

ЦИТОКИНЫ И

воспаление

Том 15, № 2, 2016

Cytokines and Inflammation, vol. 15, № 2, 2016

Новая лекарственная форма интерферона гамма

Полиморфизмы промоторов генов и уровень IL-4, IL-6, IL-10 и TNF

Цитокины врожденного иммунитета в патогенезе рассеянного склероза

Цитокиновая регуляция при гельминтозах

Замершая беременность

Мелиоидоз: рекомбинантные цитокины и пептиды в экстренной профилактике

Иммунокоррекция и цитокины в стоматологии

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS ----- 120

ОБЗОРЫ • REVIEWS

Цитокины в патогенезе рассеянного склероза
Часть I. Цитокины врожденного иммунитета ----- 121

*Железникова Г.Ф., Скрипченко Н.В.,
Алексеева Л.А., Скрипченко Е.Ю.*

Cytokines in the pathogenesis of multiple sclerosis
Part I. Cytokines of innate immunity
*Zheleznikova G.F., Skripchenko N.V.,
Alekseeva L.A., Skripchenko E.Y.*

Эпителиальные клетки женского репродуктивного тракта
как компонент врожденной иммунной системы ----- 133

*Щербakov В.И., Рябиченко Т.И., Скосырева Г.А.,
Трунов А.Н., Трунова Л.А.*

Epithelial cells of the female reproductive tract
as a component of the innate immune system
*Shcherbakov V.I., Ryabichenko T.I., Skosyрева G.A.,
Trunov A.N., Trunova L.A.*

Роль цитокинов Т-хелперов в патогенезе туберкулеза ----- 140

*Тарабаева А.С., Ракишева А.С., Абилябаева А.А.,
Омельяненко С.М., Ли В.В.*

The role of helper T cell cytokines in the tuberculosis pathogenesis
*Tarabayeva A.S., Rakisheva A.S., Abilbayeva A.A.,
Otelyanenko S.M., Li V.V.*

Особенности цитокиновой регуляции иммунного ответа
при гельминтозах ----- 148

*Серебреникова С.Н., Семинский И.Ж., Куприянова Н.Ю.,
Гузовская Е.В., Семенов Н.В.*

Cytokine regulation of immune response at helminthiasis
*Serebrennikova S.N., Seminsky I.J., Kupriyanova N.Y.,
Guzovskaya E.V., Semenov N.V.*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ • ORIGINAL ARTICLES

Новая лекарственная форма интерферона гамма для лечения
патологий костной ткани ----- 154

*Даниленко Е.Д., Иванова О.С., Лебедев Л.Р., Волосникова Е.А.,
Рябчикова Е.И., Зонов Е.В., Богрянцева М.П., Левагина Г.М.*

The new dosage form of interferon gamma
for the treatment of bone pathologies
*Danilenko E.D., Ivanova O.S., Lebedev L.R., Volosnikova E.A.,
Ryabchikova E.I., Zonov E.V., Bogryantseva M.P., Levagina G.M.*

- Действие митогенов на дифференцировку клеток ТНР-1 и экспрессию TLR/RLR-генов** ----- 161
Полосков В.В., Соколова З.А., Бурова О.С., Шувалов А.Н., Соколова Т.М.
The effect of mitogens on the differentiation of THP-1 cells and the expression of TLR/RLR genes
Poloskov V.V., Sokolova Z.A., Burova O.S., Shuvalov A.N., Sokolova T.M.
- ССР6-позитивные Т-хелперы периферической крови при рассеянном склерозе**----- 166
Кудрявцев И.В., Ильвес А.Г., Борисов А.Г., Минеев К.К., Петров А.М., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Столяров И.Д.
ССР6-positive T helper subsets of peripheral blood in multiple sclerosis
Kudryavtsev I.V., Ilves A.G., Borisov A.G., Mineev K.K., Petrov A.M., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Stoliarov I.D.
- Клинико-иммунологическая оценка эффективности терапии острого Эпштейна — Барр мононуклеоза у детей школьного возраста** ----- 173
Тимченко В.Н., Калинина Н.М., Малиновская В.В., Баннова С.Л., Булина О.В., Назарова А.Н., Федорова А.В.
Clinical and immunological evaluation of the efficacy of acute Epstein — Barr mononucleosis therapy in school-age children
Timchenko V.N., Kalinina N.M., Malinovskaia V.V., Bannova S.L., Bulina O.V., Nazarova A.N., Fedorova A.V.
- Синтетические пептиды и рекомбинантные цитокины в схеме экстренной профилактики экспериментального мелиоидоза** ----- 181
Лебедева И.А., Топорков А.В., Жукова С.И., Ротов К.А., Снатенков Е.А.
Synthetic peptides and recombinant cytokines in the scheme of emergency prophylaxis of experimental melioidosis
Lebedeva I.A., Toporkov A.V., Zhukova S.I., Rotov K.A., Snatenkov E.A.
- Полиморфизмы промоторов генов IL4, IL6, IL10 и TNFA взаимосвязаны с уровнем цитокинов в сыворотке крови у больных сахарным диабетом 2-го типа** ----- 186
Климонтов В.В., Тяп Н.В., Шевченко А.В., Фазулина О.Н., Орлов Н.Б., Коненков В.И.
Polymorphisms in IL4, IL6, IL10 and TNFA gene promoters are related to serum levels of cytokines in type 2 diabetic patients
Klimontov V.V., Tyap N.V., Shevchenko A.V., Fazullina O.N., Orlov N.B., Konenkov V.I.
- Уровень внутриклеточных и сывороточных цитокинов у женщин с неразвивающейся беременностью до и после применения низкочастотного ультразвукового кавитационного орошения полости матки** ----- 192
Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Мелкозерова О.А., Погорелко Д.В., Газиева И.А.
The level of intracellular and serum cytokines in women with undeveloped pregnancy before and after the application of low-frequency ultrasonic cavitation irrigation of the uterine cavity
Chistyakova G.N., Remizova I.I., Melkozerova O.A., Pogorelko D.V., Gazieva I.A.
- Влияние локальной иммунокоррекции на цитокиновый профиль слюны при «закрытом» синус-лифтинге с одномоментной дентальной имплантацией** ----- 198
Долгушин И.И., Латюшина Л.С., Пиотрович А.В., Никушкина К.В.
Effect of local immunocorrection on saliva cytokine profile during the "closed" sinus lifting and simultaneous implantation
Dolgushin I.I., Latyushina L.S., Piotrovich A.V., Nikushkina K.V.

