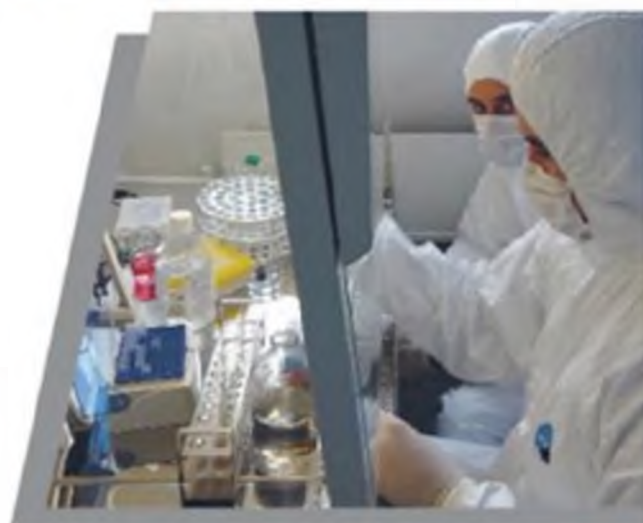


А. А. Савченко, Д. А. Кудлай, И. В. Кудрявцев,
Э. В. Каспаров, А. С. Головкин, А. П. Продеус,
А. Г. Борисов



ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ И КОРРЕКЦИИ ИММУНОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФИЦ КНЦ СО РАН
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКИХ
ПРОБЛЕМ СЕВЕРА

А. А. Савченко, Д. А. Кудлай, И. В. Кудрявцев, Э. В. Каспаров,
А. С. Головкин, А. П. Продеус, А. Г. Борисов

**ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ И
КОРРЕКЦИИ
ИММУНОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ
НАРУШЕНИЙ**

клиническая иммунология для практических врачей

Красноярск
2023

УДК 612.017.11
ББК 52.50 52.71
С 13

Технологии диагностики и коррекции иммунометаболических нарушений. Клиническая иммунология для практических врачей. / А. А. Савченко Д. А. Кудлай, И. В. Кудрявцев, Э. В. Каспаров, А. С. Головкин, А. П. Продеус, А. Г. Борисов – Красноярск: АС-КИТ, 2023. – 454 с.

ISBN 978-5-6050478-1-0

В настоящем издании обобщены современные данные о метаболических механизмах функционирования клеток иммунной системы при различных иммунопатологических состояниях. Описаны методы клинической и лабораторной диагностики иммунометаболических нарушений клеток иммунной системы. Особое внимание уделено методам иммунометаболической терапии.

Книга представляет интерес для иммунологов, но может быть полезна для широкого круга практикующих врачей различных специальностей, работающих в лечебных учреждениях, а также рекомендуется в качестве справочного пособия для студентов и аспирантов медицинских и биологических вузов.

Табл. 52.

Ил. 146.

Библиография.: 538 назв.

Р е ц е н з е н т ы

доктор медицинских наук, академик РАН Козлов В.А.,
доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН Симбирцев А.С.

Утверждено к печати Ученым советом
Научно-исследовательского института медицинских проблем
Севера ФИЦ КНЦ СО РАН

Без объявления

ISBN 978-5-6050478-1-0

© А. А. Савченко Д. А. Кудлай, И. В. Кудрявцев, Э. В.
Каспаров, А. С. Головкин, А. П. Продеус, А. Г. Борисов, 2023
© НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН,
2023

СОДЕРЖАНИЕ

Авторский коллектив		4
Список основных сокращений		5
Предисловие		8
Глава 1.	Компоненты иммунной системы	11
Глава 2.	Локальный иммунитет	69
Глава 3.	Системный воспалительный ответ	97
Глава 4.	Адаптивный иммунный ответ	106
Глава 5.	Общая структура метаболизма клетки	145
Глава 6.	Метаболизм клеток иммунной системы	170
Глава 7.	Метаболизм клеток иммунной системы при онкологических заболеваниях	188
Глава 8.	Метаболизм клеток иммунной системы при инфекциях	203
Глава 9.	Метаболизм клеток иммунной системы при аутоиммунных заболеваниях и аллергиях	228
Глава 10.	Клиническая диагностика иммунометаболических нарушений	240
Глава 11.	Лабораторная диагностика иммунометаболических нарушений	272
Глава 12.	Общие принципы лечения больных с иммунопатологией	342
Глава 13.	Коррекция нарушений метаболизма клеток	347
Глава 14.	Детоксикация в системе метаболической терапии	381
Глава 15.	Метаболическая регуляция клеток иммунной системы при клеточной терапии	390
Заключение		414
Список литературы		419

АВТОРСКИЙ КОЛЛЕКТИВ

Борисов Александр Геннадьевич, врач высшей категории, к. м. н., главный врач Института клинической иммунологии, ведущий научный сотрудник НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН.

Головкин Алексей Сергеевич, д. м. н., руководитель группы генно-клеточной инженерии Института молекулярной биологии и генетики НМИЦ им. В. А. Алмазова.

Каспаров Эдуард Вильямович, заслуженный врач Российской Федерации, д. м. н., профессор, директор НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН.

Кудлай Дмитрий Анатольевич, член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор кафедры фармакологии Института фармации ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), ведущий научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины и молекулярной иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

Кудрявцев Игорь Владимирович, к. б. н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», доцент кафедры иммунологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова.

Продеус Андрей Петрович, д. м. н., профессор, главный педиатр Детской городской клинической больницы № 9 им. Г. Н. Сперанского, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии Высшей медицинской школы, главный внештатный детский аллерголог-иммунолог Минздрава Московской области.

Савченко Андрей Анатольевич, д. м. н., профессор, заведующий лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН.

Список основных сокращений

25ОНD	— 25-гидроксивитамин D
ААМ	— альтернативно активированные макрофаги
АГ	— антигены
АД	— артериальное давление
АДК	— активированные дендритные клетки
АЗЩЖ	— аутоиммунные заболевания щитовидной железы
АДФ	— аденозиндифосфат
АИТ	— аутоиммунный тиреоидит
АК	— аденозинкиназа
АКК	— ацетил-КоА-карбоксилаза
АЛТ	— аланинаминотрансфераза
АМФ	— аденозинмонофосфат
АПК	— антигенпрезентирующие клетки
АРТ	— антиретровирусная терапия
АСТ	— аспаратаминотрансфераза
АТ	— антитела
АТкТПО	— концентрация антител к тиреоидной пероксидазе
АТФ	— аденозинтрифосфат
АФК	— активные формы кислорода
ацетил-КоА	— ацетил-коэнзим А
ВГВ	— вирусный гепатит В
ВИЧ	— вирус иммунодефицита человека
ГЗФДГ	— глицерол-3-фосфатдегидрогеназа
Г6Ф	— глюкозо-6-фосфат
Г6ФДГ	— глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГАЗФДГ	— глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
ГЛ	— гидролаза
ГР	— глутатионредуктаза
αГФДГ	— α-глицерофосфатдегидрогеназа
ДВС	— диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови
ДК	— дендритные клетки
ДТЗ	— диффузный токсический зоб
ЖКТ	— желудочно-кишечный тракт
ИВЛ	— искусственная вентиляция легких
ИМФ	— инозинмонофосфат
КД	— кетогенная диета
КОЕ	— колониеобразующие единицы
КПВО	— компенсаторный противовоспалительный ответ
КФК	— креатинфосфокиназа
ЛДГ	— лактатдегидрогеназа
ЛПВП	— липопротеиды высокой плотности
ЛПНП	— липопротеины низкой плотности
ЛПС	— липополисахариды
МАТ	— моноклональные антитела
МДГ	— малатдегидрогеназа
МРЛ	— мелкоклеточный рак легкого
МСК	— мезенхимальные стволовые клетки
НАД	— никотинамиддениндинуклеотид
НАДГДГ	— НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа
НАДИЦДГ	— НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа
НАДН	— никотинамиддениндинуклеотид восстановленный

НАД(Ф)	—	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НАДФГДГ	—	НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназа
НАДФИЦДГ	—	НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа
НАДФМДГ	—	НАДФ-зависимая декарбоксилирующая малатдегидрогеназа (малик-фермент)
НАДФН	—	никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
НДК	—	незрелые дендритные клетки
НКТ	—	5'-нуклеотидаза
НМРЛ	—	немелкоклеточный рак легкого
НСТ	—	нитросиний тетразолий
ОВГВ	—	острый вирусный гепатит В
ОГ	—	острый гайморит
ОРДС	—	острый респираторный дистресс-синдром
ОС	—	окислительный стресс
ПКР	—	плоскоклеточный рак легкого
ПНЖК	—	полиненасыщенные жирные кислоты
ПОЛ	—	перекисное окисление липидов
ПОН	—	полиорганная недостаточность
РГВИ	—	рецидивирующая герпесвирусная инфекция
ПЦР	—	полимеразная цепная реакция
РГП	—	распространенный гнойный перитонит
РП	—	рак почки
СДГ	—	сукцинатдегидрогеназа
СК	—	стволовые клетки
СККМ	—	стволовые клетки костного мозга
СОД	—	супероксиддисмутаза
СПОН	—	синдром полиорганной недостаточности
СРБ	—	С-реактивный белок
ССВО	—	синдром системного воспалительного ответа
ССЗ	—	сердечно-сосудистые заболевания
СЦК	—	средний цитохимический коэффициент
УДФ	—	уридин-5'-дифосфат
ФАД	—	флавинадениндинуклеотид
ФИ	—	фагоцитарный индекс
ФМН	—	флавиномононуклеотид
ФЧ	—	фагоцитарное число
ХГ	—	хронический гайморит
ЦНС	—	центральная нервная система
ЦКТ	—	цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса)
ЭГ	—	экстракорпоральная гемокоррекция
ЭПС	—	эндоплазматический ретикулум
ЭПС	—	эндоплазматическая сеть
ЭСК	—	эмбриональные стволовые клетки
АСЕ2	—	ангиотензинпревращающий фермент 2
ADA	—	аденозиндезаминаза
AhR	—	арильный углеводородный рецептор
ALR	—	отсутствующий в меланоме 2-подобный рецептор
АРЕ1	—	апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза
АРО	—	аполипопротеины
APRIL	—	лиганд, индуцирующий пролиферацию
ASK1	—	киназа, регулирующая сигнал к апоптозу, тип 1
BAFF	—	фактор активации В-клеток
BALT	—	бронхо-ассоциированная лимфоидная ткань
BCR	—	В-клеточный рецептор

