУЖДЕНИЕ

Приведенные выше результаты указывают на то, что значимыми показателями для выявления больных с РС являются абсолютное содержание в периферической крови лимфоцитов с фенотипами $CD3^+CD56^-CD57^+$, $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD62L^-$ и $CD3^+CD8^+CD45RA^-CD62L^-CD27^-$

$CD28^-$. $CD57$, также известный под названием HNK1 (от англ. «human natural killer-1»), являющийся углеводным эпитопом, представленным на цитоплазматической мембраны клеток, обладающих выраженной цитолитической активностью [22]. Уровень $CD57$ на поверхности Т-лимфоцитов тесно связан со способностью этих клеток накапливать в составе цитоплазматических гранул ключевые эффекторные молекулы – перфорин и гранзимы [23]. Эти результаты, полученные при помощи проточной цитофлуориметрии, подтверждаются данными молекулярно-биологических исследований [24]. Так, $CD57^+$ цитотоксические Т-клетки активно экспрессировали гранзим В, гранулизин и перфорин при сравнении с $CD57^-$ негативными клетками аналогичной популяции. Таким образом, использование $CD57$ в качестве «суррогатного» маркера позволяет без использования трудоемких методов окраски на внутриклеточные антигены выявить эффекторные цитотоксические клетки, содержащие в цитоплазме необходимый набор цитолитических молекул. Изменения в содержании зрелых $CD3^+CD57^+$ лимфоцитов в периферической крови больных указывают на диагностическую значимость данной популяции клеток в диагностике РС.

Исследования EM Tх показали, что именно в составе данной популяции Tх присутствуют основные клетки-продуценты ключевых цитокинов – $IFN\gamma$ и IL-4 [25]. Более того, большинством исследователей лимфоциты именно данного фенотипа рассматривают в качестве зрелых или «эффекторных» Tх различных типов [26]. Особый интерес при исследовании РС представляет тот факт, что дифференцировка и «поляризация» в сторону Th17 EM – лимфоцитов, играющих ведущую роль в патогенезе РС – у человека находится под контролем провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6 [27]. Уровень экспрессии этих цитокинов лимфоцитами, равно как и их содержание в сыворотке крови и спинномозговой жидкости больных РС тесно связаны с тяжестью заболевания и его прогрессией [28].

Таблица 1. Характеристики полученных моделей на основе алгоритма kNN.

Кол-во признаков	Точность	Чувствительность	F1-мера	Кол-во соседей	Метрика
3	0.90	0.90	0.90	21	Манхэттенское расстояние
6	0.77	0.75	0.76	25	Евклидово расстояние
20	0.69	0.71	0.69	25	Евклидово расстояние

С другой стороны, столь же существенную роль в формировании пула эффекторных Th17 играет IL-23 [29], сывороточные концентрации которого у больных РС существенно превосходят таковые условно здоровых доноров [30]. Ключевыми эффекторными цитокинами лимфоцитов данной популяции являются IL-17A, IL-17F и IL-22, роль которых в патогенезе РС (в силу их высокой концентрации у больных) обсуждается уже длительное время [31]. При анализе EM Т-хелперов – лимфоцитов, мигрирующих в периферические ткани и обладающих выраженными эффекторными свойствами – показано, что снижение уровня CCR6⁺ Th17 именно в рамках EM клеток в циркуляции у больных РС коррелировало с увеличением инвалидизации ($r = -0,489$ при $p = 0,002$) [32].

Что же касается цитотоксических Т-клеток популяции EM3, то они рассматриваются в качестве высоко дифференцированной популяции общего пула EM клеток [33]. «Незрелые» Тцит с фенотипом CD27⁺CD28⁺ в ходе дифференцировки сначала теряют CD28, приобретая фенотип CD27⁺CD28⁻, тогда как зрелые клетки обладают фенотипом CD27⁻CD28⁻. Параллельно с потерей костимулирующих молекул Тцит, начинают экспрессировать цитолитические молекулы и обретают способность проявлять *ex vivo* цитотоксические свойства по отношению к клеткам-мишеням [34]. EM3 клетки также способны экспрессировать гены цитолитических факторов и проявлять цитотоксические свойства в условиях *in vitro*, причем уровень активности этих клеток примерно в 10 раз превышал таковой клеток EM1 и не уступал зрелым эффекторным клеткам популяции TEMRA [35]. Динамика изменения EM1-EM4 была изучена нами в периферической крови больных РС с длительными сроками заболевания [36]. Так, было показано, что у данной группы больных наблюдается достоверное снижение ($p < 0,001$) относительного содержания EM1 клеток, коэкспрессирующих CD27 и CD28, с 18,96% (14,15; 25,05) до 12,21% (9,69; 20,55). Параллельно наблюдалось накопление EM3 Тцит – в рамках группы условно здоровых доноров EM3 составляли 4,79% (2,69; 14,31), тогда как у больных РС их уровень в циркуляции повышался до 8,46% (4,96; 18,98) от общего числа клеток с фенотипом CD3⁺CD8⁺. По-видимому, на ранних сроках после постановки диагноза РС абсолютное содержание EM3 Тцит может снижаться, тогда как по мере прогрессирования РС уровень этих клеток в крови существенно повы-

шается, что еще раз указывает на диагностическую значимость этой популяции лимфоцитов.

Что же касается общей популяции EM Тцит, то в литературе можно найти весьма противоречивые данные об изменениях этих клеток при РС. Так, некоторые исследователи указывают на то, что в крови больных наблюдалось достоверное увеличение общего пула EM Тцит с фенотипом CD45RA⁻CCR7⁻ [37]. Сходные результаты были получены и другой группой исследователей, которые тоже отметили увеличение уровня EM CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, что, по мнению авторов, указывало на системную активацию данного звена приобретенного иммунитета [38]. С другой стороны, Lui и соавторы отметили, что у больных РС среди цитотоксических Т-клеток существенно увеличивались уровни CM и TEMRA Тцит, что могло свидетельствовать о наличии хронической воспалительной реакции у данных пациентов [39]. Результаты собственных предварительных исследований, проведенных на периферической крови больных РС с длительными сроками заболевания, показали отсутствие достоверных различий по относительному содержанию EM Тцит при сравнении с условно здоровыми добровольцами [36]. Однако, другой группой авторов отмечено, что снижение общего числа цитотоксических Т-клеток в периферической крови было связано с резким падением числа циркулирующих CD45RA⁻CD62L⁻ и CD45RA⁺CD62L⁻ среди CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов [40]. Последние наблюдения подтверждаются результатами, полученными в ходе проведенного исследования.

Таким образом, анализ литературных данных по динамике различных популяций Тх и Тцит в периферической крови больных РС указывает, что изменения именно в клетках зрелых эффекторных популяций могут рассматриваться в качестве потенциально значимых маркеров для диагностики РС. Разработка и применение методов машинного анализа, учитывающих весь комплекс изменений популяционного состава лимфоцитов и подробную клиническую характеристику пациента, позволит в перспективе разработать эффективные подходы для раннего выявления РС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность), под редакцией А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой, 2018. Malignant neoplasms in Russia in 2016 (morbidity and mortality). Kaprin A. D., Starinsky V. V., Petrov G. V (eds), 2018.

2. ЮНЭЙДС. Информационный бюллетень, 2017. URL http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_ru.pdf
3. Poplin R., Varadarajan A. V., Blumer K., Liu Y., McConnell M. V., Corrado G. S., Peng L., Webster D. R. Prediction of cardiovascular risk factors from retinal fundus photographs via deep learning. *Nature Biomedical Engineering* 2018, 2, 158–164.
4. Rajpurkar P., Irvin J., Zhu K., Yang B., Mehta H., Duan T., Ding D., Bagul A., Langlotz C., Shpanskaya K., Lungren M. P., Ng A. Y. CheXNet: Radiologist-Level Pneumonia Detection on Chest X-Rays with Deep Learning. Arxiv preprints, 2017.
5. Krusekopf S., Lücke J., Thilo Figge M. Automated detection of circulating tumor cells with naive Bayesian classifiers. *Cytometry A* 2014, 85, 501–511.
6. Шмидт Т. Е., Яхно Н. Н. Рассеянный склероз: руководство для врачей. МЕДпресс-информ, М., 2016, 272. [Schmidt T. E., Jahno N. N. Multiple sclerosis: a guide for doctors. MEDpress-inform, Moscow, 2016, 272.
7. Atlas of MS2013. URL: <http://www.msif.org/wp-content/uploads/2014/09/Atlas-of-MS.pdf>
8. Raman K. M. T. Simulation of Spread and Control of Lesions in Brain. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 2012, Article ID383546, 6 pages.
9. Zhao Y., Healy B. C., Rotstein D., Guttmann C. R., Bakshi R., Weiner H. L., Brodley C. E., Chitnis T. Exploration of machine learning techniques in predicting multiple sclerosis disease course. *PLoS One* 2017, 12(4), e0174866.
10. Ion-Mărgineanu A., Kocevar G., Stamile C., Sima D. M., Durand-Dubief F., Van Huffel S., Sappey-Marinié D. Machine Learning Approach for Classifying Multiple Sclerosis Courses by Combining Clinical Data with Lesion Loads and Magnetic Resonance Metabolic Features. *Front Neurosci* 2017, 11, 398.
11. Kiiski H., Jollans L., Donnchadha S. Ó., Nolan H., Lonergan R., Kelly S., O'Brien M. C., Kinsella K., Bramham J., Burke T., Hutchinson M., Tubridy N., Reilly R. B., Whelan R. Machine Learning EEG to Predict Cognitive Functioning and Processing Speed Over a 2-Year Period in Multiple Sclerosis Patients and Controls. *Brain Topogr* 2018, 31, 346–363.
12. Wottschel V., Alexander D., Kwok P. P., Chard D. T., Stromillo M. L., De Stefano N., Thompson A. J., Miller D. H., Ciccarelli O. Predicting outcome in clinically isolated syndrome using machine learning. *NeuroImage Clinical* 2015, 7, 281–287.
13. Bendfeldt K., Klöppel S., Nichols T. E., Smieskova R., Kuster P., Traud S., Mueller-Lenke N., Naegelin Y., Kappos L., Radue E. W., Borgwardt S. J. Multivariate pattern classification of gray matter pathology in multiple sclerosis. *NeuroImage*, 2012, 60, 400–408.
14. Eshaghi A., Wottschel V., Cortese R., Calabrese M., Sahraian M. A., Thompson A. J., Alexander D. C., Ciccarelli O. Gray matter MRI differentiates neuromyelitis optica from multiple sclerosis using random forest. *Neurology* 2016, 87, 2463–2470.
15. Eshaghi A., Wottschel V., Cortese R., Calabrese M., Sahraian M. A., Thompson A. J., Alexander D. C., Ciccarelli O. Graph Theory-Based Brain Connectivity for Automatic Classification of Multiple Sclerosis Clinical Courses. *Front Neurosci* 2016, 10, 478.
16. Polman C. H., Reingold S. C., Banwell B., Clanet M., Cohen J. A., Filippi M., Fujihara K., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., Lublin F. D., Montalban X., O'Connor P., Sandberg-Wollheim M., Thompson A. J., Waubant E., Weinshenker B., Wolinsky J. S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011, 69, 292–302.
17. Kurtzke J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983, 33, 1444–1452, Kappos L. Slightly modified, version 09/08.
18. Кудрявцев И. В., Борисов А. Г., Кробинец И. И., Савченко А. А., Серебрякова М. К. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии. *Медицинская иммунология* 2015, 17(6), 525–538. [Kudryavtsev I. V., Borisov A. G., Krobins I. I., Savchenko A. A., Serebryakova M. K. Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T cell subsets. *Medical Immunology (Russia)* 2015, 17(6), 525–538.]
19. Machine Learning, Neural and Statistical Classification. Michie D., Spiegelhalter D. J., Taylor C. C. (eds). Overseas Press, 1994, 290.
20. Kohav R. A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection. In: *Proceedings of the Fourteenth International Joint Conference on Artificial Intelligence*. Kaufmann M. (ed), San Mateo, CA 1995, 1137–1143.
21. Bergstra J., Bengi Y. Random search for hyper-parameter optimization. *The Journal of Machine Learning Research* 2012, 13, 281–305.
22. Focosi D., Bestagno M., Burrone O., Petrini M. CD57⁺ T lymphocytes and functional immune deficiency. *J Leukoc Biol* 2010, 87(1), 107–116.
23. Chattopadhyay P. K., Betts M. R., Price D. A., Gostick E., Horton H., Roederer M., De Rosa S. C. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol* 2009, 85(1), 88–97.
24. Le Priol Y., Puthier D., Lecureuil C., Combadiere C., Debre P., Nguyen C., Combadiere B. High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8⁺ CD57⁺ cells in HIV-infected and uninfected individuals. *J Immunol* 2006, 177(8), 5145–5154.
25. Okada R., Kondo T., Matsuki F., Takata H., Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD4⁺ T cell subsets and their differentiation. *Int Immunol* 2008, 20(9), 1189–1199.
26. Mahnke Y. D., Brodie T. M., Sallusto F., Roederer M., Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 2013, 43(11), 2797–2809.
27. Acosta-Rodriguez E. V., Rivino L., Geginat J., Jarrossay D., Gattorno M., Lanzavecchia A., Sallusto F., Napolitani G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*, 2007, 8(6), 639–646.