Иммуномодулятор трекрезан в лечении воспалительно-дегенеративных поражений мягких тканей пародонта ----- 204

Мокренко Е.В., Шабанов П.Д.

Immune modulator trekrezan in the treatment of inflammatory and degenerative damages of the smooth parodont tissues

Mokrenko E.V., Shabanov P.D.

Цитокиновая регуляция воспаления при бактериально-вирусной коинфекции в тканях пародонта при пародонтите и периодонтите ----- 212

Мудров В.П., Мяндиев М.С., Фоменков И.С., Иванов С.Ю., Лолокова Н.В., Нелюбин В.Н.

Cytokine regulation of inflammation and bacterial-viral co-infection in periodontal tissues with periodontitis

Mudrov V.P., Myandiev M.S., Fomenkov I.S., Ivanov S.Iu., Lolokova N.V., Nelyubin V.N.

НОВОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ • LABORATORY DIAGNOSTICS HIGHLIGHTS

ЗАО «БиоХимМак». Анализатор Form Plus — полная и быстрая оценка окислительного стресса ----- 158

Closed Joint-Stock Company "BioChemMak". Form Plus Analyzer — complete and fast assessment of oxidative stress

Редакционная коллегия:

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

П.Г. Назаров (Санкт-Петербург)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Зав. редакцией

О.Я. Михайлова

Перевод

О.В. Трусова

Оформление, компьютерная верстка

И.А. Варанкина

Обложка

М.С. Назарова

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

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

Журнал «Цитокины и воспаление» включен в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (по состоянию на 29.12.2015) (<http://vak.ed.gov.ru/>).

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

Подписка осуществляется:

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

Адрес редакции: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, тел. +7 (812) 234-29-29, тел./факс: +7 (812) 543-52-14.

E-mail: cytokines_inflammation@yahoo.com, cytokines@yandex.ru, pnazarov@PN4093.spb.edu

Подписано в печать 13.06.17. Бумага Lumisilk, chlorine free, StoraEnso, Oulu. Формат бумаги 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

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

Printed in Russia.

CCR6-позитивные Т-хелперы периферической крови при рассеянном склерозе

*И.В. Кудрявцев^{1,2,3}, А.Г. Ильвес⁵, А.Г. Борисов⁴, К.К. Минеев⁵,
А.М. Петров⁵, А.А. Савченко⁴, М.К. Серебрякова^{1,6}, И.Д. Столяров⁵*

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

²ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток;

³ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

⁴ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск;

⁵ФГБУН Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург;

⁶Университет ИТМО, Санкт-Петербург

С применением многоцветного цитометрического анализа проведено исследование экспрессии хемокиновых рецепторов (CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5) на Т-хелперах (Th) различного уровня дифференцировки, выявленных на основании CD45RA и CD62L, в группе условно здоровых доноров (n = 50) и больных рассеянным склерозом (n = 36). Среди CXCR5⁺ Th были выявлены три субпопуляции клеток, содержащих в своем составе Th17: CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ (Th17), CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺ (Th17 и Th22) и CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ (Th1/Th17). Относительное содержание Th с фенотипом CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺ у больных было повышено (p = 0,004), а Th1/Th17 — существенно снижено (p < 0,001) при сравнении с группой контроля. Содержание CCR6⁺ Th17 достоверно не отличалось от группы контроля в рамках Th с фенотипами CD45RA⁻CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁻, снижение уровня этих клеток в циркуляции у больных РС коррелировало с увеличением инвалидизации (r = -0,474 при p = 0,003 и r = -0,489 при p = 0,002, соответственно). Уровень Th17, коэкспрессировавших CCR6 и CCR4, был повышен у больных РС в рамках указанных выше субпопуляций Th (p = 0,011 и p = 0,003, соответственно), но не коррелировал с баллами EDSS. Относительное содержание Th1/Th17 с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁻ у больных РС было снижено почти в два (p < 0,001) и три (p < 0,001) раза по сравнению с группой контроля, соответственно. Проведение дискриминантного анализа и ROC-анализа показало высокую значимость определения уровня Th1/Th17 с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻ в периферической крови для клинической лабораторной диагностики. (Цитокины и воспаление. 2016. Т. 15. № 2. С. 166–172.)

Ключевые слова: проточная цитометрия, рассеянный склероз, Т-хелперы 17, CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻, Th1/Th17.