Breg	— В-регуляторные клетки
CAR	— химерный рецептор антигена
CARS	— компенсаторный противовоспалительный ответ
CAT	— каталаза
CCI	— хроническое критическое заболевание
CLP	— прогенитор лимфоцитов
CLR	— лектиновые рецепторы C-типа
CMV	— цитомегаловирус
COVID-19	— новая коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2
COX2	— циклооксигеназа-2
CTMC	— тучные клетки соединительной ткани
DAMP	— молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями
EBV	— вирус Эпштейна–Барр
EC	— enzyme classification (классификация ферментов)
ECAR	— скорость внеклеточного ацидоза
EDN	— эозинофильный нейротоксин
EPO	— эозинофильная пероксидаза
ECP	— эозинофильный катионный белок
FABPs	— белки, связывающие жирные кислоты
FASN	— синтаза жирных кислот
GALT	— лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником
G-CSF	— гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
GM-CSF	— гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
GPx	— глутатионпероксидаза
GSH	— восстановленный глутатион
GSSG	— дисульфид глутатиона (окисленный глутатион)
GST	— глутатионтрансфераза
HIF	— фактор, индуцируемый гипоксией
HRSV	— респираторно-синцитиальный вирус человека
HSV	— вирус простого герпеса
IDO	— индоламин-2,3-диоксигеназа
IFN	— интерфероны
IL	— интерлейкины
ILC	— лимфоциты врожденного иммунитета
iNOS	— индуцибельная синтаза оксида азота
IRF-1	— регуляторный фактор интерферона 1
IRF5	— регуляторный фактор интерферона 5
KAR	— рецепторы активации киллеров
KIR	— иммуноглобулиноподобный рецептор киллерных клеток
Kyn	— кинурин
LC	— клетки Лангерганса
LRR	— белки с богатыми лейцином повторами
MAIT	— Т-лимфоциты, ассоциированные со слизистой оболочкой
MALT	— мукозо-ассоциированная лимфоидная ткань
MAPK	— митоген-активируемая протеинкиназа
MBP	— главный основной белок
MDSC	— миелоидные супрессорные клетки
MHC	— главный комплекс гистосовместимости
MIF	— фактор, ингибирующий миграцию макрофагов
MMC	— тучные клетки слизистой оболочки
MMP	— матриксные металлопротеиназы

MZ	—	маргинальная зона
NALT	—	лимфоидная ткань носоглотки
Nam	—	никотинамид
NamPRT	—	никотинамидфосфорибозилтрансфераза
NET	—	нейтрофильные внеклеточные ловушки
NF- κ B	—	транскрипционный ядерный фактор каппа В
NLR	—	NOD-подобные рецепторы
NLR	—	рецепторы, подобные домену олигомеризации нуклеотидов
NLRP3	—	цитозольный белок, Nod-подобный рецептор семейства NALP, содержащий пириновый домен
NMN	—	никотинамидмононуклеотид
NMNAT	—	NMN-аденилтрансфераза
NO	—	окись азота
NOD	—	домен олигомеризации нуклеотидов
NOS	—	синтаза оксида азота
NOX	—	никотинамидадениндинуклеотидфосфооксидаза
NR	—	никотинамидарибозид
OCR	—	скорость потребления кислорода
PAG	—	фосфат-активируемая глутаминаза
PAI	—	ингибитор активатора плазминогена
PAMP	—	патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
PGE2	—	простагландин E2
PI3K	—	фосфатидилинозитол-3-киназа
PICS	—	синдром стойкой иммуносупрессии и катаболизма
PKM2	—	изофермент пируваткиназы M2
PLP	—	пиридоксаль-5'-фосфат
PRM	—	рецепторы распознавания образов
PRR	—	рецепторы опознавания паттерна
PS	—	белок S
QD	—	квантовые точки
RIG-I	—	рецептор группы RIG-I-подобных рецепторов, фермент хеликаза
RLR	—	индуцируемые ретиноевой кислотой ген-I-подобные рецепторы
ROS	—	активные формы кислорода
SALT	—	лимфоидная ткань, ассоциированная с кожей
SCID	—	тяжелый комбинированный иммунодефицит
SiQD	—	квантовые точки кремния
SQD	—	квантовые точки серы
SIRPA	—	сигнальный регуляторный белок α
SIRS	—	синдром системного воспалительного ответа
SMAC	—	надмолекулярный активационный кластер
SR	—	рецепторы-мусорщики
SRC	—	запасная дыхательная способность
SREBP	—	белок (транскрипционный фактор), связывающий регуляторный элемент стерола
Srx	—	сульфиредоксин
STING	—	стимулятор генов интерферона
TAM	—	ассоциированные с опухолью макрофаги
TAP	—	транспортер, связанный с белковым комплексом процессинга антигена
TCA	—	цикл трикарбоновых кислот
TCR	—	T-клеточный рецептор

TDO	— триптофан-2,3-диоксигеназа
TLR	— Toll-подобные рецепторы
TME	— опухолевое микроокружение
TNF- α	— фактор некроза опухоли альфа
tPA	— тканевой активатор плазминогена
Treg	— регуляторные Т-лимфоциты
Trp	— триптофан
TRX	— тиоредоксин
TrxR	— тиоредоксинредуктаза
TSLP	— тимусный стромальный лимфопоэтин
TXNIP	— белок 1 тиоредоксиновой системы, активируемый витамином D3
VALT	— сосудисто-ассоциированная лимфоидная ткань
VDR	— рецептор витамина D
VEGF	— фактор роста эндотелия сосудов
α ГФДГ	— α -глицерофосфатдегидрогеназа (ФАД-зависимая)

ПРЕДИСЛОВИЕ

Иммунная система в связи с ее функциональными задачами участвует прямо или опосредованно в развитии практически всех физиологических и патологических процессов в организме человека. Без нормализации работы иммунной системы невозможно окончательное выздоровление больного. С дисфункцией иммунитета связано развитие инфекции, онкологии (особенно на фоне длительной вирусной репликации), аутоиммунной патологии, различных видов аллергий и других хронических форм заболеваний.

В основе развития иммунопатологических состояний и, как следствие, развития заболеваний ведущее значение принадлежит нарушениям со стороны метаболических процессов клеток иммунной системы.

Метаболизм клетки протекает не хаотично: он интегрирован и тонко настроен. Все превращения внутриклеточных веществ (энергетика, процессы синтеза и распада) взаимосвязаны, скоординированы и регулируются механизмами, придающими биохимическим процессам нужное направление. Поэтому в комплексном лечении больных с иммунными дисфункциями, помимо исключения этиологических факторов (если они выявлены), устранения патогенного агента, иммуноактивной терапии и детоксикации, обязательным условием является применение средств, улучшающих внутриклеточный метаболизм. Метаболическая терапия при лечении иммунопатологических состояний применяется достаточно часто, однако ее применение происходит без учета метаболических процессов, происходящих на уровне клеток иммунной системы. В то же время известно, что наиболее ранние признаки нарушений иммунного гомеостаза и перепрограммирования клеток иммунной системы следует искать на клеточном уровне, где начинается формирование ответных реакций на внешние воздействия, что в свою очередь позволяет составить представление о метаболической стратегии иммунного ответа, избранной организмом. В основе патогенеза ряда иммунопатологических состояний также лежат нарушения метаболизма и, соответственно, функции клеток иммунной системы.

В данной монографии мы попытались осветить те достижения изучения иммунометаболизма, которые необходимы для реализации задач клинической медицины, а также представили ключевые аспекты применения метаболической терапии.

Глава 1. Компоненты иммунной системы



Иммунная система — функционально взаимосвязанный комплекс органов, тканей, клеток, специфических белков и регуляторных компонентов, способный распознавать различные структуры, как чужеродные для себя, так и измененные свои с дальнейшей их нейтрализацией и уничтожением, с формированием невосприимчивости организма при их повторной встрече. Помимо этого, иммунная система контролирует пролиферацию клеток, процессы регенерации, осуществляет элиминацию и детоксикацию опасных для организма и разрушенных макро- и микромолекул и обеспечивает взаимодействие с нормальной микрофлорой которая также является одним из факторов защиты организма человека (рис. 1).

Суммарная масса органов и клеток иммунной системы составляет более 20 кг, в том числе 1,5–2 кг печени, около 9 кг кожи. Вес нормальной микрофлоры человека составляет от 2 до 5 кг.

Компоненты системы иммунитета входят во все ткани организма, поэтому, с одной стороны, изменения в системе иммунитета будут сказываться на функционировании одного или нескольких органов, а с другой — та или иная патология органов и систем будет влиять и на иммунитет.

Лимфоциты и макрофаги — основная популяция клеток иммунной системы, суммарная масса всех этих клеток составляет около 2 кг. Суммарное число порядка — 10^{13} , или каждая 10-я клетка человека.

С функциональной точки зрения определяют три уровня иммунитета: барьерный или мукозальный, он же местный, врожденный или неспецифический, адаптивный (приобретенный) или специфический иммунитет. Помимо этого, большое значение в защитных функциях принадлежит нормальной микрофлоре человека (рис. 2). С позиций функционально-структурной организации имеет смысл выделить органы, клетки и молекулы иммунной системы.

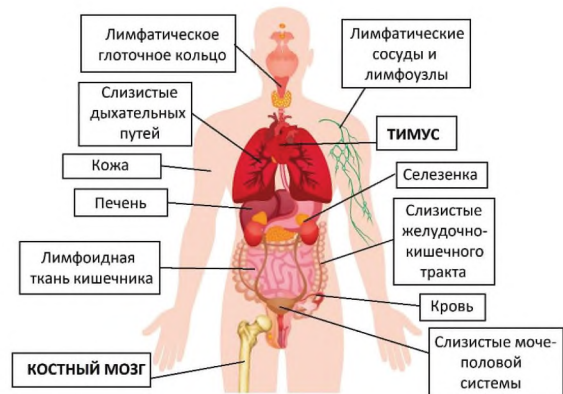


Рис. 1. Иммунная система человека



Рис. 2. Функциональная организация иммунной системы человека

Органы иммунной системы

Клетки и молекулы, участвующие в формировании иммунного ответа, наиболее эффективно действуют в составе специальных тканей и органов, объединенных в лимфоидную систему. Эта система представляет собой совокупность органов и рассеянных в организме других структурных лимфоидных образований, которые имеют между собой слабые анатомические связи, но объединены в единую систему кровеносными и лимфатическими сосудами и функционируют согласованно за счет иммунной регуляции. Выделяют первичные (центральные) и вторичные (периферические) лимфоидные органы. Отдельной структурой является лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками и покровами тела.