28. *Rovaris M., Barnes D., Woodrofe N., du Boulay G. H., Thorpe J. W., Thompson A. J., McDonald W. I., Miller D. H.* Patterns of disease activity in multiple sclerosis patients: a study with quantitative gadolinium-enhanced brain MRI and cytokine measurement in different clinical subgroups. *J Neurol* 1996, 243(7), 536–542.
29. *Kebir H., Ifergan I., Alvarez J. I., Bernard M., Poirier J., Arbour N., Duquette P., Prat A.* Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009, 66(3), 390–402.
30. *Shajarian M., Alsahebfsoul F., Etemadifar M., Sedaghat N., Shahbazi M., Firouzabadi F. P., Dezhshibi H. M.* IL-23 plasma level measurement in relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS) patients compared to healthy subjects. *Immunol Invest* 2015, 44(1), 36–44.
31. *Babaloo Z., Aliparasti M. R., Babaiea F., Almasi S., Baradaran B., Farhoudi M.* The role of Th17 cells in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: interleukin-17A and interleukin-17F serum levels. *Immunol Lett* 2015, 164(2), 76–80.
32. *Кудрявцев И. В., Ильвес А. Г., Борисов А. Г., Минеев К. К., Петров А. М., Савченко А. А., Серебрякова М. К., Столяров И. Д.* CCR6-позитивные Т-хелперы периферической крови при рассеянном склерозе. Цитокины и воспаление 2016, 15(2), 166–172. [*Kudryavtsev I. V., Ilves A. G., Borisov A. G., Mineev K. K., Petrov A. M., Savchenko A. A., Serebriakova M. K., Stoliarov I. D.* CCR6-positive T helper subsets of peripheral blood in multiple sclerosis. *Cytokines and inflammation* 2016, 15(2), 166–172.]
33. *Romero P., Zippelius A., Kurth I., Pittet M. J., Touvrey C., Iancu E. M., Corthesy P., Devevre E., Speiser D. E., Rufer N.* Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 2007, 178(7), 4112–4119.
34. *Rufer N., Zippelius A., Batard P., Pittet M. J., Kurth I., Corthesy P., Cerottini J. C., Leyvraz S., Roosnek E., Nabholz M., Romero P.* Ex vivo characterization of human CD8⁺ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood* 2003, 102(5), 1779–1787.
35. *Romero P., Zippelius A., Kurth I., Pittet M. J., Touvrey C., Iancu E. M., Corthesy P., Devevre E., Speiser D. E., Rufer N.* Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 2007, 178(7), 4112–4119.
36. *Кудрявцев И. В., Ильвес А. Г., Кробинец И. И., Минеев К. К., Серебрякова М. К., Петров А. М., Столяров И. Д.* Субпопуляционный состав Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови при рассеянном склерозе. Цитокины и воспаление 2016, 15, 1. 91–99. [*Kudryavtsev I. V., Krobinec I. I., Mineev K. K., Serebriakova M. K., Petrov A. M., Stoliarov I. D.* Helper and cytotoxic T lymphocyte subsets in patients with multiple sclerosis. *Cytokines and inflammation* 2016, 15(1), 91–99.]
37. *Mikulikova Z., Praksova P., Stourac P., Bednarik J., Michalek J.* Imbalance in T-cell and cytokine profiles in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2011, 300(1–2), 135–141.
38. *Haeghele K. F., Stueckle C. A., Malin J. P., Sindern E.* Increase of CD8⁺ T-effector memory cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis compared to healthy controls. *J Neuroimmunol* 2007, 183(1–2), 168–174.
39. *Liu G. Z., Fang L. B., Hjelmström P., Gao X. G.* Increased CD8⁺ central memory T cells in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007, 13(2), 149–155.
40. *Pender M. P., Csurhes P. A., Pfluger C. M., Burrows S. R.* Deficiency of CD8⁺ effector memory T cells is an early and persistent feature of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2014, 20(14), 1825–1832.

STATISTICALLY SIGNIFICANT T-CELL POPULATIONS
DURING DIAGNOSIS OF SCATTERED SCLEROSIS

© 2019 Y. V. Kozichuk¹, A. G. Ilves², I. V. Kudryavtsev^{3*}, D. A. Moskalenko¹,
O. M. Novoselova², K. S. Rubanik², M. K. Serebryakova³, D. O. Starov¹,
B. A. Timchenko¹, L. N. Prakhova², I. S. Lobanov¹

*E-mail: igorek1981@yandex.ru

¹IFMO University, St. Petersburg, Russia;

²N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy
of Sciences (IHB RAS), St. Petersburg, Russia;

³Institute of Experimental Medicine (FSBSI "IEM"), St. Petersburg, Russia

Received: 12.11.2018. Accepted: 21.01.2019

To search for statistically significant T-cell populations in the diagnosis of multiple sclerosis (MS). The analysis of the absolute content of various subpopulations of T-lymphocytes (T-helpers (Th) and cytotoxic T-cells (Tcyt)) in the peripheral blood of 61 healthy volunteers and 47 patients with MS was carried out using multi-color flow cytometry. Based on the expression of differentiation markers (CD45RA, CD62L, CD27 and CD28) and effector molecules (CD56 and CD57), Th and Tcyt were divided into main populations at different stages of maturation. The following statistically significant populations of T-cells were identified: CD56⁻CD57⁺ T-lymphocytes, Em Th, EM3 Tcyt, CD56⁺CD57⁻ T-lymphocytes, EM2 Tcyt. The significance of these populations was also confirmed in the calculation of Chi-square statistics. Based on the information received, three groups of T-cell populations were selected. A model for the diagnosis of multiple sclerosis based on the algorithm of K nearest neighbors was built on each group of populations. The accuracy of prediction of the constructed models varies in the range of 0.69–0.90.

Key words: multiple sclerosis, machine learning, kNN, T-cells, flow cytometry

Authors:

Kozichuk Y. V., graduated student, Faculty of Control Systems and Robotics, IFMO University; St. Petersburg, Russia;

Ilves A. G., PhD, senior researcher, laboratory of neuroimmunology, N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences St. Petersburg, Russia;

Kudryavtsev I. V., ✉ PhD, senior researcher, department of immunology, "Institute of Experimental Medicine", St. Petersburg, Russia.

197376, St. Petersburg, acad. Pavlov str., 12, Scientific Research Institute of Experimental Medicine; Phoe/fax: +7–8122342929,
E-mail: igorek1981@yandex.ru;

Moskalenko D. A., graduated student, Faculty of Technological Management and Innovations, IFMO University; St. Petersburg, Russia;

Novoselova O. M., junior researcher, laboratory of neurorehabilitation, N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;

Rubanik K. S., junior researcher, laboratory of neurorehabilitation, N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;

Serebriakova M. K., Research Associate, department of immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", St. Petersburg, Russia;

Starov D. O., graduated student, Faculty of Control Systems and Robotics, IFMO University; St. Petersburg, Russia;

Timchenko B. A., graduated student, Faculty of Control Systems and Robotics, IFMO University; St. Petersburg, Russia;

Prakhova L. N., MD, Head of the laboratory of neurorehabilitation, N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;

Lobanov I. S., PhD (Physics and Mathematics), docent, Department of Control Systems and Robotics, IFMO University; St. Petersburg, Russia.

ДИНАМИКА СИНТЕЗА И ЦИРКУЛЯЦИИ СУБКЛАССОВ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgG ПРИ ИММУННОМ ОТВЕТЕ НА ВАКЦИНУ ПРОТИВ КОРИ, КРАСНУХИ, ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА

© 2019 г. А. П. Топтыгина*, Т. А. Мамаева

*E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Поступила: 20.09.2018. Принята: 21.01.2019

Целью работы было изучение динамики синтеза и циркуляции субклассов специфических IgG при иммунном ответе на вакцину против кори, краснухи, эпидемического паротита и обработка параметров разделения первичного и вторичного типов иммунного ответа. Материалом исследования были сыворотки крови детей, привитых против кори, краснухи и паротита вакциной Приорикс, полученные через 3 нед. после прививки – 24 ребенка (группа 1), через 4 нед. после прививки – другие 26 детей (группа 2), через 6 нед. – также другие 25 детей (группа 3), через 1 год после вакцинации – 38 детей из состава первых трех групп (группа 4), через 5 лет (перед ревакцинацией) – 24 ребенка из состава четвертой группы (группа 5). В сыворотках крови с помощью иммуноферментного метода были исследованы специфические IgG-антитела и спектр их субклассов к вирусам кори, краснухи и паротита. Показано, что в начале иммунного ответа на все три вируса формировались антитела субкласса IgG3, но скорость прирастания и переключения на преимущественно IgG1-тип иммунного ответа различалась. Рассчитаны cut off для антител субклассов IgG1 и IgG3, которые составили для вирусов кори 46,84% и 42,8%, соответственно; для вирусов краснухи 62,67% и 12,63% соответственно; для вируса эпидемического паротита 54,97% и 37,26% соответственно. Полученные значения cut off позволяют разделить первичный и вторичный иммунный ответ по соотношению субклассов антител. Значимость разработанного подхода к разделению раннего и позднего типа иммунного ответа у привитых была подтверждена на независимой выборке привитых детей: 16 человек через 4 недели после прививки и 15 детей через год после прививки вакциной против кори, краснухи, эпидемического паротита, а также при исследовании антител в сыворотке крови от больных корью взрослых (14 не привитых ранее пациентов и 15 привитых в детстве пациентов).

Ключевые слова: корь, краснуха, эпидемический паротит, иммунный ответ, субклассы IgG, вакцинация

DOI: 10.31857/S102872210005024-1

Адрес: 125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова 10, МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского, Топтыгина Анна Павловна. Тел.: +7(495)4521801 (раб.), +7(916)3896604 (моб.).