Рассеянный склероз (РС) — тяжелое заболевание центральной нервной системы, в развитии которого одну из ключевых ролей играют иммунопатологические процессы [4]. Долгое время считалось, что ведущую роль в патогенезе РС играют Т-хелперы 1-го типа (Th1), способные к продукции IFN γ , однако в последние годы появляет-

ся все больше работ, посвященных исследованию другой субпопуляции Т-клеток — Т-хелперов 17 (Th17), рассматриваемых в качестве одних из самых перспективных мишеней для терапии РС [17]. Th17 являются весьма гетерогенной популяцией клеток периферической крови. Помимо способности к продукции цитокинов семейства IL-17, они экспрессируют на своей поверхности хемокиновый рецептор CCR6 [5]. Кроме CCR6 на

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

мембране Th17 может присутствовать еще один хемокиновый рецептор — CXCR3. Это позволяет выявить клетки, способные к одновременной продукции IFN γ и IL-17, что является поводом для обозначения этой популяции как Th1/Th17. Большинство функциональных характеристик, свойственных Th17 (синтез IL-17A, экспрессия мРНК транскрипционного фактора, гомологичного ROR γ t мыши, и т. д.), присуще также клеткам с фенотипом CCR6⁺CCR4⁺.

Особый интерес при исследовании клиники РС представляет тот факт, что дифференцировка Th17 у человека находится под контролем таких провоспалительных цитокинов, как IL-1 β и IL-6 [5]. Уровень экспрессии этих цитокинов клетками, равно как и их содержание в сыворотке крови и спинно-мозговой жидкости больных РС, тесно связаны с тяжестью заболевания и его прогрессированием, что может рассматриваться в качестве одного из факторов дифференцировки Т-хелперов в Th17 [14]. С другой стороны, столь же существенную роль в формировании пула эффекторных Th17 играет IL-23, сывороточные концентрации которого у больных РС существенно превосходят таковые у условно здоровых доноров [8, 15]. С другой стороны, 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 [7]. Поэтому исследование Th17 при РС и, особенно, отдельных их субпопуляций представляется весьма актуальным как с точки зрения анализа причин возникновения данного заболевания, так и изучения механизмов его развития.

Материалы и методы

Объектом исследования служила венозная кровь условно здоровых доноров (n=50) и больных РС (n=36), полученная путем пункции кубитальной вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием КЗЭДТА. Группы больных РС и условно здоровых доноров достоверно не различались по полу и возрасту. Диагноз РС устанавливали согласно критериям МакДональда [13]. Тяжесть заболевания оценивали с помощью расширенной шкалы инвалидизации (EDSS), включающей балльную оценку состояния функциональных систем (зрительной, пирамидной, мозжечковой, чувствительной, функций тазовых органов, ствола мозга) и нарушений ходьбы [10].

Все исследования проводили в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями производителей антител. Для выявления Т-хелперов использовали антитела против CD3 (клон UCST1) и CD4 (клон 13B8.2), для разделения CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов на отдельные субпопуляции использовали антитела против CD45RA (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4)) и CD62L (клон DREG56) («Beckman Coul-

ter», США). Субпопуляция «наивных» (N) Т-хелперов обладала фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, клетки с фенотипами CD45RA⁻CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁻ соответствовали Т-хелперам центральной (CM) и эффекторной (EM) памяти, а «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные Т-хелперы (TEMRA) определяли как CD45RA⁺CD62L⁻, как это было описано ранее [3]. На всех указанных выше субпопуляциях CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов, находящихся на разных стадиях дифференцировки, при помощи моноклональных антител анализировали уровень экспрессии следующих хемокиновых рецепторов: CCR4 (CD194, клон L291H4), CCR6 (CD196, клон G034E3), CXCR3 (CD183, клон G025H7) и CXCR5 (CD185, клон J252D4) («Biollegend», США). Подбор оптимальных комбинаций антител и конъюгированных с ними флуорохромов производили на основании принципов, изложенных ранее [2]. Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse («Beckman Coulter», США), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution («Beckman Coulter», США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 330 g в течение 7 мин, после чего надосады удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2–7,4, содержащем 2% параформальдегида («Sigma-Aldrich», США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре «Navios™» («Beckman Coulter», США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ «Navios Software v.1.2» и «Kaluza™ v.1.3» («Beckman Coulter», США). Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения «Statistica 8.0» («StatSoft», США) и «GraphPad Prism 4.00 for Windows» («GraphPad Prism Software Inc.», США). Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона хи-квадрат. Результаты выражали в виде % позитивных клеток от искомой популяции, приводили в виде медианы и интерквартильного размаха (25%; 75%). Для оценки достоверности различий использовали непараметрический U-критерий Манна — Уитни, для исследования силы взаимосвязей показателей вычисляли коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Дискриминантный анализ проводили по методу Forward stepwise (Tolerance=0,010, F to enter=2,41, F to remove=0,00). Количество заданных шагов соответствовало количеству классифицируемых показателей. Также определяли линейные дискриминантные функции и их переменные. Для исследования значимости изменения относительного содержания различных клеточных субпопуляций периферической крови в клинической практике и выбора значения оптимальных параметров для разделения групп больных РС и условно здоровых доноров проводили анализ кривых операционной характеристики (ROC-анализ) и вычисляли площадь под кривой операционной характеристики (AUC).

Результаты и обсуждение

Наличие CCR6 (при отсутствии CXCR5 — основного маркера фолликулярных Т-хелперов) на поверхности клетки обычно связано со способно-

стью к продукции IL-17, поэтому CCR6⁺CXCR5⁻ Т-хелперы периферической крови рассматриваются в качестве Th17, которые являются весьма гетерогенной популяцией клеток [6]. В рамках проведенного исследования в периферической крови больных РС примерно 24,77% (21,03; 39,78) Т-хелперов экспрессировали CCR6, что не отличалось (p=0,236) от величин, полученных для контрольной группы, где CD6⁺CD4⁺CD3⁺ клетки составляли 31,41% (25,13; 37,23). При этом обнаружена корреляционная взаимосвязь между уровнем инвалидизации больных и содержанием CCR6⁺ Т-хелперов (r=0,359 при p=0,032).