Иммунологические процессы осуществляются в основном в лимфоидной ткани вторичных лимфоидных органов — в лимфоузлах, селезенке, миндалинах, скоплениях лимфоидной ткани под слизистой оболочкой кишечника, гортани, бронхов, мочеполовых органов, а также в почках и коже. Структурированная лимфоидная ткань представлена в виде миндалин, аппендикса, групповых лимфатических фолликулов (пейеровы бляшки), а также организована в виде не капсулированных фолликулов. В этой лимфоидной ткани осуществляются реакции врожденного и адаптивного иммунитета. В пейеровых бляшках (аналог сумки Фабрициуса у птиц) дифференцируются Т- и В-лимфоциты.

У человека к первичным лимфоидным органам относят тимус (вилочковая железа) и костный мозг. В этих органах происходит дифференцировка Т- и В-лимфоцитов, формируются Т- и В-клеточные рецепторы, определяющие распознавание всего разнообразия антигенных структур организма.

Иммунологические процессы осуществляются в основном в лимфоидной ткани вторичных лимфоидных органов — в лимфоузлах, селезенке, миндалинах, скоплениях лимфоидной ткани легкого и кишечника.

Центральные органы

Костный мозг (*medulla ossium*) расположен в губчатом веществе костей и имеет общую массу около 3 кг. Он состоит из ретикулярной стромы и находящихся в ней клеток эритроцитарного, гранулоцитарного и мегакариоцитарного рядов (рис. 3).

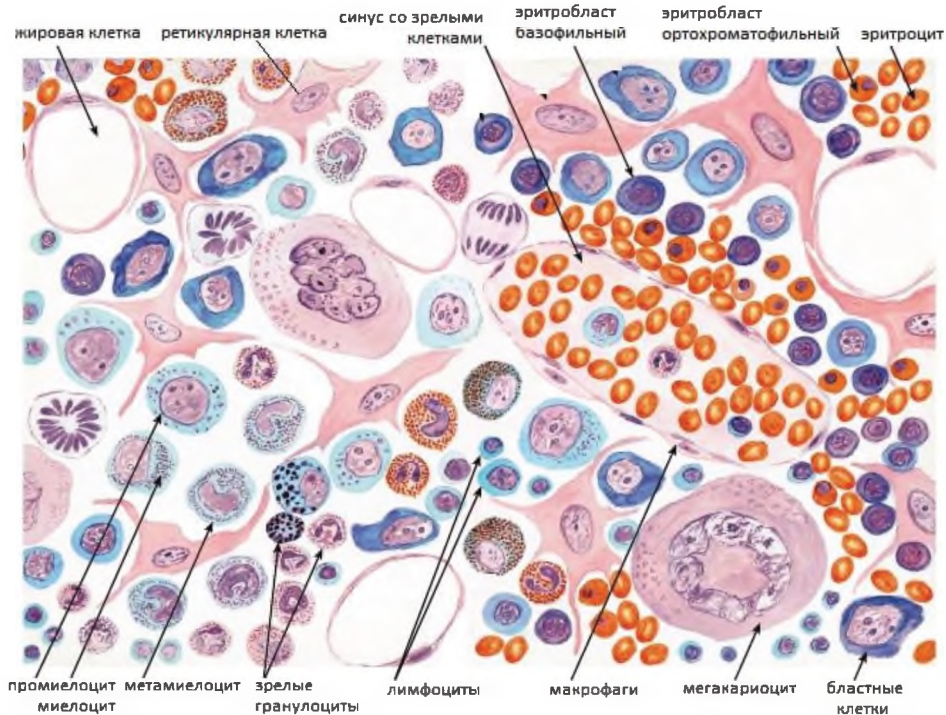


Рис. 3. Костный мозг

Впервые признаки костного мозга [колониобразующие единицы (КОЕ)] появляются у эмбриона человека в печени. Это мелкие, подвижные, самообновляющиеся благодаря митозу клетки, группирующиеся в колонии (скопления). При делении КОЕ образуются клетки — предшественники эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. Как только у плода развивается костная ткань, в ее полости попадают КОЕ и начинается образование и созревание клеток крови.

Костный мозг — производное клеток крови, место рождения всех клеток иммунной системы и созревания В2-лимфоцитов. Для плазматических клеток (дефинитивные потомки В-лимфоцитов) костный мозг является также и периферическим лимфоидным органом. Считается, что основная часть В2-лимфоцитов,

осуществив иммуногенез в периферических лимфоидных органах, превращается в эффекторные клетки и клетки памяти. Так, к эффекторам относят плазматические клетки разных популяций, включая короткоживущие плазматические клетки, которые функционируют, продуцируя АТ, от нескольких дней до месяца, а также долгоживущие плазматические клетки, способные синтезировать антитела на протяжении нескольких лет. В1-лимфоциты в период эмбриогенеза выходят из костного мозга и заселяют лимфоидную ткань брюшной и плевральной полостей, где постоянно пролиферируют и дифференцируются до плазматических клеток. В1-лимфоциты в течение всей жизни организма функционируют автономно от костного мозга. Если по какой-либо причине предшественники В1-лимфоцитов погибают, то регенерация данной субпопуляции не поддерживается за счет популяции В2-лимфоцитов костного мозга.

Предшественники Т-лимфоцитов выходят из костного мозга, чтобы продолжить свою дифференцировку в тимусе.

Вилочковая железа (*thymus*, зобная железа) — центральный орган другой разновидности кроветворной ткани — лимфоидной. Железа располагается за грудиной в верхнем средостении и покрыта соединительнотканной капсулой. Вилочковая железа состоит из множества мелких долек, в каждой из которых различают корковый и мозговой слои (рис. 4).

Созревание Т-лимфоцитов происходит независимо от их количества в крови (вследствие непроницаемости гистогематического барьера тимуса), содержания АГ и определяется генетическими механизмами и возрастом. Для выполнения своих функций лимфоциты мигрируют из центральных органов лимфоидной системы во вторичные — селезенку, лимфоузлы, лимфоидные образования слизистых оболочек (миндалины, аппендикулярный отросток, пейеровы бляшки).

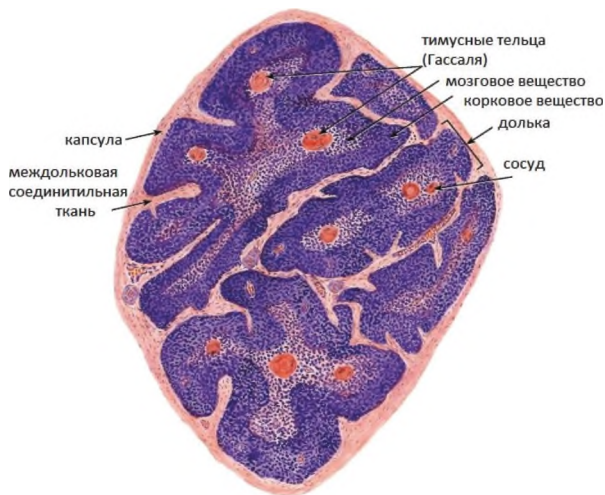


Рис. 4. Тимус

Периферические органы

В этих органах лимфоциты могут взаимодействовать с чужеродными антигенами, между собой и с клетками других популяций. Здесь также протекают основные реакции клеточного и гуморального иммунного ответа, в которых

принимают участие антигенпрезентирующие клетки (АПК) мононуклеарно-фагоцитарной системы (купферовские клетки печени, альвеолярные, перитониальные, плевральные макрофаги, остеокласты, микроглиоциты мозга, мезангиальные клетки почек и пр.) и дендритные клетки (ДК). В периферических лимфоидных органах происходит распознавание чужеродных антигенов (АГ), их презентация Т-лимфоцитам, а также «клональная» экспансия антигенспецифических Т- и В-лимфоцитов с последующей их дифференцировкой в эффекторные клетки и клетки иммунологической памяти.

Лимфатические узлы (*noduli lymphatici*) — множественные симметрично расположенные инкапсулированные периферические лимфоидные органы бобовидной формы. Размер лимфатических узлов в норме составляет 0,5–1,0 см. При иммунных и воспалительных процессах они увеличиваются в размерах и пальпируются. Их функция — элиминация чужеродных АГ из лимфы для инициации специфического иммунного ответа (рис. 5).

Афферентный лимфатический сосуд проникает в узел с его выпуклой стороны и впадает в краевой синус, через который лимфа попадает в ткань коры.

Эфферентные сосуды выходят с вогнутой поверхности узла. Лимфатический узел содержит наружную, корковую и медуллярную зоны.

В наружной части коры имеются фолликулы, содержащие В-лимфоциты.

Стромальными элементами фолликулов являются фолликулярные ДК, создающие особое микроокружение, при котором происходят уникальные для В-лимфоцитов процесс соматического гипермутагенеза переменных сегментов генов иммуноглобулинов и отбор наиболее аффинных вариантов АГ. Фолликулы проходят три стадии развития.

Первичный фолликул — мелкий фолликул, состоящий из «неиммунных» В-лимфоцитов. После того как В-лимфоцит распознает специфический для него АГ и получает все необходимые стимулирующие сигналы, происходит пролиферация соответствующего клона лимфоидных клеток (примерно в течение 1 недели после иммунизации). Фолликул, содержащий пролиферирующие В-лимфоциты, называют герминативным центром.