E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Авторы:

Топтыгина А. П., д.м.н., в.н.с. лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Мамаева Т. А., к.б.н., в.н.с. лаборатории прикладной иммунологии ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Корь и краснуха являются не просто вакцино-управляемыми (контролируемыми) инфек-

циями, эти инфекции заявлены ВОЗ как цель для элиминации (корь) и синдрома врожденной краснухи (менее 10 на 100 000 новорожденных) [1]. Несмотря на проведение массовых профилактических вакцинаций от этих инфекций во всех регионах мира, заявленные цели не были достигнуты ни к 2010, ни к 2015 году [2]. В результате активной вакцинации было достигнуто резкое снижение заболеваемости и смертности от этих инфекций, однако даже в высокоразвитых странах с высокими показателями вакцинации, таких как страны ЕС, встречаются довольно крупные вспышки кори [3]. Причиной заболеваемости могли стать как отказ от прививок у маленьких детей, так и потеря на-

пряженности поствакцинального иммунитета у заболевших взрослых [4]. На этапе элиминации кори особенно важно понимать, заболел ли данный человек из-за отсутствия прививки, или из-за утери защитного уровня антител. Обычно для дифференциальной диагностики первичного и вторичного иммунного ответа используют методы выявления специфических IgM, определение качественных и количественных показателей IgG антител. Однако уровень IgG антител в начале заболевания может сильно отличаться у разных пациентов, а IgM антитела могут встречаться как при первичном, так и при вторичном иммунном ответе [5, 6]. Ранее было показано, что для первичного иммунного ответа преобладающим субклассом являются IgG3 антитела, а для вторичного — IgG1 [7, 8]. Способность синтезировать антитела тех или иных субклассов зависит от возраста привитого (или больного) индивидуума [9].

Целью данной работы было изучение динамики синтеза и циркуляции субклассов специфических IgG при иммунном ответе на вакцину против кори, краснухи, эпидемического паротита и обработка параметров разделения первичного и вторичного типов иммунного ответа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования были сыворотки крови детей, привитых согласно национальному календарю прививок против кори, краснухи и паротита вакциной Приорикс (GlaxoSmith Kline, Бельгия), средний возраст на начало обследования составил 1 г. 3 мес. Всего было обследовано 75 детей, которые были разделены на 3 группы в зависимости от срока забора крови:

- (группа 1) — 24 ребенка, срок забора крови через 3 недели после вакцинации;
- (группа 2) — 26 детей, срок забора крови через 4 недели после вакцинации;
- (группа 3) — 25 детей, срок забора крови через 6 недель после вакцинации.

Через 1 год после вакцинации были обследованы 38 детей из состава первых трех групп (группа 4), 24 ребенка из которых были обследованы в дальнейшем через 5 лет после вакцинации (группа 5).

Работа была одобрена этической комиссией Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского, родители подписывали информированное согласие на участие детей в программе исследований.

Для подтверждения достоверности полученных параметров «cut off» при распределении IgG1

и IgG3 была дополнительно обследована группа (31 ребенок), привитых вакциной Приорикс, средний возраст на начало обследования составил 1 год 5 мес. Эта группа была обследована в разные сроки после вакцинации: 16 детей через 4 недели и 15 — через 1 год.

Также были исследованы сыворотки крови, полученные на 5–7 день со дня появления сыпи от 29 больных корью взрослых (средний возраст 28,3 лет), не привитых (14 пациентов) и имеющих сведения о вакцинации в детстве (15 пациентов). Взятие крови осуществляли из локтевой вены в количестве 4 мл. Сыворотку крови разливали в пробирки типа «Эппендорф» замораживали и хранили до использования при -70°C .

В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли специфические IgG антитела к вирусам кори, краснухи и эпидемического паротита (Euroimmun, Германия) и субклассы специфических IgG антител в модификации [10]. При этом мы использовали 96-луночные панели, покрытые антигенами соответственно кори, краснухи или паротита от коммерческого набора для определения специфических IgG антител (Euroimmun, Германия). Сыворотки добавляли в разведении 1:50. В качестве конъюгата использовали меченные пероксидазой анти-IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 моноклональные антитела (Полигност, Ст. Петербург) в концентрации 1 мкг/мл. Для сопоставления результатов различных опытов, мы использовали стандартную сыворотку, содержащую специфические антитела к кори, краснухе и паротиту всех четырех субклассов Ig G. Оценку динамики содержания субклассов IgG в сыворотках привитых детей осуществляли с помощью стандартной сыворотки.

Полученные результаты были подвергнуты обработке методами вариационной статистики (программные пакеты «Statistica 6.0» и Microsoft Excel) с вычислением средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm SE$). О достоверности различий судили по критерию Стьюдента (t). Различия в частотах распределения специфических субклассов IgG анализировали методом χ^2 . Уровень $p < 0,05$ оценивался как значимый. Для выявления корреляций между различными признаками использовали критерий Пирсона. Анализ диагностической значимости исследуемых иммунологических параметров, а также оценку уровня пороговых значений показателей осуществляли методом характеристических кривых (receiver operator characteris-

tic, ROC-анализ) с использованием программы «SPSS16.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные данные показали, что содержание специфических IgG менялось в зависимости от срока прошедшего со дня вакцинации (таб. 1). Через 3 недели после вакцинации специфические IgG были выявлены в крови привитых на все 3 вируса (корь, краснуха, паротит). Спустя 6 недель наблюдался прирост количества специфических IgG-антител на вирус кори в 3 раза; в 4,3 раза на краснушный компонент вакцины. Показатель IgG к вирусу эпидемического паротита увеличился в 3,5 раза только через 1 год по сравнению с данными полученными при обследовании через 3 недели ($p < 0,05$). Практически не изменились показатели IgG к вирусам кори и краснухи через 5 лет при сравнении с показателями через 6 недель, тогда как значение специфических антител к вирусу паротита снизилось в 1,8 раза.

Интересные результаты были получены при анализе динамики субклассов специфических Ig G. На рисунке 1 представлены результаты для трех вирусов, входящих в состав вакцины Приорикс. Показано, что через 3 недели после вакцинации преобладающим субклассом является IgG3 в ответе на все три вируса. К 4-й неделе IgG3-антитела продолжают нарастать, значимо для вирусов кори и эпидемического паротита. Появляются также и IgG1-антитела, которые на вирус краснухи догоняют по количеству IgG3-антитела. При ответе на вирус эпидемического паротита через 6 недель после вакцинации показатели IgG1 и IgG3 практически одинаковы. В динамике синтеза антител на вирус кори, даже через 6 недель, преобладают IgG3-антитела. Позднее, когда вирусная нагрузка снижается, IgG1-антитела количественно увеличиваются и становятся преобладающим субклассом для всех трех вирусов.

Таблица 1. Содержание специфических IgG в сыворотках детей, привитых против кори, краснухи, эпидемического паротита (МЕ/мл)

	Срок обследования после вакцинации				
	3 недели	4 недели	6 недель	1 год	5 лет
Корь	0,568±0,023*	1,146±0,031	1,719±0,056*	1,638±0,082*	1,437±0,059
Краснуха	26,9±2,1*	69,0±4,9	113,0±5,8*	119,5±5,7*	117,7±6,2
Паротит	18,2±1,7*	31,0±2,8	43,0±3,9*	63,0±4,2*	35,4±4,7

* $p < 0,05$ по сравнению со сроком через 4 недели после прививки

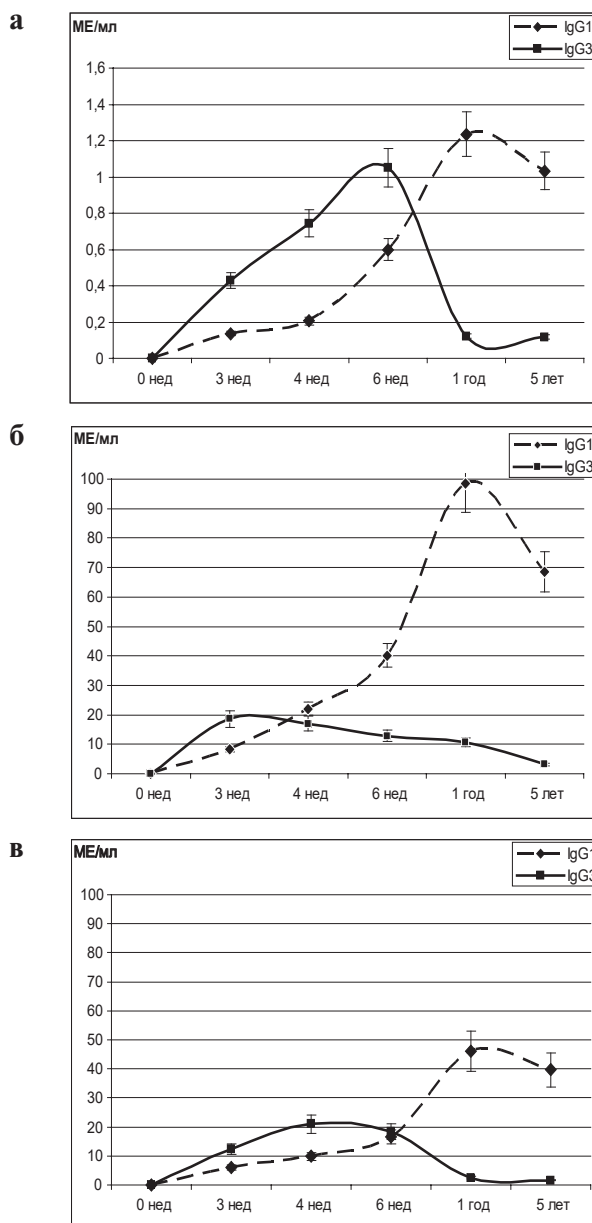


Рис. 1. Распределение количества специфических антител между субклассами IgG1 и IgG3 в зависимости от времени, прошедшего после прививки против кори, краснухи, эпидемического паротита ($M \pm SE$).

Примечание: а – корь, б – краснуха, в – эпидемический паротит

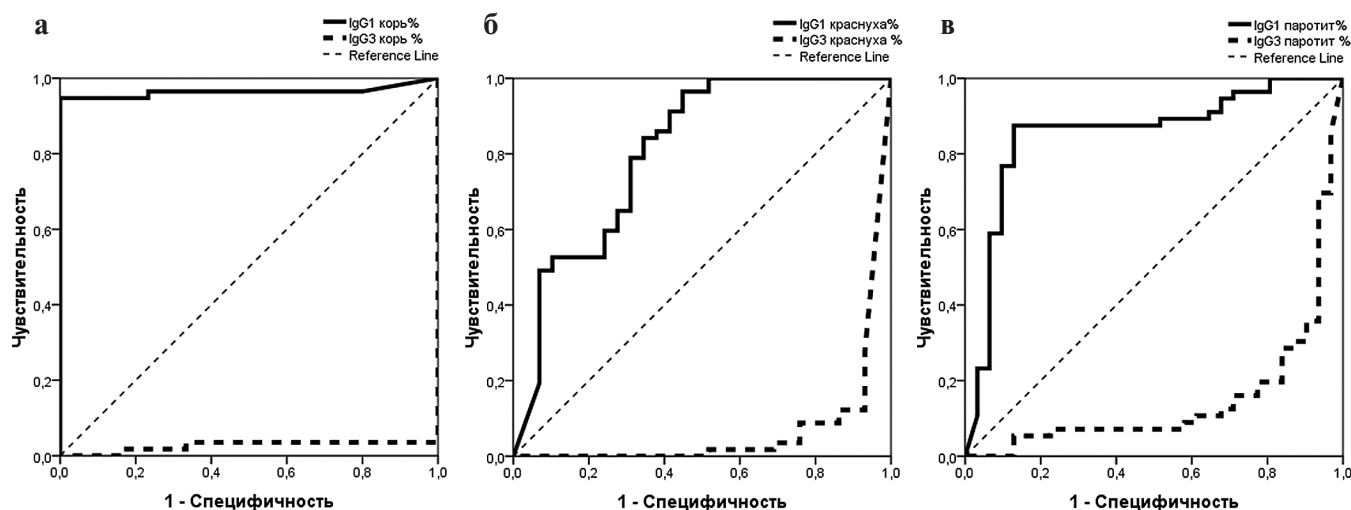
Таблица 2. ROC-анализ количества субклассов специфических антител, выраженных в процентах от уровня специфических IgG на антигены вирусов вакцины против кори, краснухи, эпидемического паротита