На основании экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3, CXCR5, CCR4 и CCR6 были выявлены 16 различных субпопуляций Th. В рамках

использованной нами панели антител против хемокиновых рецепторов Th17 могут входить в состав клеточных популяций со следующими фенотипами: CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁻, CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺ (помимо Th17, в составе этой популяции находились Th22, экспрессирующие еще и CCR10), а также CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ лимфоциты, обладающие свойствами Th1 и Th17 и получившие название Th1/Th17.

Относительное содержание Th17 с фенотипом CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁻ у больных РС составляло 1,77% (1,30; 2,23) и достоверно не отличалось (p=0,349) от значения, полученного для группы сравнения (рис. 1, а), в рамках которой данная величина находилась в пределах 1,95% (1,48; 2,41). Вместе с тем, была отмечена корреляционная зависимость между увеличением степени инвалидизации больных РС и снижением уровня клеток данной популяции в периферической крови (r=-0,374 при p=0,025, рис. 2, а). Уровень CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺ Th в периферической крови больных РС достоверно (p=0,004) превышал значения, полученные для условно здоровых доноров (6,61% (5,09; 11,04) и 5,71% (4,26; 6,94), соответственно). Причем увеличение числа этих клеток в циркуляции коррелировало с результатами балльной расширенной шкалы инвалидизации (r=0,375 при p=0,024, рис. 2, б). В случае субпопуляции Th1/Th17 отмечено более чем двукратное снижение (p<0,001) относительного содержания этих клеток с 12,16% (7,85; 15,28) до 4,97% (3,91; 7,86), однако взаимосвязь с тяжестью заболевания, анализируемой на основании баллов шкалы EDSS, отмечена не была (r=-0,012 при p=0,945, рис. 2, в).

Следует отметить, что именно под действием IL-17 и IL-22, рецепторы для которых представлены на эндотелиальных клетках, входящих в состав гематоэнцефалического барьера, нарушается структура плотных контактов как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro* [9]. Более того, IL-17 и IL-22 способны усиливать направленную миграцию зрелых CD45R0⁺ Т-хелперов в условиях *ex vivo*, что может служить одним из механизмов инфильтрации лимфоцитами нервной ткани. Результаты анализа образцов биопсии тканей головного мозга больных РС показали, что ген, кодирующий IL-17A, экспрессируется в них на очень высоком уровне [11]. А при изучении очагов повреждения нервной ткани при помощи гибридизации *in situ* и методов иммуногистохимии были обнаружены скопления CD3-позитивных лимфоцитов, способных к экспрессии гена IL-17 и синтезу данного цитокина [16].

К направленной миграции в периферические ткани способны только строго определенные субпопуляции Т-клеток, утратившие молекулы «хоуминга» в лимфоидную ткань и обладающие эффекторными свойствами, к числу которых отно-

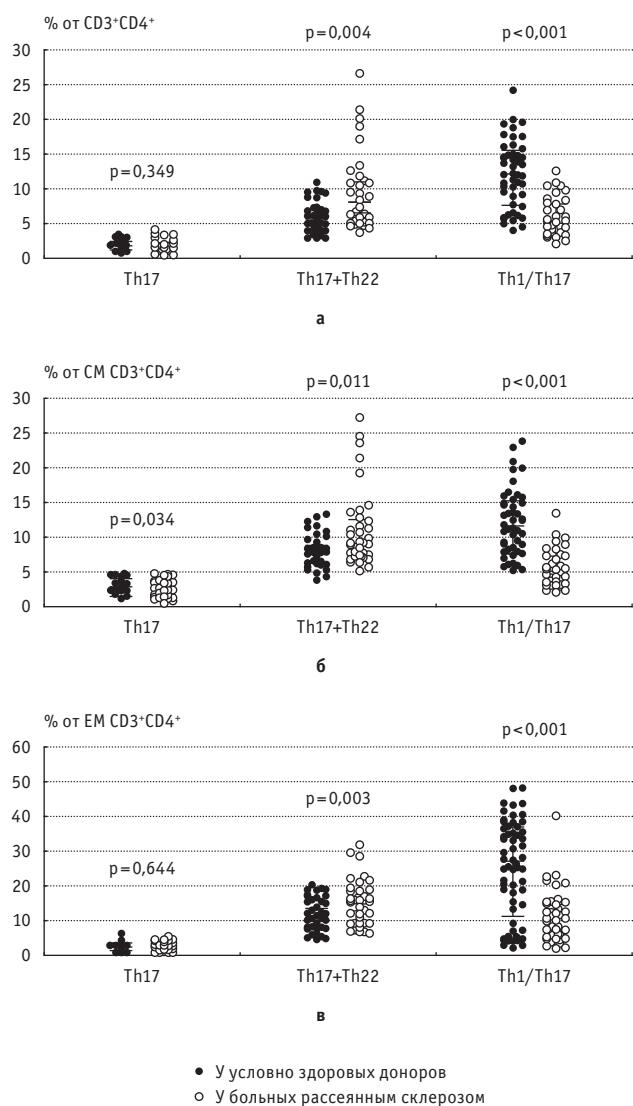


Рис. 1. Относительное содержание основных субпопуляций Th17 — CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁻ (Th17), CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺ (Th17+Th22) и CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ (Th1/Th17)

а — в рамках субпопуляций Т-хелперов; б — Т-хелперов центральной памяти; в — Т-хелперов эффекторной памяти. Черным — относительное содержание клеток указанных выше субпопуляций у условно здоровых доноров; белым — у больных рассеянным склерозом.