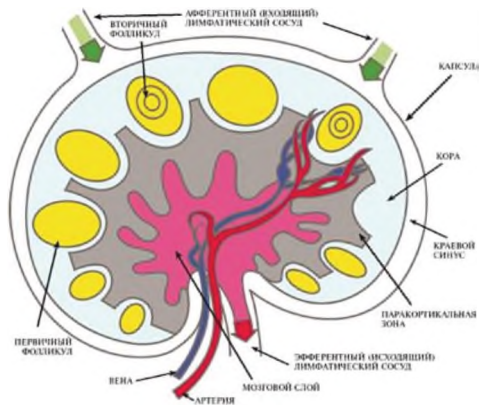


Рис. 5. Схема строения лимфатического узла

После завершения процесса иммуногенеза фолликул уменьшается в размере (вторичный фолликул). В паракортикальной зоне (Т-зависимая зона) лимфоузла локализованы Т-лимфоциты и посткапиллярные венулы, через стенку которых происходит миграция лимфоцитов из крови в узел. В Т-зависимой зоне содержатся ДК — клетки костномозгового происхождения, мигрировавшие в узел по афферентным лимфатическим сосудам из покровных тканей, являются антигенпрезентирующими для Т-лимфоцитов. В эпителиальном слое данные клетки определяются как клетки Лангерганса (LC) (белые отростчатые эпидермоциты).

Под паракортикальной зоной расположены медуллярные тяжи, в которых выявляется большое количество макрофагов. В том случае, если в лимфоузле осуществляется развитие иммунного ответа, в паракортикальной зоне также появляются плазматические клетки. Медуллярные тяжи впадают в медуллярный синус, откуда выходит эфферентный лимфатический сосуд.

Лимфоидная ткань в виде скоплений ее элементов обнаруживается под слизистой оболочкой кишечника, гортани, бронхов, мочеполовых органов, а также в почках и коже (структуры мукозального иммунитета). Различают структурированную и диффузную составляющие такой ткани. Структурированная лимфоидная ткань представлена в виде миндалин, аппендикса, групповых лимфатических фолликул (пейеровы бляшки), а также организована в виде некапсулированных фолликул. В этой лимфоидной ткани осуществляются реакции системы врожденного и адаптивного иммунитета, синтезируются преимущественно IgA. Иммунологически компетентные клетки этой ткани кишечника могут мигрировать в другие ткани и там размножаться. пейеровы бляшки — лимфоидная ткань стенки тонкого кишечника, где образуются В-лимфоциты.

Селезенка (*lien*) — паренхиматозный вторичный лимфоидный орган массой 140–200 г, расположенный в левом подреберье и покрытый соединительнотканной оболочкой и брюшиной. Вторичным лимфоидным органом селезенка названа потому, что основная часть делящихся в ее строме клеток поступает из костного мозга. Лимфоидная ткань селезенки представляет собой образованную ретикулярными клетками сеть вокруг кровеносных капилляров (синусоидов). Основную объем органа в ячейках сети заполнен форменными элементами крови — эритроцитами (красная пульпа, от лат. *pulpa* — «мякоть») и лейкоцитами (белая пульпа). Селезенка — лимфоидный орган, предназначенный для фильтрации крови, выполняет иммунные и неиммунные функции. Она удаляет из крови состарившиеся и поврежденные клетки крови, превращает гемоглобин в билирубин и возвращает железо в циркуляцию для реутилизации. Селезенка продуцирует иммунокомпетентные популяции Т-лимфоцитов и плазматические клетки. Особо важное значение имеет в детском и молодом возрасте, когда лимфоидная система еще не развита.

Миндалины [нёбная *tonsilla palatine*, глоточная (аденоидная) *tonsilla pharyngealis (adenoids)*, трубная *tonsilla tubariae*] представляют собой скопления лимфоидной ткани в слизистой оболочке рта, носа и глотки (лимфоэпителиальное кольцо Пирогова–Вальдейера). Они построены так, что их складчатая поверхность слизистого эпителия задерживает попадающие в начальные отделы дыхательных и пищеварительных путей мелкие частицы и микроорганизмы, связывает их и лизирует с помощью внутриклеточных ферментов. Их лимфоидная ткань по структуре соответствует лимфоузлу. Лимфатических сосудов в миндалинах нет. Выполняют несколько важных функций: осуществляют защиту верхних дыхательных путей от инфекции, снабжают лимфоидную ткань всего организма коммитированными лимфоцитами и участвуют в формировании микробного ценоза полости рта и носовой части глотки.

Червеобразный отросток (*appendix vermiformi*) также относится к периферическим иммунным органам. У человека этот отросток является придатком слепой кишки. Он имеет длину 5–7 см и толщину около 1 см. В слизистой оболочке содержится большое количество лимфоидных элементов. Наиболее сильного развития лимфоидная ткань стенки отростка достигает в 10–14 лет, а затем подвергается инволюции. Объем лимфоидной ткани отростка сильно меняется под влиянием изменений деятельности начального отдела толстого кишечника (образование твердого кала, изменение перистальтики и др.).

Печень (*hepar*) — наиболее крупный орган человеческого тела, играющий важную роль в пищеварении, обмене веществ, и иммунной системы. Масса печени — 1300–1800 г. В ней синтезируются основные эфферентные молекулы неспецифической защиты (комplement, лизоцим, С-реактивный белок (СРБ), система свертывания крови и т. д.) и иммуноглобулины. В виде купферовских клеток находится основная масса макрофагов, осуществляющих захват, презентацию и утилизацию антигенов.

Слизистые и кожа (барьерные органы)

Слизистые оболочки и кожа (*dermis, mucous membrane*) также определяются как компартмент иммунной системы. Это первая линия обороны против инфекционных агентов, которая определена как мукозо-ассоциированная лимфоидная ткань (*mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)*). MALT включает в себя несколько подсистем, связанных с разными компартментами организма, — лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником [(GALT), *gut-associated lymphoid tissue*], лимфоидную ткань носоглотки [(NALT), *nasopharynx-associated lymphoid tissue*], сосудисто-ассоциированную лимфоидную ткань (VALT) и бронхо-ассоциированную лимфоидную ткань [(BALT), *bronchus-associated lymphoid tissue*], в зависимости от их расположения (табл. 1). Свое название они получили из-за их способности генерировать слизь — вязкий раствор полисахаридов в воде, который покрывает апикальную мембрану эпителиальной клетки.

Структуры мукозо-ассоциированной лимфоидной ткани

Наименование	Анатомическая локализация	Механизмы защиты
SALT	Кожа (дерма)	Клиренс кератоцитов. Кислый pH, кожное сало
NALT	Носовая полость, рот и ротоглотка, конъюнктивa	Чихание, слюна, слезы. Катионный белок, анти-микробные пептиды, лизоцим
BALT	Трахея, бронхи, легкие	Кашель. Катионный белок, дефензины, гликоконъюгаты, муцин
VALT	Половые органы	Кислый pH, катионный белок, спермин, муцин
GALT	Пищевод, желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник, уrogenитальный тракт	Рвота, перистальтика, диарея, мочеиспускание слезь. Кислый pH, трипсин, лизоцим, дефензины и другие катионные белки

Слизистые оболочки служат входными воротами для большинства патогенных микроорганизмов. Защита слизистых оболочек от атаки со стороны микробов осуществляется с помощью иммунных реакций, которые реализуются в MALT, препятствующей проникновению микроорганизмов. В ней сконцентрирована основная масса иммунной системы [на общей площади 400 м² (120 м² — дыхательная система, 250–400 м² — желудочно-кишечный тракт, 1,5–2,0 м² — кожа, 1,5–2,0 м² — мочеполовая система) располагаются около 50% клеток иммунной системы].

Мукозальный иммунитет — это сложное взаимодействие между врожденными и адаптивными механизмами иммунной системы, зависящее от анатомического строения органов. Функционально он обеспечивается клетками, непосредственно находящимися в ткани (резидентные). Структура мукозального иммунитета имеет сходную организацию во всех анатомических отделах (рис. 6).

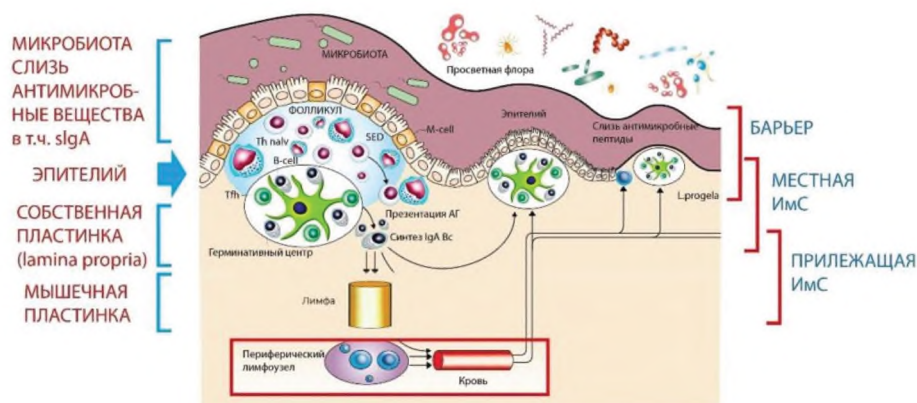


Рис. 6. Схематическое изображение слизистых

Слизистые оболочки прежде всего представляют собой тонкий слой эпителиальных клеток, которые выстилают кишечник, дыхательные или мочеполовые пути, образуя границу между внешней и внутренней средой организма.

В настоящее время выделяют несколько типов слизистых оболочек, различающихся по структуре эпителия. Слизистые оболочки I типа, такие как кишечник и легкие, состоят из одного слоя цилиндрического эпителия. Слизистые оболочки II типа обнаруживаются там, где требуется более прочный барьер, например во рту, носу и влагалище; для этих участков характерно наличие верхнего слоя однослойного плоского эпителия (табл. 2).