Субклассы IgG	Площадь под ROC-кривой AUC(CI), $p < 0,05$	Пороговое значение количества IgG, %	Чувствительность, %	Специфичность, %
IgG1-корь	0,976 (0,938–1,003)	46,84	99	100
IgG3-корь	0,987 (0,939–1,001)	42,8	100	97,5
IgG1-краснуха	0,843 (0,712–0,901)	62,67	98,2	82,8
IgG3-краснуха	0,933 (0,876–0,998)	12,63	96,1	87,7
IgG1-паротит	0,875 (0,786–0,954)	54,97	89,3	90,3
IgG3-паротит	0,865 (0,776–0,943)	37,26	87,1	82,1

Для исключения зависимости показателей специфических антител каждого субкласса от абсолютных значений специфических IgG, результат был представлен в виде процента от общего специфического антительного ответа на тот или иной вирус вакцины. Результаты проведенного ROC-анализа представлены в **таблице 2**. Значения площади под кривой (AUC), получились очень высокими, что свидетельствует о хорошем качестве разделительной модели. На **рисунке 2** представлены ROC-кривые для этих расчетов. Были вычислены значения «cut off» для IgG1 и IgG3 специфических антител для вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита. Установлено, что независимо от общего содержания коревых IgG на ранних этапах поствакцинального периода, процент антител

субкласса IgG1 составляет менее 46,84%, а IgG3 более 42,8%. С вероятностью более 99% эти показатели характеризуют первичный иммунный ответ. Аналогичные показатели были получены с вероятностью более 95% и для краснухи: IgG1 < 62,67% и IgG3 > 12,63%. Для эпидемического паротита – IgG1 < 54,97% и IgG3 > 37,26% с вероятностью определения первичного иммунного ответа более 90%.

Для подтверждения достоверности полученных параметров «cut off» была дополнительно обследована группа (31 ребенок), привитых вакциной против кори, краснухи, эпидемического паротита. Эта группа была обследована в разные сроки после вакцинации: 16 детей через 4 недели и 15 – через 1 год. Количество антител IgG1- и IgG3-субклассов было представлено

**Рис. 2.** ROC-анализ процента специфических антител субклассов IgG1 и IgG3 от общего специфического иммунного ответа на антигены вакцины у привитых против кори, краснухи, эпидемического паротита для определения типа иммунного ответа (ранний или поздний гуморальный иммунный ответ). **а** – для вирусов кори; **б** – для вирусов краснухи; **в** – для вирусов эпидемического паротита.

в виде процента от общего (суммарного) IgG-ответа на каждый вирус вакцины (рис. 3). Показано, что обследованная группа детей распадается на две подгруппы в зависимости от срока обследования: с высоким IgG3 и низким IgG1-ранний тип иммунного ответа (через 4 недели) и с низким IgG3 и высоким IgG1-поздний тип иммунного ответа (через 1 год). Рассчитанные коэффициенты корреляций между IgG1 и IgG3 выявили очень сильные отрицательные связи (для кори $r = -0,94$, для краснухи $r = -0,93$, для эпидемического паротита $r = -0,95$). Тем не менее, если для кори, разделение на ранний и поздний тип иммунного ответа на основании рассчитанных «cut off», точно совпадает со временем, прошедшем после прививки (все привитые 4 недели назад имеют показатели IgG1 менее 46,84%, а IgG3 более 42,8%, а результаты обследования через год после прививки характеризуют поздний тип иммунного ответа (IgG1 более 46,84%, а IgG3 менее 42,8%), то для антител к вирусам краснухи и эпидемического паротита выявлены перекресты. Так, показатели содержания субклассов IgG к вирусу краснухи у 2-х детей через 4 недели и у 2-х детей через год после вакцинации расположены в промежуточной, так называемой неопределяемой зоне, а у одного ребенка через 4 недели после вакцинации концентрация IgG1 к вирусу паротита составила 56%.

Для проверки гипотезы о неслучайном распределении на ранний и поздний тип иммунного ответа у обследованной когорты детей по критериям IgG1 и IgG3 на основании рассчитанных пороговых значений «cut off» был рассчитан χ^2 . Для вирусов кори $\chi^2 = 108,2$; $p = 0$. Для вирусов краснухи $\chi^2 = 5,14$; $p = 0,023$. Для вирусов эпидемического паротита $\chi^2 = 12,05$; $p = 5,19 \times 10^{-4}$. Для всех трех вирусов были получены статистически значимые результаты.

Значимость разработанного подхода к разделению раннего и позднего типа иммунного ответа у привитых была использована при оценке постинфекционного иммунитета у больных корью непривитых (первичный тип иммунного ответа) и больных, ответивших вторичным типом иммунного ответа. Для сравнительного анализа в первую группу были объединены результаты, полученные у не привитых больных корью взрослых, и первично привитых детей (первичный иммунный ответ). Во вторую группу — результаты, полученные у ранее привитых больных корью взрослых и привитых детей че-

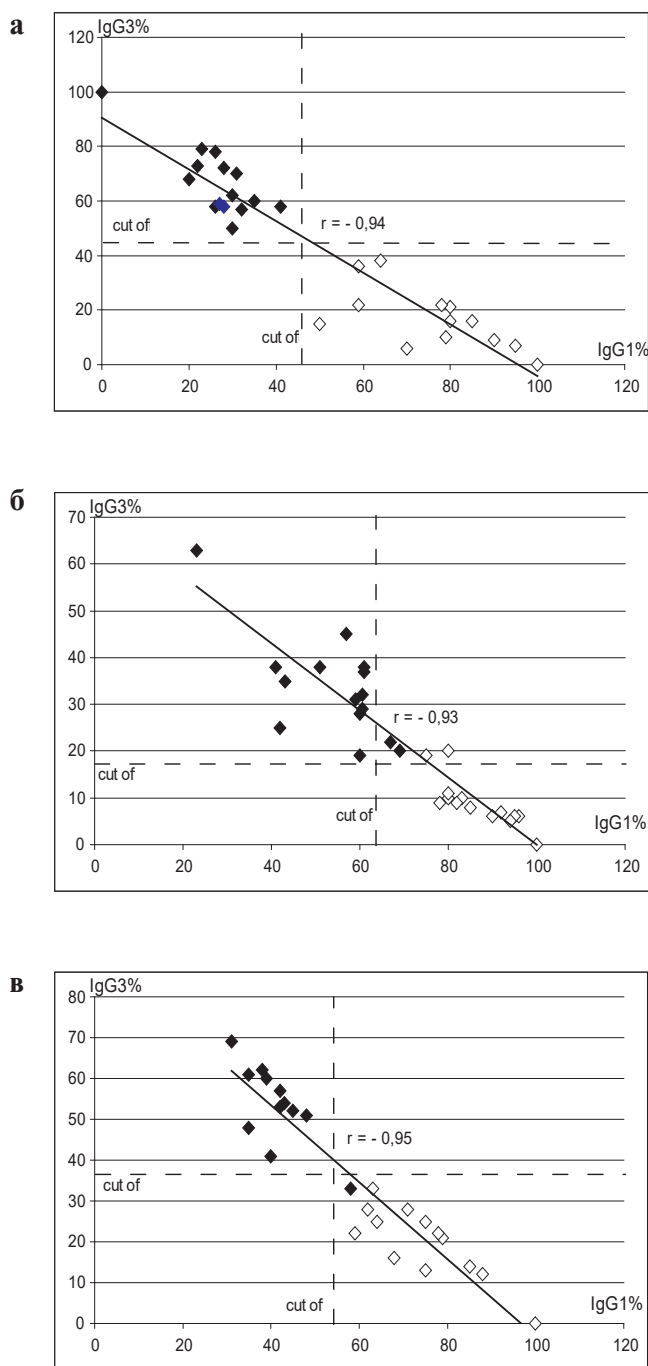


Рис. 3. Сопоставление реальных и рассчитанных на основании cut off результатов разделения на ранний и поздний тип иммунного ответа. **а** — для вирусов кори, **б** — для вирусов краснухи, **в** — для вирусов эпидемического паротита.

Положение каждой точки на графике означает реальные значения специфических IgG1 и IgG3 для каждого ребенка, черный цвет маркера — через 4 недели после вакцинации, белый цвет маркера — через 1 год после вакцинации. Пунктирной линией обозначены уровни cut off для IgG1 и IgG3 антител.

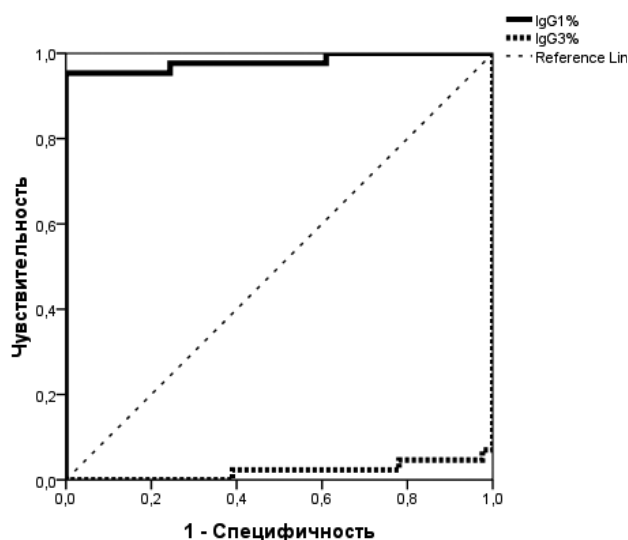


Рис. 4. ROC-анализ количества специфических антител IgG1 и IgG3 субклассов в объединенных группах: 1 ранее непривитых больных корью и первично привитых детей и 2 привитых больных корью и детей через 1 год после вакцинации против кори для определения типа иммунного ответа (первичный или вторичный гуморальный иммунный ответ).

рез год после прививки (вторичный иммунный ответ). Были выбраны показатели, обладающие наибольшей прогностической значимостью — количество специфических антител IgG1 и IgG3 субклассов (рис. 4, таб. 3). Следует отметить, что значения «cut-off», рассчитанные для таких смешанных (больные и привитые) групп практически совпадают с «cut-off», рассчитанными только для привитых детей (см. таб. 2).

Это означает, что независимо от того, в результате какого события (инфекция или прививка) сформировался специфический иммунный ответ на корь, если у обследуемого индивидуума специфический противокоревой ответ представлен IgG1-антителами менее чем на 48,06%, а IgG3 — более чем на 43,3%, то такой иммунный ответ, с вероятностью 98%, следует расценивать как первичный. Если же напротив, специфический гуморальный иммунный ответ на корь представлен IgG1-антителами более чем на 48,06%,

а IgG3 — менее чем на 43,3%, то с вероятностью 98% это вторичный иммунный ответ.

ОБСУЖДЕНИЕ

У человека различают 4 субкласса IgG, однако было выявлено, что на первичный контакт с прививкой против кори, краснухи, эпидемического паротита дети отвечают преимущественно IgG3 субклассом, а иммунологическая память осуществляется преимущественно за счет IgG1 [7]. В данной работе прицельное внимание было направлено на динамику синтеза антител двух субклассов (IgG3, IgG1), обладающих наибольшей прогностической значимостью.