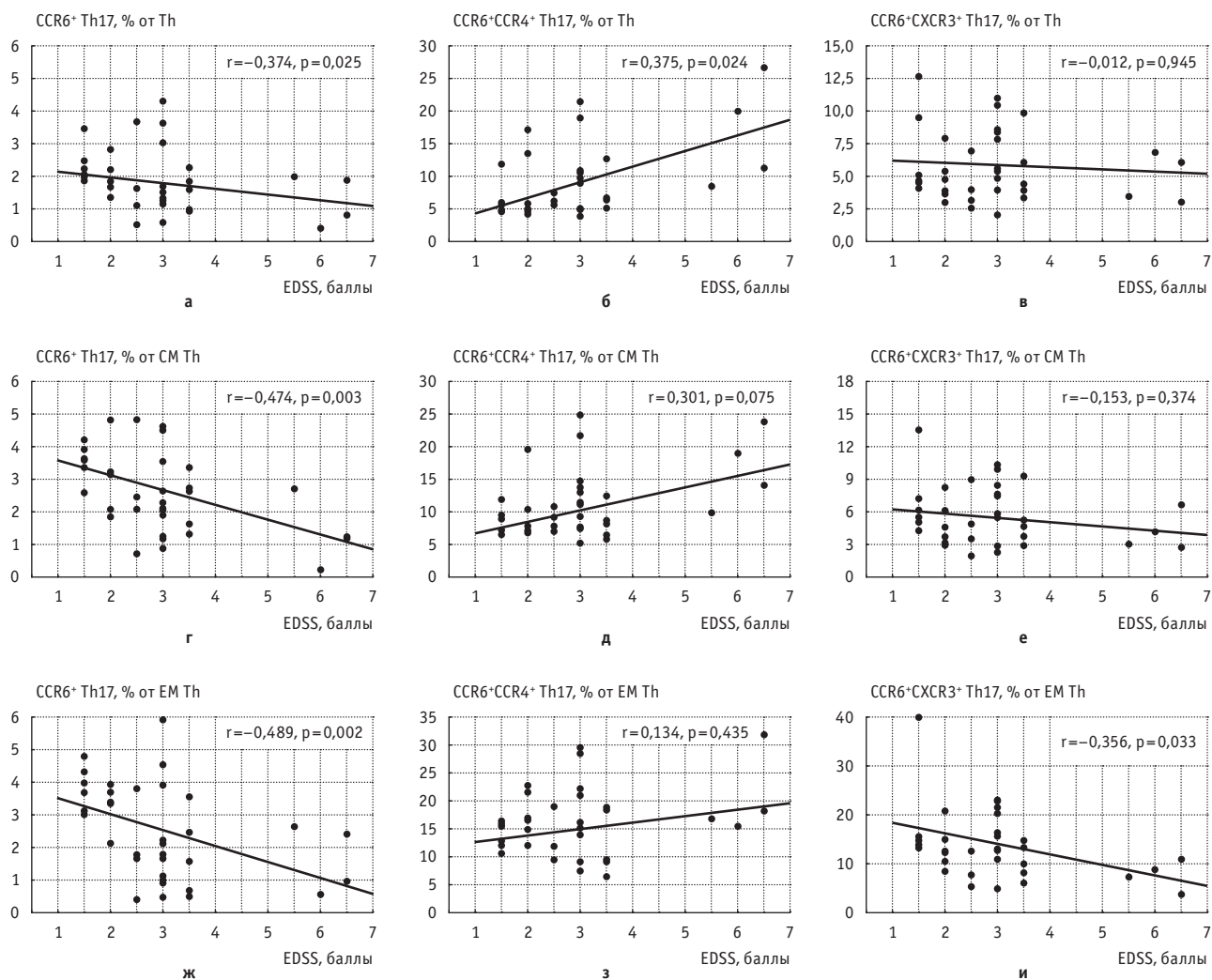


Рис. 2. Корреляционные взаимосвязи между относительным содержанием различных субпопуляций Th17 и тяжестью инвалидизации при рассеянном склерозе, анализируемой на основании баллов шкалы EDSS

сится, в первую очередь, способность к синтезу и секреции цитокинов [1]. Поэтому на основании экспрессии CD45RA, маркера «наивных» Т-хелперов, и CD62L, адгезионной молекулы, отвечающей за миграцию клеток в периферические лимфоидные органы, все Т-лимфоциты периферической крови были разделены на несколько популяций [3]. Были выявлены «наивные» CD3⁺CD4⁺ клетки с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, клетки центральной (СМ) и эффекторной памяти (ЕМ) с фенотипами CD45RA⁻CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁻, соответственно, а также «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные клетки эффекторной памяти (CD45RA⁺CD62L⁻). В рамках первой из упомянутых выше субпопуляций исследуемые нами хемокиновые рецепторы практически не встречаются, тогда как Th с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻ составляют не более 1% общего числа CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов периферической крови. Поэтому основное внимание было уделено популяциям СМ и ЕМ, в рамках которых

сосредоточены практически все цитокин-продуцирующие Th, а в последней присутствуют клетки, способные выселяться в периферические ткани. Показано, что у больных РС относительное содержание Th17 с фенотипом CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁻ среди клеток СМ находилось в пределах 2,60% (1,72; 3,45), что было достоверно ниже ($p = 0,034$, **рис 1, б**) значений группы условно здоровых доноров (2,95% (2,49; 3,98)). Причем была отмечена обратная зависимость между данным показателем и увеличением инвалидизации больных РС ($r = -0,474$ при $p = 0,003$, **рис. 2, г**). В случае Т-хелперов центральной памяти, коэкспрессирующих CCR6 и CCR4, отмечено достоверное ($p = 0,011$, см. **рис 1, б**) увеличение доли этих клеток до 9,15% (7,26; 12,60) у больных РС, тогда как в группе сравнения они составляли 8,09% (6,76; 8,83). Относительное содержание Th1/Th17 у больных РС снижалось почти в два раза ($p < 0,001$, см. **рис 1, б**): с 11,97% (8,64; 15,01) до 5,16% (3,34; 7,37). Однако корреляционных взаимосвязей

между содержанием CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺ и CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ СМТ-хелперов и инвалидизацией больных отмечено не было ($r=0,301$ при $p=0,075$ и $r=-0,153$ при $p=0,374$, а также **рис. 2, д и е**, соответственно.).