Таблица 2

Локализация эпителия и его виды

Ткань	Тип (подтип) эпителия
Кожа и серозные оболочки	
Поверхностный слой	Многослойный, ороговевающий
Плевра, брюшина, перикард	Простой плоскоклеточный (мезотелий)
Дыхательная система	
Ротоглотка, голосовые связки	Многослойный, неороговевающий эпителий
Гортань, трахея, бронхи, нос	Псевдостратифицированный столбчатый, реснитчатый (дыхательный эпителий)
Воздуховоды из придаточных пазух носа	Многослойный столбчатый
Терминальные бронхиолы, дыхательные бронхиолы	Простой кубовидный, реснитчатый
Каверны	Простой плоскоклеточный
Желудочно-кишечный тракт	
Десна, твердое небо, язык	Многослойный ороговевающий
Пищевод	Многослойный неороговевающий
Желудок	Простой столбчатый, нереснитчатый (эпителий желудка)
Кишечник и желчный пузырь	Простой столбчатый, нереснитчатый (кишечный эпителий)
Анус	Многослойный плоский неороговевающий и многослойный чешуйчатый, ороговевающий
Мочеполовая система	
Уретра	Псевдостратифицированный столбчатый, нереснитчатый
Почечные лоханки, мочеточник, мочевой пузырь	Переходный (уротелий)
Почки	Простой кубовидный с микроворсинками и без микроворсинок, простой плоскоклеточный, простой кубоидальный
Яичники, яички	Простой кубоидальный (зародышевый эпителий)
Фаллопиевы трубы, эндометрий (матка)	Простой столбчатый, реснитчатый
Шейка матки (эндоцервикс)	Простой столбчатый и многослойный, неороговевающий
Вагина	Многослойный, неороговевающий
Половые губы	Многослойный, ороговевающий
Придатки яичка, протоки, семенные везикулы	Псевдостратифицированный столбчатый

Слизь содержит различные антитела, преимущественно sIgA в слизистых оболочках I типа и IgG в слизистых оболочках II типа, а также антимикробные молекулы, которые помогают защитить слизистые оболочки от инвазии патогенов (табл. 3).

Таблица 3

Растворимые факторы секретов

Факторы	Локализация	Механизм действия
Кислый pH	Кожа, влагалище, желудок	Подавляет рост бактерий
Жирные кислоты	Пот	Подавляют рост бактерий
Муцины и агглютинины	Секреты	Агрегация бактерий
Пероксидазы	Секреты	Катализируют окисление липидных мембран бактерий
Ингибиторы протеазы	Секреты	Подавляют функцию бактерий, снижают активность протеаз
Лизосомальные ферменты	Пот и секреты	Уничтожают бактерии, гидролизуют полисахаридный компонент клеточной стенки
Лактоферрин	Секреты	Подавляет рост бактерий, связывая железо
Гистатины	Слюна	Обладают противогрибковыми свойствами, нарушая функцию митохондрий
Катионные белки	Пот и секреты	Обладают антибактериальной активностью, связываясь с липидными клеточными мембранами
Дефенсины и другие антибактериальные пептиды	Секреты	Секретируются лейкоцитами и активны против бактерий, грибов и вирусов в оболочке

Слизь действует как защитный барьер, препятствующий прикреплению бактерий к эпителиальным клеткам. Микробы и другие чужеродные частицы, захваченные слизью, удаляются механическим путем за счет движения ресничек эпителия, с кашлем и чиханием.

При патологических процессах эти процессы усиливаются, возникают рвота, диарея, ринорея, слущивание (образование перхоти, шелушение). С другой стороны, плотный слой слизи отделяет кишечный эпителий от резидентных микробов, обеспечивая защиту за счет статического экранирования гликокаликсом (пушистое покрытие на внешней поверхности мембран) и ограничивая захват ДК кишечника микробов, содержит их в противовоспалительном состоянии.

Иммунные реакции слизистых формируются локально, в местах первичного проникновения антигена [индукторный сайт — это компартмент (участок) слизистой оболочки, где происходит распознавание антигена и инициируется первичный адаптивный иммунный ответ]. Индукторные сайты в GALT, в тонкой кишке образованы такими лимфоидными структурами, как пейеровы бляшки, аппендикс, диффузные скопления лимфоцитов и антигенпрезентирующих

клеток, рассеяны внутри и непосредственно под кишечным эпителием. Индукторные сайты имеют строение, принципиально схожее со строением лимфатических узлов, в них также выделяют Т- и В-клеточные зоны, содержащие все характерные клеточные элементы. В BALT и NALT основными индукторными участками являются бронхиальный эпителий и скопление миндалин в носоглотке соответственно (рис. 7). То есть для этого нет необходимости транспорта антигена в дренирующий лимфатический узел через афферентные лимфатические сосуды.

Формирующиеся при этом эффекторные популяции лимфоцитов могут проникать в афферентную лимфу или кровь, но затем направлены мигрируют в слизистые оболочки и кожу для формирования эффекторного сайта и реализации эффекторных функций. Эффекторный сайт — это специфическая область слизистой оболочки, в которую мигрируют эффекторные популяции лимфоцитов для реализации иммунного ответа. Среди наиболее важных эффекторных участков слизистой оболочки выделяют экзокринные железы, такие как слюнные и слезные. Эти железы вырабатывают защитные внешние секреты (такие как слюна и слезы), которые содержат антимикробные молекулы и секреторные антитела. Области MALT, ассоциированные со слизистыми оболочками I типа, более плотно заселены ДК и лимфоцитами по сравнению с MALT, ассоциированными со слизистыми оболочками II типа.

Помимо этого, данным реакциям сопутствует системный иммунный ответ, при котором эффекторные клетки элиминируют тот же антиген и в других компартментах организма, потому что АПК из слизистых мигрируют в дренирующий лимфатический узел, где активируют наивные Т- и В- лимфоциты. После того как Т- и В-клетки слизистой оболочки активируются в индукторном участке, они мигрируют через лимфу и кровь к различным эффекторным участкам, где дифференцируются в эффекторные Th, цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты и плазматические клетки. Таким образом, после активации лимфоцитов в одном индукторном участке иммунная защита может формироваться во множестве разделенных эффекторных участков слизистой оболочки. Например, когда антиген захватывается в пейеровых бляшках (индукторный участок), специфические антитела могут быть обнаружены не только в слизистой оболочке кишечника, но и в уrogenитальном тракте, и в молочных железах (эффекторные

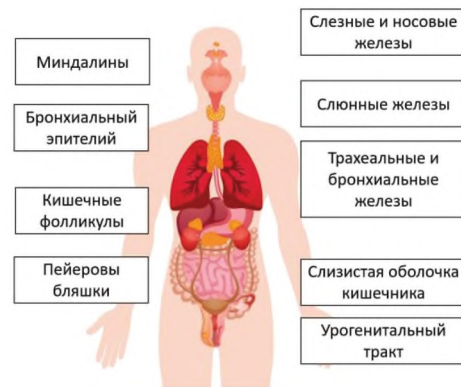


Рис. 7. Индукторные (слева) и эффекторные (справа) сайты MALT

(в рисунке использованы элементы изображения сайта <https://clinimm.ru>)

участки). Таким образом, можно говорить об общей иммунной системе слизистых оболочек.

Микробиота

Большое значение для здоровья человека имеет нормальная микробиота. Микробиота — устойчивое сообщество микроорганизмов, обитающих на определенном участке организма хозяина, активно участвует в формировании мукосального иммунитета.

Это отдельная структура, не относящаяся непосредственно к человеку, но тем не менее очень важна для нормального функционирования организма, в том числе для его защиты. Микробиота (нормальная микрофлора, нормофлора, комменсалы, биотоп) — сообщество более 1000 видов симбиотических и комменсальных бактерий, простейших, грибов и вирусов, населяющих организм человека в пределах тканей и жидкостей. Объем микробиоты оценивается в 10^{14} клеток, составляя до 1% массы человека (около 1 кг). По количеству клеток микробиота сопоставима с общим количеством клеток человека, однако общий ее геном (микробиом) больше в 100 раз.

Стоит обратить внимание, что при оценке микробиома в расчет не принимают вирусы и бактериофаги, присутствующие в различных средах организма, которые по численности превосходят количество бактерий на порядок.

С клинической точки зрения необходимо выделить микроорганизмы постоянно живущие основные (резидентная микробиота — около 90%), постоянно живущие сопутствующие (факультативная микробиота — менее 9,5%) и случайно попавшие (транзиторная микробиота — до 0,5%). К транзиторной микробиоте относятся патогенные микроорганизмы.

Одной из основных функций нормальной микрофлоры является предотвращение развития патогенных макроорганизмов, в основе которого лежит принцип микробного антагонизма. Помимо этого, в качестве защиты бактерии микробиоты кишечника вырабатывают антимикробные пептиды и другие метаболиты с антимикробными свойствами, изменяют pH, а также физически противодействуют колонизации патогенами.

Популяция микробов, их количество и состав в различных тканях существенно отличаются (рис. 8). Если количество микробов увеличивается за пределы своих типичных диапазонов (чаще всего из-за нарушения функции иммунной системы) или микробы заселяют (например, из-за травмы) участки организма, где они обычно не присутствуют, или стерильные зоны (кровь, брюшная полость и др.), возникают заболевания.

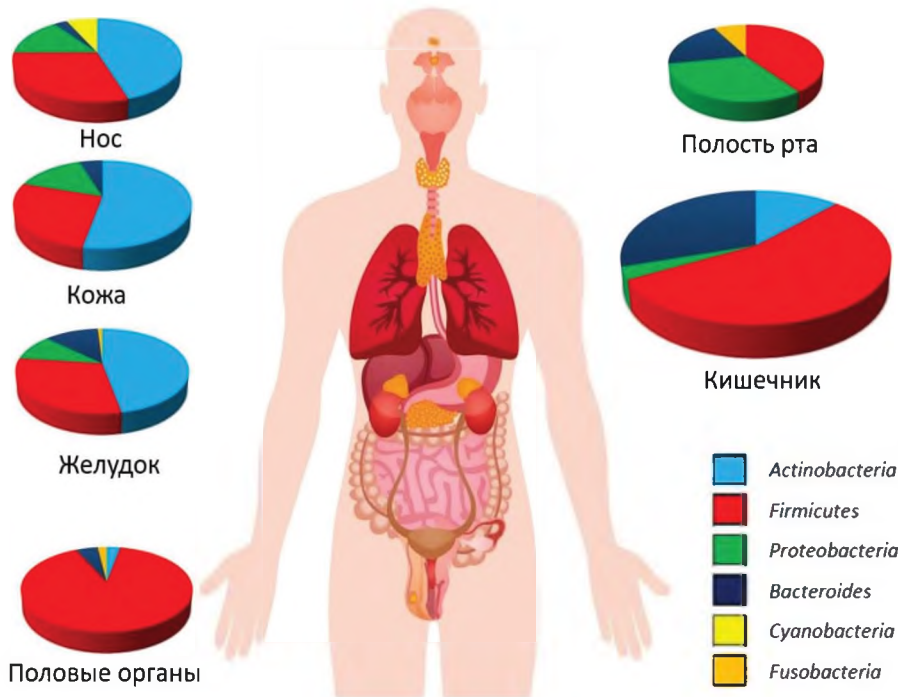


Рис. 8. Состав микробиоты человека

(в рисунке использованы элементы изображения сайта <https://clinimm.ru>)

Состав микробиоты человека со временем может меняться. Чаще всего такое изменение связано с изменением диеты и общего состояния здоровья. Наиболее исследованной и самой большой по объему является микробиота желудочно-кишечного тракта (более 75%). Она представлена в основном анаэробами (табл. 4). Состав кишечных бактерий каждого человека индивидуален и формируется в зависимости от возраста, местоположения, характера питания, образа жизни и состояния здоровья. На основе микробного состава по преобладанию тех или иных ключевых родов бактерий *Bacteroides*, *Prevotella* и *Ruminococcus* выделяют три основных энтеротипа (как группа крови). При 1-м энтеротипе доминируют представители рода *Bacteroides*, при 2-м — *Prevotella*, при 3-м — *Ruminococcus*.