В результате исследования динамики формирования специфического иммунного ответа на тривалентную вакцину против кори, краснухи, эпидемического паротита было выявлено, что, несмотря на одновременное введение вирусов трех вакцинных штаммов в один и тот же организм, скорость формирования специфического гуморального ответа на эти три вируса различалась. В начале иммунного ответа на все три вируса формировались антитела субкласса IgG3, но скорость прирастания и переключения на преимущественно IgG1-тип иммунного ответа различалась. Быстрее всего такое переключение происходило при ответе на вирус краснухи, а медленнее всех переключался ответ на вирус кори. Возможно, это связано с тем, что вирус кори использует в качестве рецептора молекулы SLAM (Signaling lymphocyte activation molecule) для проникновения в клетку [11], а последние, в свою очередь, вовлечены в процесс созревания гуморального иммунного ответа [12]. Обнаруженная тенденция прослеживается и в уровне рассчитанных «cut off» для антител субклассов IgG1 и IgG3 на все три вируса. Так для вирусов краснухи, которые, по-видимому, не влияют на гуморальный иммунный ответ, значения «cut-off» были минимальными для IgG3 и максимальными для IgG1 антител. Для вирусов кори, которые тормозят переключение с IgG1 на IgG3 субкласс за счет блокирования молекулы

Таблица 3. ROC-анализ количества субклассов специфических антител у ранее непривитых и привитых больных корью в сопоставлении с первично привитыми и ревакцинированными против кори детьми

Субклассы IgG	Площадь под ROC-кривой AUC(CI), $p < 0,05$	Пороговое значение количества IgG, %	Чувствительность	Специфичность
IgG1-корь (cut-off)	0,98(0,95–1,01)	48,06	95,3%	100%
IgG3-корь (cut-off)	0,98(0,95–1,01)	43,3	100%	95,3%

SLAM, напротив имели минимальные значения «cut-off» для IgG1 и максимальные для IgG3. Гуморальный иммунный ответ на вирус эпидемического паротита занимает промежуточное положение, его влияние на иммунитет слабее, чем у вируса кори, и соответственно для него значения «cut-off» также были промежуточными. Установлено, что независимо от общего содержания коревых IgG на ранних этапах поствакцинального периода, процент антител субкласса IgG1 составляет менее 46,84%, а IgG3 более 42,8%. С вероятностью более 99% эти показатели характеризуют первичный иммунный ответ. Аналогичные показатели были получены с вероятностью более 95% и для краснухи: IgG1 < 62,67% и IgG3 > 12,63%. Для эпидемического паротита – IgG1 < 54,97% и IgG3 > 37,26% с вероятностью определения первичного иммунного ответа более 90%.

Значимость разработанного подхода к разделению раннего и позднего типа иммунного ответа у привитых была использована при оценке постинфекционного иммунитета у больных корью непривитых (первичный тип иммунного ответа) и больных, ответивших вторичным типом иммунного ответа.

Предложенный нами способ определения типа иммунного ответа по соотношению долей специфических антител, принадлежащих к субклассам IgG1 и IgG3 имеет большое практическое значение. Дело в том, что не всегда можно выяснить прививочный анамнез у данного конкретного человека, тем более, если это взрослый. Детские карты часто теряются, а сам пациент не помнит, что было в раннем детстве. Дополнительные проблемы вносят случаи прививки некачественной вакциной или с нарушениями инструкции применения вакцины. Такие люди числятся привитыми, а на самом деле их организм остался неиммунным. Не следует сбрасывать со счетов первичные и вторичные вакцинальные неудачи. В первом случае, несмотря на правильное проведение вакцинации, организм человека не выработал защитных антител, во втором случае антитела выработались, но быстро исчезли. В крови у людей всех этих групп специфических антител не наблюдается, однако после проведенной вакцинации спектр субклассов будет различный, и, основываясь на предложенном способе разделения на первичный и вторичный тип иммунного ответа, можно будет установить прививочный статус каждого конкретного пациента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Strebel P. M., Cochi S. L., Hoekstra E., Rota P. A., Featherstone D., Bellini W. J., Katz S. L.* A world without measles. *J Infect Dis* 2011, 204, Suppl 1: S1–3.
2. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Epidemiological update: Measles – monitoring European outbreaks, 7 July 2017. Stockholm: ECDC; [Accessed 31 Aug 2017]. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-measles-monitoring-european-outbreaks-7-july-2017>
3. World Health Organization Regional Office for Europe (WHO/Europe). Fifth Meeting of the European Regional Verification Commission for Measles and Rubella Elimination (RVC) 24–26 October 2016, Copenhagen, Denmark. Copenhagen: WHO/Europe; [Accessed 31 Aug 2017]. Available from: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/330917/5th-RVC-meeting-report.pdf?ua=1
4. Топтыгина А. П., Мамаева Т. А., Алешкин В. А. Особенности специфического гуморального иммунного ответа против вируса кори. Инфекция и иммунитет, 2013, 3, № 3, 243–250. [Топтыгина А. П., Мамаева Т. А., Алиошкин В. А. Peculiarities of specific humoral measles immune response. *Russian Journal of Infection and Immunity* 2013, 3, 3, 243–250.]
5. *Erdman D., Heath J. L., Watson J. C., Markowitz L. E., Bellini W.* Immunoglobulin M antibody response to measles virus following primary and secondary vaccination and natural virus infection. *J. Med. Virol* 1993, 41, 44–48.
6. Мамаева Т. А., Липская Г. Ю., Наумова М. А., Шульга С. В., Mulders M., Featherstone D. A., Завьялова Л. А., Чернышова Е. В., Замятина Е. П., Кузнецова Н. Н. Особенности лабораторной диагностики кори у больных с разным прививочным анамнезом. *Вопр. Вирусол.* 2012, 5, 21–26. [Мамаева Т. А., Липская Г. Ю., Наумова М. А., Шульга С. В., Mulders M., Featherstone D. A., Zavyalova L. A., Chernyshova E. V., Zamyatina E. P., Kuznetsova N. N. Peculiarity of the laboratory diagnostic of the measles virus infection in previously vaccinated and unvaccinated patients. *Problems of virology* 2012, 5, 21–26.]
7. Топтыгина А. П., Алешкин В. А. Сопоставление первичного и вторичного гуморального иммунного ответа на вакцинацию «Приорикс». *Инфекция и иммунитет* 2013, 3, 4, 359–364. [Топтыгина А. П., Алиошкин В. А. Comparison of the primary and secondary humoral immune response to vaccination Priorix. *Russian Journal of Infection and Immunity* 2013, 3, 4, 359–364.]
8. Топтыгина А. П., Пухальский А. Л., Алиошкин В. А. IgG subclass profile of antimeasles response in vaccinated children and adults with measles history. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2005, 12, 7, 845–847.
9. Топтыгина А. П., Семикина Е. Л., Копыльцова Е. А., Алешкин В. А. Возрастные особенности формирования гуморального звена иммунного ответа у детей. *Медицинская Иммунология* 2012, 14, 4–5, 289–294. [Топтыгина А. П., Семикина Е. Л., Копыльцова Е. А., Алиошкин В. А. Age-dependent features of

- evolving humoral immunity in children. *Med. Immunol.* 2012, 14, 4–5, 289–294].
10. *Топтыгина А. П., Пухальский А. Л., Мамаева Т. А., Алешкин В. А.* Спектр субклассов противокоревых иммуноглобулинов G у лиц, перенесших корь. *Бюлл. exper. биол.* 2004, 137, 3, 293–295. [*Toptygina A. P., A. L. Pukhalsky, T. A. Mamaeva, and V. A. Aleishkin.* Measles virus-specific IgG subclass in early and late infections. *Bull Exp Biol* 2004, 137, 293–295].
 11. *Erlenhöfer C., Wurzer W. J., Löffler S., Schneider-Schaulies S., ter Meulen V., Schneider-Schaulies J.* CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J. Virol.* 2001, 75, 4499–4505.
 12. *Qi H., Cannons J. L., Klauschen F., Schwartzberg P. L., Germain R. N.* SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal center formation *Nature* 2008, 455, 764–769.

DYNAMICS OF SYNTHESIS AND CIRCULATION OF SUBCLASSES SPECIFIC IgG IN THE IMMUNE RESPONSE TO THE VACCINE AGAINST MEASLES, RUBELLA, MUMPS

© 2019 A. P. Toptygina*, T. A. Mamaeva

*E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Received: 20.09.2018. **Accepted:** 21.01.2019

The aim of the study was to investigate the dynamics of synthesis and circulation of subclasses of specific IgG in the immune response to the Priorix and development of parameters for the separation of primary and secondary types of immune response. The material of the study was the serum samples of children vaccinated against measles, rubella and mumps with Priorix received in 3 weeks after inoculation – 24 children (group 1), in 4 weeks after inoculation – other 26 children (group 2), in 6 weeks – also other 25 children (group 3), 1 year after vaccination – 38 children from the first three groups (group 4), after 5 years (before revaccination) – 24 children from the fourth group (group 5). In the serum samples, the specific IgG antibodies and the spectrum of their subclasses against measles, rubella and mumps viruses were studied using the enzyme immunoassay. It was shown that at the beginning of the immune response to all three viruses, IgG3 subclass antibodies were formed, but the rate of growth and switching to a predominantly IgG1-type immune response was different. Cut off was calculated for the antibodies of subclasses IgG1 and IgG3, which were 46.84% and 42.8% for measles virus, respectively; for rubella viruses 62.67% and 12.63% respectively; for the mumps virus 54.97% and 37.26% respectively. The cut off values obtained make it possible to separate the primary and secondary immune response by the ratio of the antibody subclasses. The importance of the developed approach to the separation of early and late type immune response in vaccinated was confirmed in an independent group of vaccinated children: 16 people 4 weeks after inoculation and 15 children one year after vaccination Priorix, as well as in the study of antibodies in serum from patients with measles adults (14 not previously vaccinated patients and 15 vaccinated in childhood patients).

Key words: measles, rubella, mumps, immune response, IgG subclasses, vaccination

Authors:

Toptygina A. P., ✉ PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cytokines, G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.

125212 Moscow, Admirala Makarova ul., 10, G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology. Phone: +7(495)4521801 (off.), +7(916)3896604 (mob.). **E-mail:** toptyginaanna@rambler.ru.

Mamaeva T. A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА, ИНДУЦИРОВАННОГО «GMDP-ОБРАЗНЕСУЩИМ» ПЕПТИДОМ RN: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ С МУРАМИЛПЕПТИДАМИ

© 2019 г. Л. Г. Алексеева^{1*}, Е. А. Мещерякова¹, А. Г. Ламан²,
Т. М. Андропова³, В. Т. Иванов¹

*E-mail: luda.alekseeva@mail.ru

¹ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

²ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Пушкино, Московская область, Россия;

³АО «ПЕПТЕК», Москва, Россия

Поступила: 14.01.2019. Принята: 25.01.2019

Для изучения механизма действия пептидного миметика мурамилпептида GMDP RN оценивалось его влияние на уровень экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α и молекул, принимающих участие в активации NF- κ B сигнального пути, в клетках линии лейкоцитарных моноцитов человека THP-1. Для сравнения были использованы собственно GMDP и два его аналога с хорошо охарактеризованной биологической активностью – GMDP-кислота и GMDP-Lys. Все соединения демонстрировали значительные отличия в ходе развития иммунного ответа: наиболее сильным стимулятором иммунного ответа оказался GMDP-Lys; GMDP-кислота в большей степени усиливала экспрессию субъединицы p100/p52 (NF- κ B2) и в меньшей степени экспрессию IL-1 β по сравнению с GMDP; особенностями пептида RN являлись низкий уровень продукции IL-1 β и стимуляция адапторного белка RIP2 для рецептора NOD2 врожденного иммунитета. Все исследованные соединения являются ценными инструментами для поиска новых способов коррекции иммунного ответа.

Ключевые слова: мурамилпептиды, рецепторы NOD2 и TLR4, NF- κ B

DOI: 10.31857/S102872210005025-2

Адрес: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ИБХ РАН, Алексеева Людмила Геннадьевна,
Тел. 7 (495) 335-61-77.