При анализе Th эффекторной памяти — клеток, мигрирующих в периферические ткани и обладающих выраженными эффекторными свойствами — показано (**рис. 1, в**), что содержание CCR6⁺ Th17 достоверно между группами не различалось (2,96% (1,34; 3,69) и 2,38% (1,21; 3,24), соответственно, при $p=0,643$). Вместе с тем, снижение уровня этих клеток в циркуляции у больных РС коррелировало с увеличением инвалидизации ($r=-0,489$ при $p=0,002$, **рис. 2, ж**). Однако относительное содержание субпопуляции Th, позитивной по CCR6 и CCR4, достоверно возрастало ($p=0,003$) у больных с РС до 16,01% (11,32; 18,35), тогда как у условно здоровых доноров эти клетки составляли 11,39% (9,31; 14,99) от CD45RA⁻CD62L⁻CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов периферической крови. У больных РС Т-хелперы с фенотипом Th1/Th17 составляли лишь 12,66% (8,59; 13,35), что было почти в три раза ниже ($p<0,001$) результатов, зарегистрированных для группы сравнения (33,31% (24,76; 38,28)). Более того, обнаружена обратная взаимосвязь между относительным содержанием этой популяции в периферической крови и степенью инвалидизации больных ($r=-0,356$ при $p=0,033$, **рис. 2, и**).

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении у больных РС относительного содержания CXCR5⁻CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺ Т-хелперов, способных к продукции IL-17 и IL-22. Это подтверждается данными литературы о приросте именно IL-22 в сыворотке крови и спинно-мозговой жидкости больных РС, а также наблюдениями о приросте IL-22⁺ Т-хелперов в периферической крови больных [12]. В рамках другого исследования также отмечалось увеличение содержания Th, способных отвечать продукцией IL-17 или IL-22, а также этих двух цитокинов одновременно, на стимуляцию IL-23 [8]. У этих же больных в периферической крови уровень клеток, синтезирующих IL-17 и IFN γ одновременно, достоверно

возрастал, причем клетки данной субпопуляции в условиях *in vitro* обладали высокой способностью к трансмиграции через эндотелий, входящий в состав гематоэнцефалического барьера. Результаты собственных исследований указывают на снижение клеток с фенотипом CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ (Th1/Th17), причем в случае Т-хелперов эффекторной памяти отмечена корреляционная взаимосвязь между снижением относительного содержания Th1/Th17 и инвалидизацией больных РС, что может быть связано с миграцией этих клеток в воспаленную ткань. Также следует упомянуть про наблюдения о том, что на мышинной модели экспериментального аллергического энцефаломиелита было показано преимущественное накопление клеток с фенотипом CD3⁺CD4⁺IL-17⁺IFN γ ⁺ в нервной системе [8]. Эти результаты подтверждались данными иммуногистохимических исследований о скоплении Т-клеток, синтезирующих одновременно IL-17 и IFN γ , в очагах повреждения нервной ткани у больных РС.

Для оценки иммунопатогенетической значимости Th17 в различных фракциях Т-хелперов у больных РС мы применяли дискриминантный анализ. В **таблице** представлены величины и статистическая значимость Уилксової λ (Wilks' — Lambda) и частичной λ (Partial — Lambda) Th1/Th17 в различных субпопуляциях Т-хелперов (соответствующие дискриминантные модели). Обнаружено, что в большинстве дискриминантных моделей, построенных для общей популяции Т-хелперов периферической крови, а также для клеток центральной и эффекторной памяти, относительное содержание клеток с фенотипом CXCR5⁻CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ занимает наиболее значимое положение. Исключением являются «наивные» Т-хелперы, в дискриминантную модель которых количество Th1/Th17 не вошло в силу отсутствия клеток, способных к экспрессии исследуемых хемокиновых рецепторов в рамках лимфоцитов данной субпопуляции [1]. Что же касается Т-хелперов с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻, то в периферической крови как больных РС, так и условно здоровых доноров относительное со-

Таблица

Значения и статистическая значимость Уилксової и частичной λ клеток с фенотипом Th1/Th17 в различных фракциях Т-хелперов (соответствующие дискриминантные модели)

Относительное содержание Th1/Th17	λ Уилкса	Частичная λ	p
% от CD3 ⁺ CD4 ⁺	0,526	0,733	<0,001
% от CD45RA ⁺ CD62L ⁺	Относительное содержание Th1/Th17 не вошло в число наиболее значимых показателей дискриминантной модели		
% от CD45RA ⁺ CD62L ⁻	0,565	0,566	<0,001
% от CD45RA ⁻ CD62L ⁻	0,582	0,586	<0,001
% от CD45RA ⁻ CD62L ⁺	0,463	0,610	<0,001