Основная масса микрофлоры (пристеночная микрофлора) фиксирована и тесно связана с энтероцитами, образуя биопленку, незначительная часть находится в просвете кишки (просветная микрофлора).

Микробиота интестинального тракта

Тип	Класс	Семейство, вид
Firmicutes (50%)	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnospiraceae</i> (20–25%) — <i>Faecalicatena contorta</i> <i>Clostridiaceae</i> (1–3%), <i>Heliobacteriaceae</i>
		<i>Ruminococcaceae</i> (10–15%) — <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
	<i>Bacilli</i>	<i>Bacilliales</i> — <i>Bacillaceae</i> , <i>Staphylococcaceae</i> <i>Lactobacillus</i> — <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Enterococcaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i>
	<i>Mollicutes</i>	<i>Clostridium</i> , <i>Mycoplasma</i> u <i>Ureaplasma</i>
	<i>Negativicutes</i>	<i>Veilonellaceae</i>
Bacteroides (30%)	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroidaceae</i> (10–15%), <i>Porphyromonadaceae</i> (4–8%), <i>Rickenellaceae</i> (3–5%)
	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotellaceae</i> (4–8%)
Proteobacteria (3%)	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>, <i>Klebsiella</i>
Actinobacteria (1%)	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium</i>, <i>Propionebacterium</i>, <i>Atopobium</i>
Fusobacteria	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
Verrucomicrobia	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>
Archaea (до 20%)	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobrevibacter smithii</i>

Микробиота активно участвует в пищеварении, расщепляя основные пищевые субстанции и синтезируя новые. Многие виды белков, жиров и углеводов из рациона человека могут быть расщеплены только определенными кишечными микроорганизмами (табл. 5).

Помимо этого, нормальная микрофлора участвует в синтезе короткоцепочечных жирных кислот (ацетат, бутират, пропионат и пр.), аминокислот (аргинин, глутамин), витаминов (К, В1, В2, В3, В5, В6, В12, С, Д, биотина, пантотеновой кислоты), гормонов. Она способствует всасыванию ионов железа, кальция, обеспечивая полностью питательными и энергетическими веществами эпителий кишечника, определяя его созревание и регенерацию. Также микробиота, участвуя в обмене солей желчных кислот и холестерина, обеспечивает гиполипидемический эффект.

Микробные метаболиты способствуют укреплению эпителиального барьера, например, индол за счет связывания белков цитоскелета формирует плотные контакты между эпителиоцитами.

Таблица 5

Участие микробиоты в обмене веществ человека

Тип бактерий	Участие в метаболизме	Диета
<i>Bacteroides</i>	Расщепляют клетчатку, гидролиз белков, перерабатывают сложные углеводы	Мясные и сладкие блюда
<i>Prevotella</i>	Перерабатывают сложные и простые углеводы	Растительная диета, вегетарианцы, сладкоежки
<i>Firmicutes faecalibacterium</i>	Производят масляную кислоту за счет расщепления сложных углеводов	Большое потребление овощей, фруктов и злаков
<i>Firmicutes ruminococcus</i>	Способны перерабатывать целлюлозу, крахмал	Макаронны, картофель, зеленые бананы, чечевица, зеленый горошек, белая фасоль
<i>Firmicutes eubacterium</i>	Превращают лактат в кишечнике в масляную кислоту	Цельные злаки, бурый рис
<i>Firmicutes blautia</i>	Расщепляют сложные углеводы с образованием ацетата	При большом употреблении клетчатки
<i>Firmicutes roseburia</i>	Расщепляют растительные маннаны. Контролируют воспалительные процессы в кишечнике	Орехи, бобовые, кокосы, томаты, кофейные зерна
<i>Firmicutes coprococcus</i>	Расщепляют разные виды волокон и производят масляную кислоту	При большом употреблении клетчатки
<i>Firmicutes erysipelotrichia</i>	Метаболизируют жиры	Жирная пища
<i>Bifidobacterium</i>	Синтезируют молочную, уксусную, муравьиную, янтарную и гамма-аминомасляную кислоты. Подавляют рост патогенных бактерий	Ферментированные продукты (кефир, хлеб на закваске, квашеная капуста), соя, чеснок, томаты, лук, банан, яблоко, спаржа, мед
<i>Lactobacillus</i>	Образуют антибиотические вещества — лактолин, лактоцидин, ацидофилин	Молочные продукты
<i>Akkermansia</i>	Участвуют в обмене муцина, синтезируют жирные кислоты. Противовоспалительное действие	Голодание

Детоксикационная функция микробиоты осуществляется путем нейтрализации экзогенных и эндогенных токсических продуктов, в т.ч. канцерогенов (амины, тиолы, фенолы, ксенобиотики и др.), которые в дальнейшем утилизируются в реакциях метаболизма и/или выводятся из организма с кишечным содержанием.

Аналогичные функции выполняет нормальная микрофлора и на других участках. Кожа, дыхательные пути, урогенитальный тракт и пр. имеют свой состав микрофлоры, который активно участвует в формировании мукозального иммунитета.

Любой инфекционный процесс можно считать дисбиозом, т. к. когда начинает превалировать патогенный микроорганизм, снижаются количество и разнообразие числа других бактерий. Как защитную функцию можно рассматривать

процессы взаимодействия иммунной системы и нормальной микробиоты с формированием толерантности микробиоты и организма человека.

Микробиота играет решающую роль в обучении и развитии основных компонентов врожденной и адаптивной иммунной системы хозяина, в то время как иммунная система регулирует поддержание ключевых характеристик симбиоза хозяина и микроба.

Считается, что у генетически восприимчивого хозяина дисбаланс во взаимодействии микробиоты и иммунитета в определенных условиях окружающей среды вносит вклад в патогенез множества иммуноопосредованных заболеваний.

Клетки иммунной системы

Клетки иммунной системы являются ее основной функциональной единицей и включают в себя различные популяции (табл. 6). Традиционно к клеткам иммунной системы относят мононуклеарные фагоциты (моноциты, макрофаги, ДК), гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и базофилы) и лимфоциты (врожденные лимфоидные клетки, Т- и В-лимфоциты).

Таблица 6

Клетки иммунной системы

Клетки иммунитета	Эффекторные клетки	Антигенпрезентирующие клетки	Регуляторные клетки
Клетки барьерных органов	Макрофаги, М-клетки, клетки Панета, тучные клетки, базофилы, эозинофилы, резидентные лимфоидные клетки, В1-лимфоциты, тромбоциты	Макрофаги, ДК, В-клетки, эпителиальные клетки, меланоциты, кератиноциты, эндотелиоциты, эозинофилы	Макрофаги, Th1, Th2, Th17, Т-регуляторные, базофилы
Клетки врожденного иммунитета	Нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, макрофаги, NK-лимфоциты		Миелоидные супрессорные клетки
Клетки адаптивного иммунитета	Внутриэпителиальные лимфоидные клетки В-лимфоциты, цитотоксические Т-лимфоциты (Тс1, Тс2, Тс17)		В-лимфоциты, Th1, Th2, Th17, Т-регуляторные

Однако в настоящее время в связи с получением новых данных имеет смысл все клетки иммунной системы по происхождению разделить на эмбриональные и костномозговые (рис. 9). Но традиционно клетки иммунной системы разделяются по морфологическим признакам.

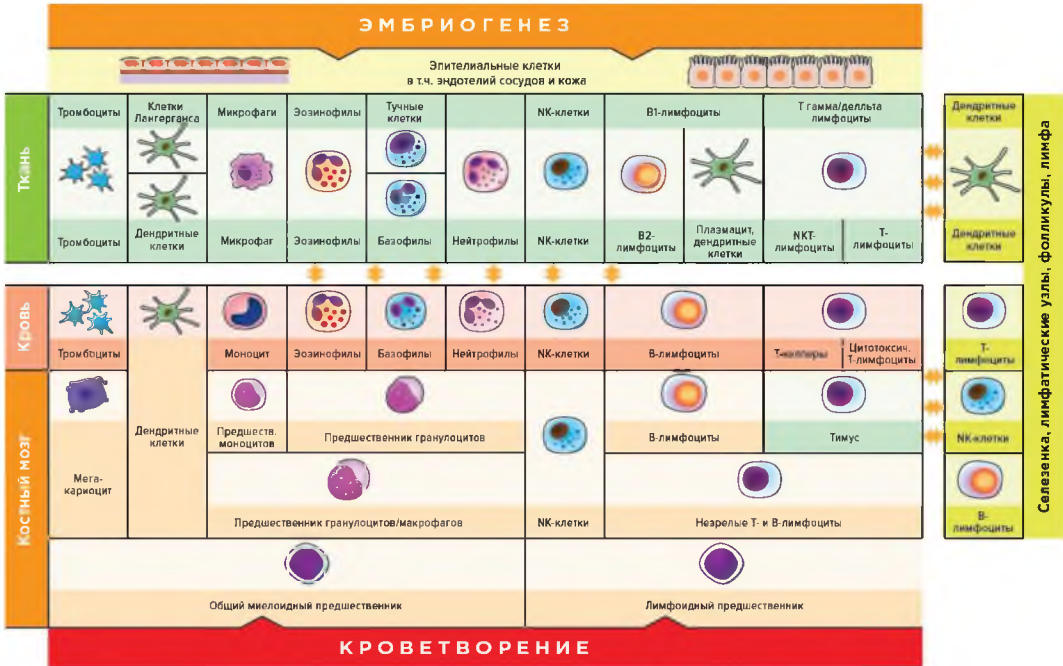


Рис. 9. Схема происхождения клеток иммунной системы

Стволовые клетки

Предшественница всех клеток, в том числе и участвующих в иммунном ответе, является стволовая клетка (СК). Термин «стволовая клетка» (по-англ. stem cell) означает, что каждая такая клетка дает начало целому древу потомков, в основании ствола которого она находится. Среди клеток-потомков будут как клетки, идентичные стволовой (как бы формирующие ствол дерева), так и специализированные (мышечные, эпителиальные, нервные и др.), которые образуют ветви.