E-mail: luda.alekseeva@mail.ru

Авторы:

Алексеева Л. Г., к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории химии пептидов ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

Мещерякова Е. А., к.х.н., научный сотрудник лаборатории химии пептидов ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

Ламан А. Г., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН Филиала Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Пушкино, Московская область, Россия;

Андропова Т. М., к.х.н., президент компании АО «Пептек», Москва, Россия;

Иванов В. Т., д.х.н., академик, заведующий лабораторией химии пептидов ФГБУН Института биоорганической хи-

мии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с современными представлениями врожденный иммунитет млекопитающих служит не только передовой линией защиты организма от патогенных микроорганизмов [1], но также необходим для поддержания нормального гомеостаза тканей [2] и распознавания сигналов от поврежденных клеток [3]. Нарушения иммунного ответа сопровождаются возникновением инфекционных [4], онкологических [5] и аутоиммунных [6] заболеваний.

К настоящему времени установлено, что клетки иммунной системы «узнают» определенные фрагменты инфекционных агентов с помо-

щью семейств мембранных TLR [7] и лектинов С-типа [8], а также внутриклеточных NLR белков [9] и RigI-хеликаз [10]. Основные бактериальные PAMPs (от англ. pathogen-associated molecular patterns) включают липополисахарид (LPS, лиганд TLR4) [11], фрагменты пептидогликана клеточной стенки (TLR2) [12], пептиды FPR1-3 [13], содержащие характерные для прокариотов остатки N-формилметионина, и метилированную ДНК (TLR9) [14].

NOD1 и NOD2, два наиболее изученных рецептора из семейства NLR, распознают низкомолекулярные фрагменты пептидогликана клеточной стенки бактерий – соответственно, γ -D-глутамил-мезо-диаминопимелиновую кислоту (iE-DAP) [15] и мурамилдипептид (MDP), а также его дисахаридсодержащий аналог глюкозаминилмурамилдипептид (GMDP) [16]. При распознавании лиганда NOD1 и NOD2 олигомеризуются и взаимодействуют с RIP2, что приводит к активации канонических NF- κ B и MAPK сигнальных путей [17, 18].

В Институте биоорганической химии более 30 лет проводятся исследования фрагментов пептидогликана клеточных стенок бактерий – GMDP и ряда его аналогов, способных эффективно модулировать иммунный статус [19]. Их структура служит отличным объектом для химических модификаций и изучения структурно-функциональных взаимоотношений как с целью получения более эффективных препаратов, так и использования их в качестве инструментов для изучения механизмов иммунного ответа.

Мурамилпептид GMDP нашёл применение в медицине (лекарственный препарат Ликопид®) и ветеринарии (препарат Гликопин®) как иммунокорректор и адъювант.

Пептидный миметик GMDP, получивший название RN-пептид, был найден с помощью высокоспецифичных моноклональных антител против GMDP и пептидных комбинаторных библиотек в формате фагового дисплея [20]. Пептид RN обладал адъювантной активностью, сходной с адъювантной активностью GMDP, но не проявлял присущего GMDP пирогенного эффекта. Для углублённого исследования механизма действия данного пептида в настоящей работе мы оценивали его влияние на уровень экспрессии мРНК ряда провоспалительных и рецепторных молекул в клеточной линии лейкоцитарных моноцитов человека THP-1. Для сравнения были использованы собственно GMDP и два его аналога с хорошо охарак-

теризованной биологической активностью – GMDP-кислота и GMDP-Lys.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

GMDP и GMDP-кислота предоставлены ЗАО «Пептек», Россия; GMDP-Lys и пептид RN синтезированы в лаборатории химии пептидов ИБХ РАН.

Клетки

Работа выполнена на клеточной линии лейкоцитарных моноцитов человека THP-1, полученной из коллекции Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия. Клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной фетальной сыворотки, при 37 °C и 5% CO₂.

Для проведения эксперимента клетки внесли в лунки 12-луночного планшета в концентрации 2 × 10⁶ клеток в 3 мл среды на лунку. К клеткам добавляли GMDP, GMDP-кислоту, GMDP-Lys или пептид RN в концентрации 1, 10 или 100 мкг/мл и инкубировали клетки в течение 2 ч.

ПЦР

Выделение тотальной РНК из клеток проводили реагентом TRIzol® (Invitrogen, США) по протоколу фирмы-производителя.

Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием фермента Mint («Евроген», Россия) и поли(Т) праймера по стандартному протоколу фирмы-производителя.

Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере CX96 (BioRad, США). Реакционная смесь объёмом 12,5 мкл содержала: 1 мкг кДНК, 2,5 мкл готовой 5-кратной реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия), в которую входят Taq ДНК полимеразы со специфическими моноклональными антителами, краситель SYBR Green I, смесь нуклеотидтрифосфатов, MgCl₂, ПЦР буфер, и по 10 пМ каждого из двух специфичных олигонуклеотидов.

Протокол амплификации включал: 1 цикл продолжительностью 4 мин денатурации при 94 °C, 40 циклов: по 20 сек при 94 °C для денатурации цепей ДНК, 20 сек при 60 °C для отжига праймеров с матрицей) и 40 сек при 72 °C для синтеза комплиментарных цепей ДНК, и 1 цикл завершающего синтеза в течение 3 мин при 72 °C. Расчёт относительного уровня мРНК целевых генов был выполнен с использованием deltaCT-

метода [21]. Относительная концентрация субстрата была нормализована по усреднённым данным амплификации двух эндогенных генов сравнения – HPRT1 и B2M: $\text{deltaCT} = \text{CT}(\text{target gene}) - \text{CT}(\text{reference gene})$, где CT – количество циклов, требуемых для достижения порогового значения флуоресценции. Относительный уровень мРНК вычисляли как $x \cdot \text{delta CT}$, где x – эффективность праймеров [22]. Все реакции проводили в двух повторностях и включали негативный контроль без обратной транскриптазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что основное отличие биологического действия пептида RN от продуктов микробного происхождения, каким является GMDP, заключается в отсутствии пирогенного эффекта [23]. При этом RN-пептид обладал сравнимыми с GMDP адьювантными свойствами и способностью стимулировать экспрессию молекул МНС II класса на перитонеальных макрофагах мышей. Максимальный адьювантный эффект для пептида RN наблюдался в дозе 10 мкг на животное, в то время как GMDP в аналогичных условиях обладал более низкой активностью и эквивалентные значения индексов стимуляции достигались при 100 мкг GMDP на мышшь.

Что касается гликопептидов, модификация молекулы GMDP влияла на адьювантную и пирогенную активности полученных соединений [24]. Так, удлинение пептидной части GMDP на остаток лизина усиливало и пирогенные, и адьювантные свойства. Замена остатка изо-глутамина на остаток глутаминовой кислоты приводила к ис-

чезновению пирогенного эффекта и сохранению адьювантных свойств. Кроме того, для апиогенной GMDP-кислоты индексы стимуляции при всех исследованных концентрациях были больше, чем для GMDP.

В той же работе Мещеряковой Е. А. с соавторами [24] была изучена способность GMDP и его аналогов влиять на продукцию IL-1 перитонеальными макрофагами, которая оценивалась по индексу стимуляции реакции бласттрансформации тимоцитов в присутствии фитогемагглютина. Стимуляция гликопептидами продукции IL-1 *in vitro* была характерна только для соединений, обладающих адьювантным действием *in vivo*; наибольший эффект был обнаружен для GMDP-Lys.

В данной работе свойства пептида RN и мурамилпептидов изучали *in vitro* на клеточной линии лейкемических моноцитов человека THP-1. Клетки выдерживали в течение 2 ч в присутствии указанных соединений, взятых в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл, и далее оценивали изменение экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов и молекул, принимающих участие в активации NF- κ B пути. Специфические олигонуклеотиды, используемые для амплификации фрагментов целевых молекул, приведены в **таблице 1**.

Поскольку продукция провоспалительных цитокинов является одной из основных характеристик воспалительного ответа, на первоначальном этапе мы оценивали экспрессию мРНК IL-1 β и TNF- α . Как и ожидалось, среди всех изученных соединений в наибольшей степени стимулировал продукцию провоспалительных

Таблица 1. Синтетические олигонуклеотиды

HPRT1	cctgctggattacatcaaacgactg	tccaacactctcgtgggtcct
B2M	atgagtatgcctgccgtgtg	ccaaatgcggcatcttcaaac
IL-1 β	acagtggcaatgaggatg	tgtagtgggtcggaga
TNF- α	atgagcactgaaagcatgatc	tcacagggcaatgatcccaagtagacctgcc
NOD2	caatgtcaccacagagttgtagtc	ggcacctcaagtgacattttgc
RIP2	ccattgagatttcgcatcct	atgcgccactttgataaac
TLR4	acagaagctgggtggctgtg	tctttaaagtcacctggttg
MyD88	ttgaggaggattgccaagaag	ggggtcatcaagtggtg
p105/p50	cagcagatggcccatcctt	ttgcagatttgacctgagggt
p100/p52	acacgtaccgacagacaacc	ttccttcacctgtgctgg
NLRP3	cttctctgataggcccaag	gcagcaactggaaaggaag

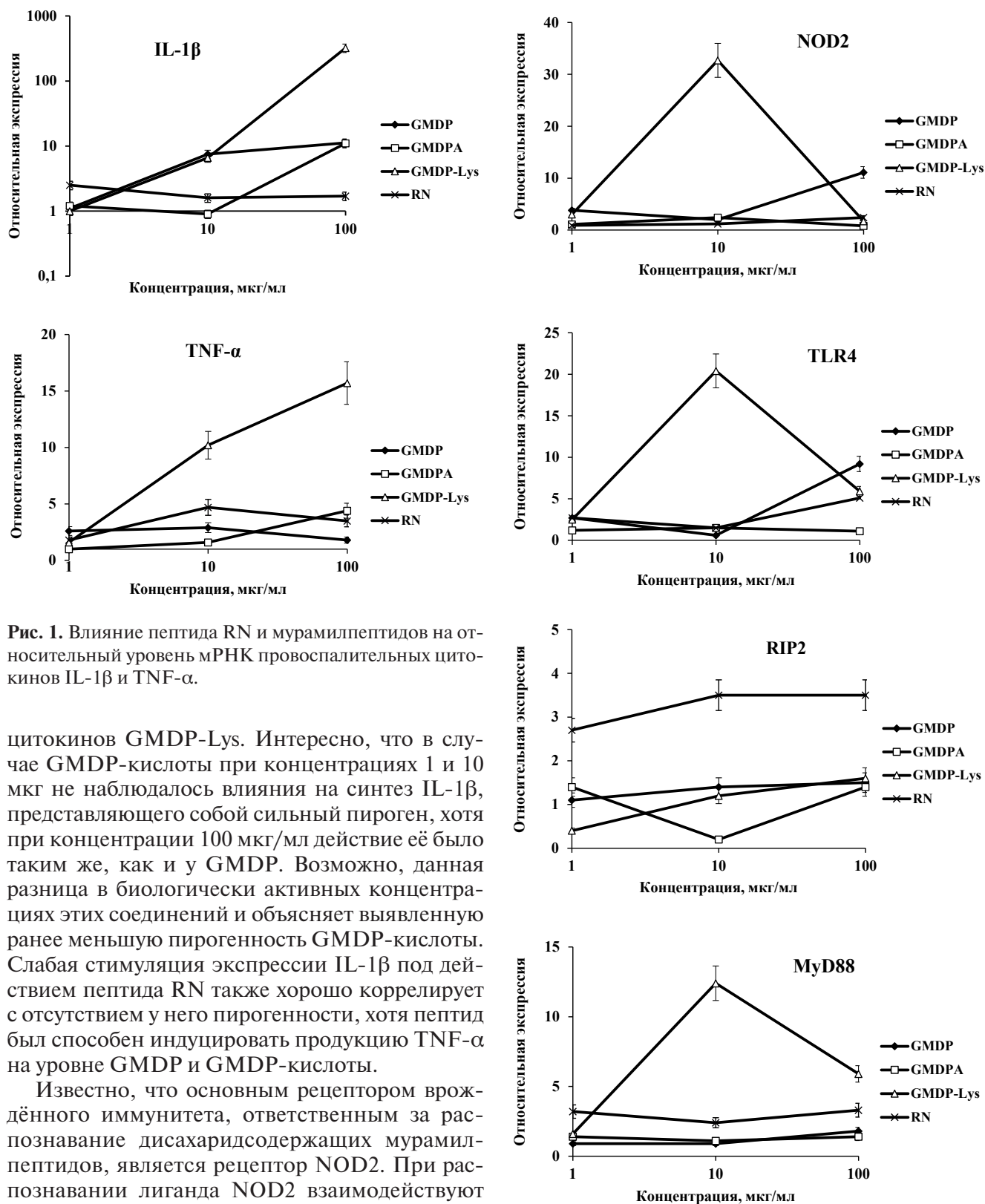


Рис. 1. Влияние пептида RN и мурамилпептидов на относительный уровень мРНК провоспалительных цитокинов IL-1β и TNF-α.