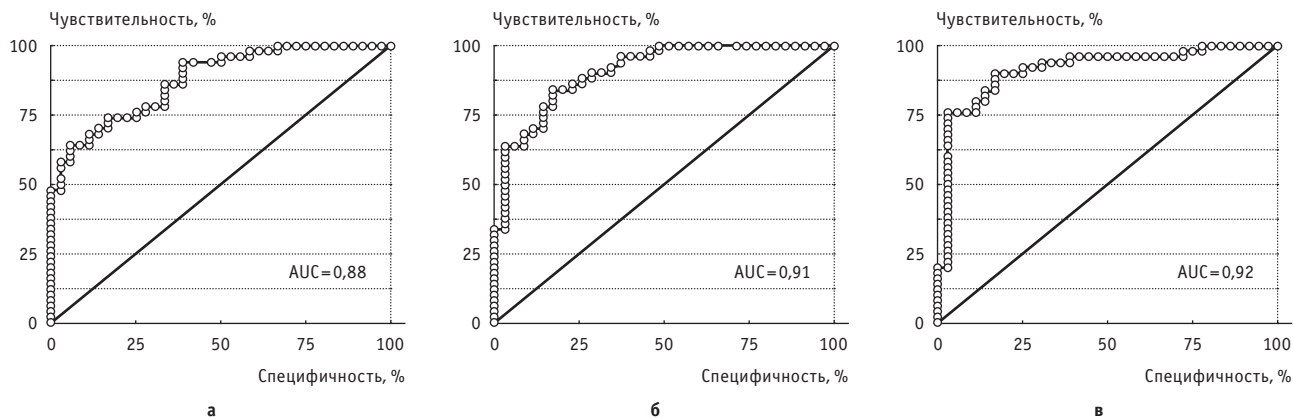


Рис. 3. ROC-кривые, характеризующие зависимость чувствительности и специфичности определения относительного содержания Т-хелперов с фенотипом $\text{CXCR5}^-\text{CXCR3}^+\text{CCR6}^+\text{CCR4}^-$

а — среди клеток с фенотипом $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$; б — Т-хелперов центральной памяти; в — Т-хелперов эффекторной памяти при сравнении больных рассеянным склерозом и условно здоровых доноров.

держание этих клеток не превышало 1,5–2%, что накладывает существенные ограничения на исследование данной популяции клеток в клинической практике [3].

Выявленные изменения субпопуляционного состава Th17 у больных РС позволили поставить вопрос о значимости определения этих клеточных субпопуляций в клинической практике с использованием ROC-анализа (рис. 3). Для исследуемых параметров AUC попадал в интервал 0,9–1,0, что на основании экспертной шкалы для определения AUC свидетельствует о высоком качестве предлагаемых параметров. Указанные значения не были достигнуты при анализе $\text{CXCR5}^-\text{CXCR3}^+\text{CCR6}^+\text{CCR4}^-$ Т-хелперов в рамках общей популяции клеток с фенотипом $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, когда AUC составил 0,88 (рис. 3, а). При этом снижение относительного содержания Th1/Th17 ниже 7,84%, принятого за пороговое значение, обладало чувствительностью 76% (61,83–86,94%) и специфичностью 75% (57,80–87,88%), а отношение вероятности получения конкретного результата теста у пациента с наличием заболевания к вероятности такого же результата в группе контроля (ОПП) составляет 3,04, что указывает на низкую диагностическую ценность данного показателя.

В рамках субпопуляции Т-хелперов центральной памяти при снижении относительного содержания $\text{CXCR5}^-\text{CXCR3}^+\text{CCR6}^+\text{CCR4}^-$ ниже 8,38%

(принятого за пороговое значение) чувствительность предлагаемого нами подхода определения РС составляет 76% (61,83–86,94%) при специфичности 86% (69,74–95,19%) и ОПП 5,32, что также свидетельствует о низкой диагностической ценности этого показателя (рис. 3, б). С другой стороны, определение относительного содержания Т-хелперов с фенотипом Th1/Th17 в рамках Т-клеток эффекторной памяти может служить более специфичным критерием для выявления пациентов с рассеянным склерозом (рис. 3, в). При снижении относительного содержания указанной субпопуляции ниже принятого за пороговое значения 22,9% от общего числа $\text{CD45RA}^-\text{CD62L}^-\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ клеток чувствительность предлагаемого нами подхода определения РС составляет те же самые 76% (61,83–86,94%) при специфичности уже 94,4% (81,34–99,32%). Более того, в этом случае отношение вероятности получения конкретного результата теста у пациента с рассеянным склерозом, к вероятности такого же результата в контрольной группе у условно здорового субъекта составляла 13,68, что может свидетельствовать о высокой значимости выбранного критерия для диагностических и прогностических целей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 1326) и ДВФУ (проект № 14-08-06-25_и).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Росс. иммунол. ж. 2014. Т. 8. № 4 (17). С. 947–964. Кудрявцев И.В. [Memory T cells: major populations and stages of differentiation] // Russ. J. Immunol. 2014. Vol. 8. № 4 (17). P. 947–964. Russian.
2. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа // Мед. иммунол. 2015. Т. 17. № 1. С. 19–26.

Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. [Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring] // Med. Immunol. (St.Petersburg). 2015. Vol. 17. № 1. P. 19–26. Russian.

3. Кудрявцев И.В., Савицкий В.П. Многоцветный анализ основных субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии // Росс. иммунол. ж. 2012. Т. 6. № 3 (1) (14). С. 94–97.