Самыми первыми СК следует считать те, что получаются при первых нескольких делениях оплодотворенной яйцеклетки. На стадии бластоцисты из ее внутренней клеточной массы можно выделить эмбриональные СК (ЭСК). Путем определенных манипуляций из них можно получить линию клеток, которые могут неограниченно и быстро делиться, не теряя своих свойств. Из этих клеток и образуется любая специализированная клетка. Это их свойство и называется тотипотентностью. СК, присутствующие в тканях взрослых людей, также сохраняют пластичность. Но все же спектр возможных превращений СК с возрастом суживается. ЭСК уже в процессе внутриутробного развития организма из тотипотентных становятся вначале плюрипотентными (т. е. способными давать начало многим, но не всем типам клеток), а затем олиго- и даже монопотентными (т. е. дающими начало малому числу или только одному типу специализированных клеток соответственно).

Превращение СК в специализированную называется дифференцировкой. После асимметричного деления поначалу возникает прогениторная клетка (клетка-предшественник), которая в дальнейшем, обычно после еще нескольких делений, постепенно становится полностью дифференцированной. Следовательно, такое разбиение может быть асимметричным. В этом случае из одной СК в конечном счете формируются специализированные клетки двух или даже нескольких морфофункциональных типов. В качестве примера можно привести гемопоэтические СК костного мозга. Они постоянно, на протяжении всей жизни, дают начало кроветворным прогениторным клеткам, которые специализируются по нескольким направлениям, с образованием эритроцитов и клеток белой крови всех типов.

Во взрослом организме тоже присутствуют несколько видов СК. Наиболее универсальными из них являются мезенхимальные СК, которые обнаружены в костном мозге, жировой и в незначительных количествах — в других тканях. Они могут давать начало разнообразным клеткам костной, хрящевой, мышечной и некоторым другим клеткам тканей. Гемопоэтические СК, из которых образуются все клетки крови, находятся в больших количествах в костном мозге и присутствуют в периферической крови. Наконец, во всех органах присутствуют региональные СК. Как правило, это уже достаточно дифференцированные клетки, и они могут дать начало только нескольким разновидностям клеток, из которых состоят ткани данного органа.

Эпителиальные клетки.





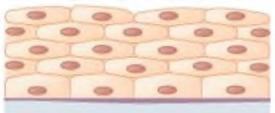


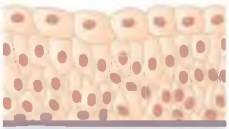
Первой линией обороны против эндогенных патогенов служат эпителиальные клетки. Эпителиальная ткань — это сплошной слой из компактно упакованных клеток с небольшим количеством межклеточного матрикса. Эпителиальные ткани выстилают наружные поверхности органов и кровеносных сосудов по всему телу, а также внутренние поверхности полостей многих внутренних органов. Имеется несколько классификаций эпителиальных тканей, однако наиболее распространена морфологическая классификация, в которой эпителии разделяют по числу слоёв (одно- или многослойные) и форме клеток (плоская, кубическая, призматическая), а также способности к ороговению (табл. 7).

Эпителиальные клетки осуществляют механическую защиту, которая образует границу между внешней и внутренней средой организма. В эпителии отсутствуют межклеточное вещество и кровеносные сосуды, он непроницаем для большинства патогенов. Помимо клеток эпителия, в эпителиальном пласте находится большое количество резидентных клеток иммунной системы (см. раздел «Мукозальный иммунитет»), которые совместно с нормальной микробиотой предотвращают развитие локального воспаления (развития заболевания).

Эпителиальным тканям присуща высокая регенеративная способность.

Таблица 7

Типы эпителиальных клеток

Клетки	Локализация	Функция
Однослойный		
Плоский эпителий 	Слизистая оболочка рта, пищевода, серозные оболочки, лимфатические и кровеносные сосуды (эндотелий), альвеолы легких	Задействован в обмене веществ и газов между кровью, лимфой и другими тканями. Сигнальные и АГП клетки иммунной системы
Кубовидный эпителий 	Глаза, щитовидная железа, почечные трубки, яичники, слюнные железы, поджелудочная железа	Могут выполнять секреторную, абсорбционную или выделительную функции
Столбчатый эпителий 	Ресничный: мелкие бронхи, спинномозговые полости, желудочки головного мозга, матка, яйцеводы. Нересничный ЖКТ, мочевой пузырь	Могут быть секреторными, абсорбирующими или экскреторными
Псевдостолбчатый эпителий 	Трахея, верхние дыхательные пути, мужская уретра, придатки яичка. Разделяют на ресничные, вставочные, базальные и бокаловидные клетки	Выделяют слизь, мерцательная ткань перемещает слизь
Многослойный		
Многослойный плоский эпителий 	Внешний слой кожи (ороговевающий). Внутренняя оболочка рта, пищевода и влагляща (ороговевающий)	Защита, в том числе от истирания
Многослойный кубовидный эпителий 	Потовые железы, слюнные железы и молочные железы	Защитная ткань
Многослойный столбчатый эпителий 	Мужская уретра и протоки некоторых желез	Секретирует и защищает
Переходный эпителий 	Выстилает мочевой пузырь, уретру и мочеточники	Защита в т.ч. позволяет мочевым органам расширяться и растягиваться

Мононуклеарные фагоциты

Группа клеток, которые по их онтогенезу, расположению, функциям и фенотипу можно разделить на 3 группы: моноциты, макрофаги и ДК.

Моноциты — самые крупные из лейкоцитов клетки с крупным бобовидным ядром и большим количеством цитоплазмы, в которой находится внушительное количество лизосом. Число в крови — 80–600 клеток в 1 мм³ (2–10% всех лейкоцитов). Помимо фагоцитоза, в нормальных условиях пополняют пул резидентных макрофагов, в ответ на сигналы воспаления мигрируют в ткани с последующей дифференцировкой в макрофаги или ДК для осуществления иммунного ответа и/или поддержания общего количества. В стабильном состоянии выполняют фагоцитоз. Фагоцитоз, презентация антигенов и секреция цитокинов обеспечивают одну из ключевых ролей моноцитов в иммунном ответе, особенно при бактериальной инфекции. Благодаря секреции факторов роста хемокинов и интерлейкинов (IL) -10 (основной противовоспалительный цитокин) моноциты активно участвуют в репаративных процессах, кроветворении, гемостазе и фибринолизе. Выделяют как минимум 3 типа моноцитов (табл. 8).

Таблица 8

Моноциты

Популяция	Фенотипическая характеристика	Функция
Классические моноциты	CD14 ++ CD16 -	Высокая фагоцитарная активность апоптотических телец, опсонизированных патогенов за счет выраженной экспрессии рецепторов-мусорщиков, слабая антигенпрезентация
Неклассические моноциты	CD14 + CD16 ++	Основные функции — презентация антигенов и продукция провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-12, IL-10. Слабо выражен фагоцитоз
Переходные моноциты	CD14 ++ CD16 +	Считается, что эти клетки образуются в результате активации и дифференцировки классических моноцитов. Их основные функции: IgG-опосредованный фагоцитоз, распознавание патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) и синтез цитокинов [противовоспалительные цитокины (TNF α , IL-1 β и пр.) и IL-10], антигенпрезентация. Низкая экспрессия рецепторов-мусорщиков, участвующих в репаративных процессах (синтезируют факторы роста, хемокины)

Макрофаги — основные клетки барьерных тканей (мукозального иммунитета). Макрофаги представляют собой крупные клетки, которые присутствуют во всех органах и тканях, где могут произойти микробное вторжение или накопление инородных частиц. В зависимости от местоположения имеют разные названия: моноциты — костный мозг/кровь, клетки Купфера — печень, гистиоциты — лимфатические узлы и соединительная ткань, микроглия — центральная нервная система, остеокласты — кость, внутриклубочковые мезангиальные

клетки — почки, альвеолярные макрофаги — легкие, макрофаги красной пульпы — селезенка и т.д.

По происхождению необходимо выделять популяцию тканевых (или резидентных) макрофагов и макрофаги моноцитарного (костномозгового) происхождения. Тканевые макрофаги заселяют ткани в период эмбриогенеза и поддерживают свою численность за счет пролиферации. Эти долгоживущие клетки имеют выраженную тканеспецифичность и превалируют по численности над моноцитарными макрофагами, однако с возрастом организма их доля уменьшается.

Популяция макрофагов моноцитарного происхождения короткоживущая, однако их количество резко увеличивается при воспалении и нормализуется по его окончании. Это независимые друг от друга популяции выполняют многочисленные функции: во-первых, удаляют умирающие или мертвые клетки и клеточный мусор; во-вторых, играют решающую роль в инициации иммунного ответа, представляя антигены; в-третьих, за счет синтеза широкого спектра цитокинов регулируют развитие воспаления, мукозальный, врожденный и адаптивный иммунные ответы; в-четвертых, синтезируют протеин С, тромбомодулин, тканевой фактор, фактор VII, фактор XIII и ингибитор активатора плазминогена, регулируют гемостаз.

Под воздействием различных сигнальных молекул макрофаги активируются с формированием различных функциональных фенотипов (рис. 10). Традиционно макрофаги разделяют на «классически активированные» макрофаги (M1 фенотип) и «альтернативно активированные» макрофаги (M2 фенотип), что позволило сформулировать гипотезу об их поляризации (по типу Th1/Th2). Однако накопившиеся сведения про другие типы макрофагов, которые отличались от фенотипов M1- и M2-макрофагов, и метаболическое перепрограммирование макрофагов из M1 в M2 и наоборот не позволяют однозначно определять различные типы макрофагов. Тем не менее на основе их функции и ключевых маркеров можно выделить популяцию M1- и 4 популяции M2-макрофагов.