цитокинов GMDP-Lys. Интересно, что в случае GMDP-кислоты при концентрациях 1 и 10 мкг не наблюдалось влияния на синтез IL-1β, представляющего собой сильный пироген, хотя при концентрации 100 мкг/мл действие её было таким же, как и у GMDP. Возможно, данная разница в биологически активных концентрациях этих соединений и объясняет выявленную ранее меньшую пирогенность GMDP-кислоты. Слабая стимуляция экспрессии IL-1β под действием пептида RN также хорошо коррелирует с отсутствием у него пирогенности, хотя пептид был способен индуцировать продукцию TNF-α на уровне GMDP и GMDP-кислоты.

Известно, что основным рецептором врождённого иммунитета, ответственным за распознавание дисахаридсодержащих мурамилпептидов, является рецептор NOD2. При распознавании лиганда NOD2 взаимодействуют с адапторным белком RIP2, что приводит к активации NF-κB сигнального пути [17, 18]. Так как врождённый иммунитет представляет собой систему взаимосвязанных рецепторов, в данной работе мы анализировали также мРНК рецеп-

Рис. 2. Влияние пептида RN и мурамилпептидов на относительный уровень мРНК рецепторов врождённого иммунитета NOD2 и TLR4 и их адапторных молекул RIP2 и MYD88.

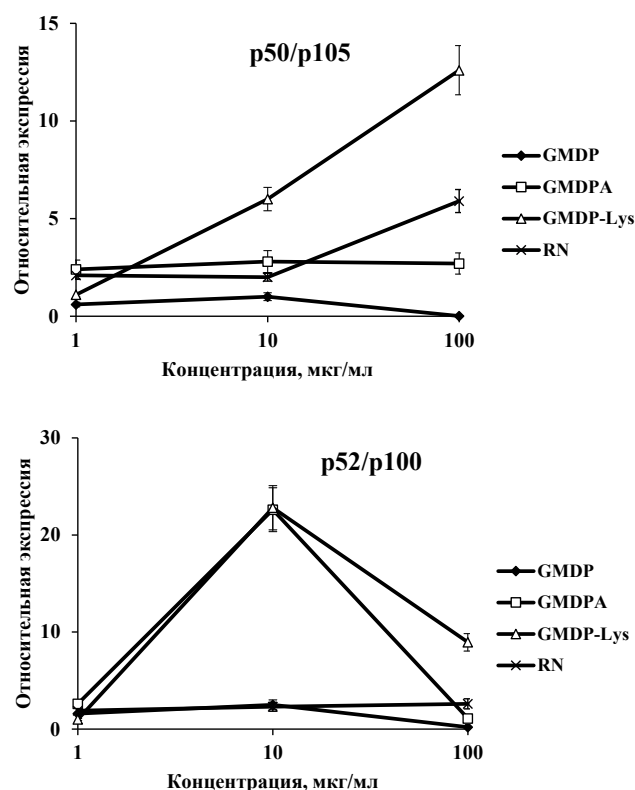


Рис. 3. Влияние пептида RN и мурамилпептидов на относительный уровень мРНК субъединиц p105/p50 (NF-kB1) и p100/p52 (NF-kB2) транскрипционного комплекса NF-kB.

тора TLR4 (лиганд LPS), демонстрирующего совместно с NOD2 ярко выраженный синергический эффект [25], а также мРНК одного из его белков-адапторов MyD88. Ранее с использованием клеточной линии макрофагов мыши J774 мы показали, что GMDP и LPS взаимнообразно влияют на экспрессию своих рецепторов и их белков-адапторов, причём особенно значительными были стимулирующие эффекты от LPS на экспрессию NOD2 и от GMDP на MyD88 [26].

Максимальное содержание мРНК NOD2, TLR4 и MyD88 под действием GMDP-Lys хорошо коррелирует с данными по экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов; максимальный эффект наблюдался при концентрации 10 мкг/мл. Далее заметный эффект на NOD2 и TLR4 оказывал GMDP, но уже в концентрации 100 мкг/мл. Наиболее сильное отличие действия пептида RN проявилось при увеличении продукции RIP2, в то время как мурамилпептиды на неё не влияли. Примерно такие же индексы стимуляции от пептида RN во всём диапазоне концентраций были обнаруже-

ны для молекулы MyD88. Таким образом, возможный механизм действия пептида RN связан с активацией непосредственно адапторных молекул в обход NOD2-рецептора, чем и объясняется разница биологической активности данного пептида и мурамилпептидов.

Значительная разница в действии изученных соединений наблюдалась при анализе относительного содержания мРНК субъединиц p105/p50 (NF-kB1) и p100/p52 (NF-kB2) транскрипционного комплекса NF-kB. Если продукция молекулы p105/p50 максимально усиливалась под действием GMDP-Lys и пептида RN, то на продукцию молекулы p100/p52 в первую очередь влияли уже GMDP-Lys и GMDP-кислота. Поскольку комплекс фактора транскрипции NF-kB состоит из пяти субъединиц, работающих в виде димеров и способных формировать соответственно пятнадцать различных пар с привлечением дополнительных кофакторных молекул [27], полученные результаты могут отражать один из уровней тонкой регуляции формирующегося иммунного ответа.

Наконец, последняя из исследованных молекул – белок NLRP3, NOD-подобный рецептор семейства NALP, основной компонент для формирования инфламмасом. Данный белок вовлечён в активацию каспаз, что приводит к внутриклеточному процессингу и образованию зрелой активной формы IL-1 β и IL-18. Такой криопириновый тип инфламмасом может активироваться при взаимодействии с разнообразными лигандами, в их число входят и мурамилпептиды [28]. Самым сильным стимулятором мРНК NLRP3 оказался GMDP в отличие от GMDP-Lys, пептид RN в данном случае проявлял среднюю активность.

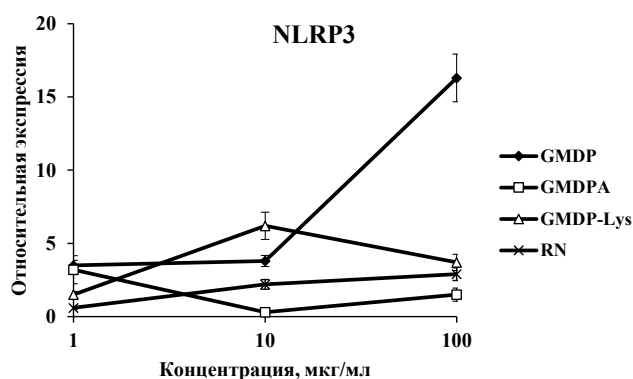


Рис. 4. Влияние пептида RN и мурамилпептидов на относительный уровень мРНК рецептора NLRP3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты настоящей работы демонстрируют значительные отличия в ходе инициации и развития иммунного ответа как в ряду самих мурамилпептидов, так и между мурамилпептидами и «отражающим образ GMDP» пептидным миметиком RN. На примере исследованных соединений показаны широкие возможности для поиска новых способов коррекции иммунного ответа, индуцируемого системой врождённого иммунитета, и подходов к лечению заболеваний различной этиологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов 13-04-02008а и 16-04-01152а и АО «Пептек».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Grubbs H., Whitten R. A.* Physiology, Active Immunity. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL) 2018.
2. *Belkaid Y., Harrison O. J.* Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* 2017, 46(4), 562–576.
3. *Yang, Han. Z., Oppenheim J. J.* Alarms and immunity. *Immunol Rev.* 2017, 280(1), 41–56.
4. *Tang J., Wu Z. Y., Dai R. J., Ma J., Gong G. Z.* Hepatitis B virus-persistent infection and innate immunity defect: Cell-related or virus-related? *World J. Clin. Cases* 2018, 6(9), 233–241.
5. *Man S. M.* Inflammasomes in the gastrointestinal tract: infection, cancer and gut microbiota homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol. Hepatol.* 2018, 15(12), 721–737.
6. *McGonagle D., Wataad A., Savic S.* Novel immunological based classification of rheumatoid arthritis with therapeutic implications. *Autoimmun. Rev.* 2018, 17(11), 1115–1123.
7. *Ozinsky A., Smith K. D., Hume D., Underhill D. M.* Cooperative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res.* 2000, 6(5), 393–396.
8. *Patin E. C., Orr S. J., Schaible U. E.* Macrophage inducible C-Type Lectin as a multifunctional player in immunity. *Front. Immunol.* 2017, 8, 861.
9. *Elinav E., Strowig T., Henao-Mejia J., Flavell R. A.* Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity* 2011, 34, 665–679.
10. *Liu Y., Olganier D., Lin R.* Host and Viral Modulation of RIG-I-Mediated Antiviral Immunity. *Front. Immunol.* 2017, 7, 662.
11. *Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M. Y., Van H. C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998, 282, 2085–2088.
12. *Dziarski R.* Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. *Cell Mol. Life Sci.* 2003, 60(9), 1793–804.
13. *Panaro M. A., Acquafredda A., Sisto M., Lisi S., Maffione A. B., Mitolo V.* Biological role of the N-formyl peptide receptors. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2006, 28, 103–127.
14. *Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000, 408, 740–745.
15. *Girardin S. E., Boneca I. G., Carneiro L. A., Antignac A., Jehanno M., Viala J., Tedin K., Labigne A., Zahringer U., Coyle A. J., DiStefano P. S., Bertin J., Sansonetti P. J., Philpott D. J.* Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003, 300, 1584–1587.
16. *Girardin S. E., Boneca I. G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., Philpott D. J., Sansonetti P. J.* Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 8869–8872.
17. *Barnich N., Aguirre J. E., Reinecker H. C., Xavier R., Podolsky D. K.* Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J. Cell Biol.* 2005, 170, 21–26.
18. *Chen G., Shaw M. H., Kim Y. G., Nuñez G.* NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu. Rev. Pathol.* 2009, 4, 365–98.
19. *Ростовцева Л. И., Андропова Т. М., Малькова В. П., Сорокина И. Б., Иванов В. Т.* Синтез и противопухоловое действие гликопептидов, содержащих N-ацетилглюкозаминил-(β 1 \rightarrow 4)-N-ацетилмурамил-дисахаридное звено. *Биоорг. химия* 1981, 7(12), 1843–1858. [*Rostovtseva L. I., Andronova T. M., Mal'kova V. P., Sorokina I. B., Ivanov V. T.* Synthesis and antitumor activity of glycopeptides containing N-acetylglucosaminyl-(β 1 \rightarrow 4)-N-acetylmuramyl disaccharide unit, *Bioorg. Khim* 1981, 7(12), 1843–1858.]
20. *Ламан А. Г., Шепеляковская А. О., Бозиев Х. М., Савинов Г. В., Бровко Ф. А., Несмеянов В. А.* Метод получения адьювантно активных пептидов – миметиков GMDP с использованием моноклональных антител и комбинаторных библиотек пептидов в формате фагового дисплея. *Биоорг. химия* 2010, 36(2), 170–177. [*Laman A. G., Shepeliakovskaya A. O., Bozиеv Kh. M., Savinov G. V., Brovko F. A., Nesmeianov V. A.* A method for the preparation of adjuvant peptide mimetics of GMDP with the use of monoclonal antibodies and combinatorial libraries of peptides in the format of phage display. *Bioorg. Khim.* 2010, 36(2), 170–177.]
21. *Livak K. J., Schmittgen T. D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001, 25(4), 402–408.
22. *Pfaffl M. W.* A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29(9), e45.