- Kudryavtsev I.V., Savitsky V.P.* [Multicolor flow cytometric analysis of main T-helper and cytotoxic T cell subsets] // *Russ. J. Immunol.* 2012. Vol. 6. № 3 (1) (14). P. 94–97. Russian.
4. *Столяров И.Д., Петров А.М., Вотинцева М.В., Ивашкова Е.В.* Нейроиммунология: теоретические и клинические аспекты // *Физиология человека.* 2013. Т. 39. № 1. С. 51–59.
Stolyarov I.D., Petrov A.M., Votintseva M.V., Ivashkova E.V. [Neuroimmunology: theoretical and clinical aspects] // *Human Physiology.* 2013. Vol. 39. № 1. P. 40–47. Russian.
 5. *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. Vol. 8. № 6. P. 639–646.
 6. *Annunziato F., Cosmi L., Santarlasci V., Maggi L., Liotta F., Mazzinghi B., Parente E., Fili L., Ferri S., Frosali F., Giudizi F., Romagnani P., Parronchi P., Tonelli F., Maggi E., Romagnani S.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells // *J. Exp. Med.* 2007. Vol. 204. № 8. P. 1849–1861.
 7. *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. Vol. 164. № 2. P. 76–80.
 8. *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. Vol. 66. № 3. P. 390–402.
 9. *Kebir H., Kreymborg K., Ifergan I., Dodelet-Devillers A., Cayrol R., Bernard M., Giuliani F., Arbour N., Becher B., Prat A.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation // *Nat. Med.* 2007. Vol. 13. № 10. P. 1173–1175.
 10. *Kurtzke J.F.* Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS) // *Neurology.* 1983. Vol. 33. № 11. P. 1444–1452.
 11. *Lock C., Hermans G., Pedotti R., Brendolan A., Schadt E., Garren H., Langer-Gould A., Strober S., Cannella B., Allard J., Klonowski P., Austin A., Lad N., Kaminski N., Galli S.J., Oksenberg J.R., Raine C.S., Heller R., Steinman L.* Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis // *Nat. Med.* 2002. Vol. 8. № 5. P. 500–508.
 12. *Perriard G., Mathias A., Enz L., Canales M., Schlupe M., Gentner M., Schaeren-Wiemers N., Du Pasquier R.A.* Interleukin-22 is increased in multiple sclerosis patients and targets astrocytes // *J. Neuroinflammation.* 2015. Vol. 12. P. 119. doi: 10.1186/s12974-015-0335-3.
 13. *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., Weinstenker B., Wolinsky J.S.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria // *Ann. Neurol.* 2011. Vol. 69. № 2. P. 292–302.
 14. *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. Vol. 243. № 7. P. 536–542.
 15. *Shajarian M., Alsahebhosoul F., Etemadifar M., Sedaghat N., Shahbazi M., Firouzabadi F.P., Dezashibi H.M.* IL-23 plasma level measurement in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) patients compared to healthy subjects // *Immunol. Invest.* 2015. Vol. 44. № 1. P. 36–44.
 16. *Tzartos J.S., Friese M.A., Craner M.J., Palace J., Newcombe J., Esiri M.M., Fugger L.* Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis // *Am. J. Pathol.* 2008. Vol. 172. № 1. P. 146–155.
 17. *Volpe E., Battistini L., Borsellino G.* Advances in T helper 17 cell biology: pathogenic role and potential therapy in multiple sclerosis // *Mediators Inflamm.* 2015. Vol. 2015;2015:475158. doi: 10.1155/2015/475158.

CCR6-positive T helper subsets of peripheral blood in multiple sclerosis

*I.V. Kudryavtsev^{1,2,3}, A.G. Ilves⁵, A.G. Borisov⁴, K.K. Mineev⁵,
A.M. Petrov⁵, A.A. Savchenko⁴, M.K. Serebriakova^{1,6}, I.D. Stoliarov⁵*

¹"Institute of Experimental Medicine", St. Petersburg;

²Far Eastern Federal University, Vladivostok;

³N.N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg;

⁴«Scientific Research Institute of Medical Problems of the North», Krasnoyarsk;

⁵N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg;

⁶ITMO University, St. Petersburg

Using multicolor flow cytometry the expression of chemokine receptors (CCR4, CCR6, CXCR3 and CXCR5) on T helpers (Th) at various levels of differentiation, identified on the basis of CD45RA and CD62L expression, in peripheral blood of healthy volunteers (HV, n=50) and patients with multiple sclerosis (MS, n=36) was studied. Among CXCR5⁺ Th, the subsets of Th17 cells were identified, these are CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ (Th17), CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺ (Th17 and Th22) and CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ (Th1/Th17). In MS group, the relative number of CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺ Th was increased (p=0.004), but the range of Th1/Th17 cells was significantly lower (p<0.001) than in HV group. The contents of CCR6⁺ Th17 in CD45RA⁺CD62L⁺ and CD45RA⁻CD62L⁻ subsets were similar in both group, but in MS group their relative number negatively correlated with EDSS score (r=-0.474 p=0.003 and r=-0.489 p=0.002, respectively). MS patients showed significantly higher levels of Th17 cells co-expressing CCR6 and CCR4 in central memory (CM) and effector memory (EM) subsets (p=0.011 and p=0.003, respectively) than healthy controls did. A significant decrease of CD45RA⁺CD62L⁺ and CD45RA⁻CD62L⁻ Th1/Th17 in two (p<0.001) and three (p<0.001) times, respectively, was observed in MS patients compared to healthy controls. The discriminant function analysis and ROC-analysis revealed the high clinical relevance of Th1/Th17 subset with CD45RA⁻CD62L⁻ phenotype in peripheral blood of MS patients. (*Cytokines and Inflammation.* 2016. Vol. 15. № 2. P. 166–172.)

Key words: flow cytometry, multiple sclerosis, Th17, CXCR3(+), CCR6(+), CCR4(-), Th1/Th17.