23. Laman A. G., Shepelyakovskaya A. O., Bozjev Kh. M., Savinov G. V., Baidakova L. K., Chulin A. N., Chulina I. A., Korpela T., Nesmeyanov V. A., Brovko F. A. Structural modification effects on bioactivities of the novel 15-mer peptide adjuvant. *Vaccine* 2011, 29(44), 7779–7784.
24. Мещерякова Е. А., Гурьянова С. В., Макаров Е. А., Андроннова Т. М., Иванов В. Т. Структурно-функциональное исследование глюкозаминилмураоилпептидов. Влияние химической модификации N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмураоилпептида на его иммуномодулирующие свойства *in vivo* и *in vitro*. *Биоорганическая химия* 1991, 17(9), 1157–1165. [Meshcheryakova E. A., Guryanova S. V., Makarov E. A., Andronova T. M., Ivanov V. T. Structure-function investigation of glucosaminylmuramylpeptides. Influence of chemical modification of the N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl dipeptide (GMDP) on its immunomodulatory properties *in vivo* and *in vitro*. *Bioorg. Khim.* 1991, 17(9), 1157–1165.]
25. Fritz J. H., Girardin S. E., Fitting C., Werts C., Mengin-Lecreulx D., Caroff M., Cavillon J. M., Philpott D. J., Adib-Conquy M. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.* 2005, 35(8), 2459–2470.
26. Мещерякова Е. А., Алексеева Л. Г., Андроннова Т. М. Роль мурамилпептидов в клеточной модели воспалительного иммунного ответа, *Российский иммунологический журнал*, 2015, 9(18), 3, 301–323. [Meshcheryakova E. A., Alekseeva L. G., Andronova T. M. The role of muramylpeptides in cellular model of inflammatory immune response. *Russian J. Immunol.* 2015, 9(18), 3, 301–323.]
27. Concetti J., Wilson C. L. NFkB1 and Cancer: Friend or Foe? *Cells* 2018, 7(9), pii: E133.
28. Martinon F., Agostini L., Meylan E., Tschopp J. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr. Biol.* 2004, 14(21), 1929–1934.

CHARACTERISTICS OF IMMUNE RESPONSE INDUCED BY GMDP PEPTIDE MIMETIC RN: A COMPARATIVE ANALYSIS WITH MURAMYLPEPTIDES

© 2019 L. G. Alekseeva^{1*}, E. A. Meshcheryakova¹, A. G. Laman², T. M. Andronova³, V. T. Ivanov¹

*E-mail: luda.alekseeva@mail.ru

¹M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia;

²Branch of M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Pushchino, Moscow region, Russia;

³Joint-Stock Company "PEPTEK", Moscow, Russia

Received: 14.01.2019. Accepted: 25.01.2019

To study the mechanism of action of the GMDP peptide mimetic RN, its effect on the expression level of mRNA of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α and some molecules involved in the activation of the NF- κ B signaling pathway in human leukemic monocyte cells THP-1 was evaluated. For comparison, GMDP itself and its two analogues with well-characterized biological activity, GMDP-acid and GMDP-Lys, were used. All compounds demonstrated significant differences during the development of the immune response: GMDP-Lys turned out to be the strongest stimulator of the immune response; GMDP-acid to a greater extent enhanced the expression of the p100/p52 subunit (NF- κ B2) and to a lesser extent the expression of IL-1 β in comparison with GMDP; the peculiarities of peptide RN response were low level of IL-1 β production and stimulation of the adapter protein RIP2 of innate immunity NOD2 receptor. All compounds studied are valuable tools for finding new ways for immune response correction.

Key words: muramylpeptides, NOD2 and TLR4 receptors, NF- κ B

Authors:

Alekseeva L. G., Ph.D., senior researcher, Laboratory of Peptide Chemistry, Moscow, Russia.

117997, Russia, Moscow, Miklukho-Maklaya ul., 16/10, M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences. Tel: 7 (495) 335-61-77. E-mail: luda.alekseeva@mail.ru;

Meshcheryakova E. A., Ph.D., researcher, Laboratory of Peptide Chemistry, M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia;

Laman A. G., senior researcher, Laboratory of Immunochemistry, Branch of M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Pushchino, Moscow region, Russia;

Andronova T. M., Ph.D., president of Closed Stock Joint Company «Peptek», Moscow, Russia;

Ivanov V. T., academician, Leader of Laboratory of Peptide Chemistry, M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

ЮБИЛЕЙ АКАДЕМИКА АРЕГА АРТЕМОВИЧА ТОТОЛЯНА



Тотолян Арег Артемович родился 27 декабря 1958 года в г. Ереване Республики Армения. С 1964 года постоянно живет в Санкт-Петербурге (Ленинграде). В 1975 году закончил среднюю школу № 113 г. Ленинграда и поступил в Первый Ленинградский медицинский институт им. акад. И. П. Павлова (ныне – Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова). В 1981 году по специальности «лечебное дело» окончил 1-й Ленинградский медицинский институт, в котором после учебы в клинической ординатуре и аспирантуре проработал (с 1986 г) заведующим лабораторией клинической иммунологии и (с 2000 г) директором научно-методического центра МЗ РФ по молекулярной медицине.

Со студенческих лет посвятил свою научную деятельность иммунологии. В 1987 г. защитил кандидатскую, а в 1997 г. – докторскую диссер-

тацию. В 2003 г. присвоено звание профессора. В 2011 году избран членом-корреспондентом Российской академии медицинских наук, в 2014 году стал членом-корреспондентом Российской академии наук, а в 2016 году избран академиком РАН.

С 2008 перешел на работу в Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, где работал заместителем директора по научной работе и заведующим лабораторией молекулярной иммунологии; с 2016 года по настоящее время – директор института. С 2016 года член Совета директоров международной ассоциации Пастеровских институтов. Основную научную работу совмещает с преподавательской деятельностью в Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. акад. И. П. Павлова заведующим курсом клинической иммунологии (2013–2015 гг.) и заведующим кафедрой иммунологии (с 2015 года).

Вся научная работа академика А. А. Тотолыана, как и его диссертационные исследования, связаны исключительно с иммунологией. Он широко известен как авторитетный ученый в области клинической иммунологии и в том числе иммунологии инфекционных болезней и их осложнений. Фундаментальные и клинические исследования по инфекционной иммунологии заняли значительное место в исследованиях А. А. Тотолыана особенно после его стажировки в Istituto Superiore di Sanita (Рим, Италия) в 1993–1995 г.г.

Основными направлениями научной деятельности являются: разработка подходов и методологии лабораторной иммунологической диагностики социально-значимых заболеваний на основе последних достижений фундаментальной иммунологии, современных иммунохимических и молекулярно-генетических технологий. В его трудах нашли комплексное отражение вопросы фундаментальной, клинической и инфекционной иммунологии: роль цитокинов и хемокинов

в патогенезе, диагностике и терапии инфекционных, аллергических, онкологических и аутоиммунных заболеваний, методология лабораторной диагностики и проведения иммунокорректирующей терапии иммунопатологических состояний. Впервые в стране под его руководством были разработаны и с 2002 года внедрены в «Федеральную систему внешней оценки качества клинических лабораторных исследований» специализированные иммунологические программы.

Автор и соавтор более 480 научных работ, в том числе 6 монографий, 15 глав в монографиях и руководствах, 10 справочников, 14 свидетельств на изобретения и патентов. Академик А. А. Тотолян – руководитель и консультант 2 докторских и 28 кандидатских диссертаций.

В соответствии с решением Комитета по науке и высшей школы Правительства Санкт-Петербурга, возглавляемый академиком А. А. Тотоляном научный коллектив в 2013 году официально зарегистрирован как научная школа в области «Медицинская иммунология» и «Клиническая лабораторная диагностика», и включен в Реестр ведущих научных и научно-педагогических школ Санкт-Петербурга. В июле 2013 года «За выдающиеся достижения в области иммунологии» он награжден Золотой медалью РНОИ (Российского научного общества иммунологов).

В 2017 году награжден памятной медалью Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «95 лет ГосСанЭпидСлужбе».

С 2009 года А. А. Тотолян – заместитель главного внештатного аллерголога-иммунолога, а с 2015 года – главный внештатный аллерголог-иммунолог Комитета по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга; главный редактор журнала «Инфекция и иммунитет», заместитель главного редактора журнала «Медицинская иммунология», член редколлегий ведущих российских журналов иммунологического и молекулярно-биологического профиля, член Президиумов Правления Российского научного общества иммунологов и Российского научного общества по лабораторной диагностике, заместитель председателя (с 1997 г.) и председатель (с 2017 г.) Правления Санкт-Петербургского регионального отделения Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов.

Президиум Российского научного общества иммунологов, редколлегия Российского иммунологического журнала сердечно поздравляет Арега Артемовича с юбилеем!

Желает ему здоровья, больших успехов в научной и творческой деятельности!!!

 Авторский указатель

А		Л	
Абросимов А. Ю.	24	Ламан А. Г.	86
Аклеев А. А.	13	Лобанов И. С.	69
Алексеева Л. Г.	86	М	
Андропова Т. М.	86	Мамаева Т. А.	78
Антонов А. В.	44	Маркелова Е. В.	62
Б		Медведовская А. Д.	5
Белоусов П. В.	24	Мещерякова Е. А.	86
Блинова Е. А.	13	Москаленко Д. А.	69
Боголюбова А. В.	24	Мун С. А.	44
Быкова Н. А.	31	Н	
В		Недоспасов С. А.	5
Вафин И. А.	44	Нестерова И. В.	53
Вержбицкая Н. Е.	44	Новоселова О. М.	69
Высоких М. Ю.	5	П	
Г		Поленок Е. Г.	44
Глушков А. Н.	44	Прахова Л. Н.	69
Гордеева Л. А.	44	Р	
Горшкова Е. А.	5	Романюк Д. С.	31
Губернаторова Е. О.	5	Рубаник К. С.	69
Д		С	
Двинских Н. Ю.	24	Селиванова Л. С.	24
Долгушин И. И.	13	Серебрякова М. К.	69
Друцкая М. С.	5	Силаев А. А.	62
Е		Старов Д. О.	69
Ефимов Г. А.	31	Т	
Ж		Тимченко Б. А.	69
Жданова О. Л.	62	Топтыгина А. П.	78
И		Ф	
Иванов В. Т.	86	Филькин С. Ю.	31
Ильвес А. Г.	69	Х	
К		Хильдебрандт Т. Б.	5
Козичук Я. В.	69	Хольце С.	5
Костянко М. В.	44	Ч	
Кудрявцев И. В.	69	Чудилова Г. А.	53
Купраш Д. В.	24	Ш	
Кучмий А. А.	31	Шитиков С. А.	31
		Шкорик Е. В.	62