M1-макрофаги формируются под воздействием PAMP, молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями (DAMP), и провоспалительных цитокинов (IFN γ , TNF). Эти клетки обладают высокой фагоцитарной активностью, что позволяет им нейтрализовать любые патогены и фагоцитировать

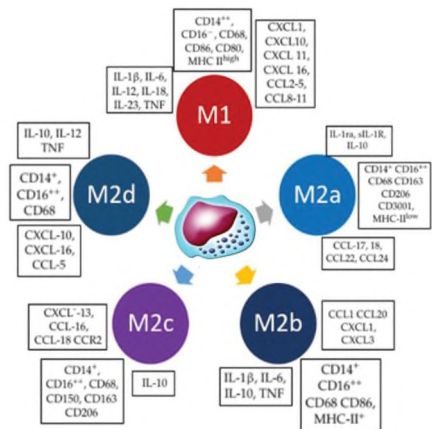


Рис. 10. Фенотипы макрофагов

апоптозные нейтрофилы и другие клетки, обильно продуцировать цитокины. Альтернативно активированные макрофаги M2 формируются при стимуляции их интерлейкинами, глюкокортикоидами, иммунными комплексами, агонистами TLR и др. Они мигрируют в зоны инвазии гельминтов, скапливаются в очагах фиброза, в заживающих ранах кожи и опухолях. На основе их функции и ключевых маркеров M2-макрофаги разделены на четыре отдельных типа — M2a, M2b, M2c и M2d.

M2a наблюдаются вокруг личинок гельминтов и простейших, аллергены которых индуцируют иммунный Th2-ответ, сопровождающийся продукцией IL-4 и IL-13.

M2b функционально близки к M1-макрофагам, продуцируют провоспалительные медиаторы, но и IL-10 усиливают продукцию антител.

M2c-макрофаги обладают супрессивными свойствами — тормозят активацию и пролиферацию CD4+ Т-лимфоцитов, вызванную антигенной стимуляцией, и способствуют элиминации активированных Т-клеток.

M2d — особая группа макрофагов, формирующаяся в ответ на IL-6 и аденозины. Эти макрофаги также рассматриваются как ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM). Они стимулируют миграцию раковых клеток, образование метастазов и ангиогенез.

Дендритные клетки — это крупные круглые или овальные клетки с эксцентрически расположенным ядром и многочисленными разветвленными отростками. Являются посредниками между врожденным и адаптивным иммунитетом, т.к. представляют обработанный Т- и В-лимфоцитами антигенный материал. Группа достаточно гетерогенная, до сих пор неясно, сколько существует подтипов ДК, тем не менее выделяют несколько подтипов с уникальными функциями (рис. 11).

Миелоидные ДК 1-го типа (cDC1) располагаются в периферических тканях и в лимфоидных органах (Т-зависимые области), имеют более низкую миграционную способность, чем cDC2. Обладают высокой способностью презентовать антигены через главный комплекс гистосовместимости (МНС) I класса, стимулируют поляризацию наивных CD4 Т-клеток как в клетки Th1, так и в клетки Th2, способствуют дифференцировке цитотоксических CD8+ Т-клеток. Стимулируют продукцию интерферона III типа, тем самым обеспечивая противовирусную защиту.

Миелоидные ДК 2-го типа (cDC2) — основная популяция миелоидных ДК крови, тканей и лимфоидных органов (Т-В-клеточные зоны) человека. Оснащены широким спектром лектинов, TLR, NOD- и RIG-I-подобных рецепторов, хорошо распознают и презентуют антигены микобактерий и других патогенов. Секретируют IL-23, IL-1, TNF, IL-8 и IL-10, но

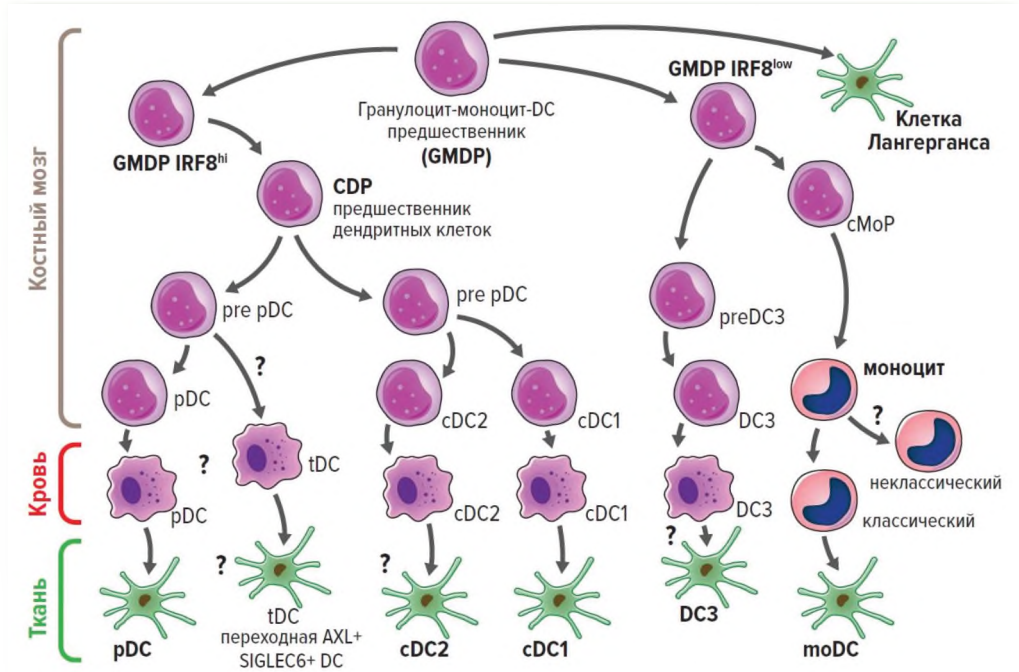


Рис. 11. Подтипы дендритных клеток

слабо синтезируют интерфероны I и III типа; мощные активаторы Th1, Th2, Th17 и CTL. Обладают выраженной способностью индуцировать Th17-ответы, что, вероятно, связано со способностью секретировать IL-23. Являются мощными индукторами Т-фолликулярных хелперных (Tfh) клеток. Из-за высокой экспрессии интегрина $\alpha\beta 8$ cDC2 индуцируют CD4⁺ Treg.

Недавнее исследование по Clec10A (CD301) выделило две популяции cDC2 (Clec10A⁺ и Clec10A⁻), присутствующие в селезенке человека. Однако пока неясно, что это — разные субпопуляции или разные клеточные состояния.

Неклассические моноциты также рассматриваются как предшественники cDC2. Они доминируют по составу клеток при перитоните, воспалительных заболеваниях кишечника, синовитах, экземе, псориазе, аллергических реакциях, хотя нет полной ясности о грани между моноцитами, макрофагами и DC.

Плазмацитоподобные ДК (pDC) в основном присутствуют в лимфоидных органах, в периферических тканях их практически нет. После активации часть pDC специализируется на секреции интерферона (IFN) I типа, другая часть формируется как антигенпрезентирующие клетки. Распознавая инфицированные вирусом клетки, pDC через межклеточный контакт запускают длительный ответ IFN γ без появления антигенпрезентирующей популяции. При активации они становятся мощными стимуляторами CD4⁺ Т-клеток в сторону поляризации Th1,

но являются слабыми стимуляторами дифференцировки цитотоксических CD8+ Т-клеток. pDC также способны индуцировать CD4+ Treg.

ДК 3-го типа (DC3) имеют общие черты как с DC2, так и с моноцитами, но онтогенетически и функционально отличаются как от DC2, так и от моноцитов, характеризуются коэкспрессией CD1c и CD163. Все подмножества cDC активируют Т-клетки, но DC3 обладает заметной активностью по поляризации CD8+ Т-клеток в CD8+ CD103+ Т-клетки резидентной памяти (TRM). DC3 очень мало в крови и тканях, однако у больных системной красной волчанкой, меланомой у пациентов с тяжелой формой новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19), их циркуляция в крови повышена. Однако потенциальная роль DC3 в физиопатологии этих заболеваний неясна, и еще предстоит охарактеризовать их присутствие в лимфоидных органах и периферических тканях.

DC3 может также стимулировать пролиферацию наивных CD8+ Т-клеток и их экспрессию маркеров созревания, но могут ли они на самом деле перекрестно презентировать антигены, еще предстоит определить. Также DC3 обладают превосходной способностью индуцировать резидентные в тканях Т-клетки памяти.

DC3, подобно cDC2, способны секретировать IL-12 и IL-23, а подобно моноцитам, продуцируют большое количество IL-1 β .

Моноцитарные воспалительные ДК (moDC) имеют общие фенотипические маркеры с макрофагами, происходящими из моноцитов, поэтому их сложно отличить друг от друга. Ключевой особенностью moDC является их дендритная морфология, сходная с классическими DC, тогда как у макрофагов большой объем цитоплазмы с многочисленными фагоцитарными вакуолями. Функционально moDC, в отличие от макрофагов, способны стимулировать активацию наивных CD4+ Т-клеток, предпочтительно индуцируя Th17 или Th1. В коже, синовиальной и перитонеальной жидкости moDC эффективно индуцируют поляризацию Tfh. Они также эффективны для индукции дифференцировки эффекторных цитотоксических CD8+ Т-клеток. Подобно cDC2, moDC специализируются на секреции IL-23 и IL-12.

Основная локализация moDC — это кожа, брюшина, легкие и кишечник; их число значительно увеличивается при atopическом дерматите и псориазе, в плевральном выпоте при туберкулезе, у пациентов с болезнью Крона и при различных локализациях рака.

Переходные ДК (tDC), или AXL + SIGLEC6 + DC, демонстрируют промежуточный фенотип между cDC и pDC, и DC3, близки по фенотипу к moDC, идентифицированы в крови как субпопуляция CD123 + DC. Они обнаруживаются в лимфоидных органах, но при воспалении рекрутируются в периферические ткани. Поскольку они могут дифференцироваться в cDC2 и pDC, они были предложены в качестве предшественников DC или «переходной» популяции

между pDC и cDC2, поэтому нет единого мнения о том, отдельная это или промежуточная популяция.

LC представляют собой специализированные ДК, обитающие в базальном эпидермисе и других многослойных плоскоклеточных эпителиях. В отличие от других ДК, их развитие уникально тем, что, сформировавшись в эмбриональном гемопоэзе в печени, LC способны к локальному самообновлению, независимо от костного мозга. Основная роль LC заключается в поддержании эпидермального здоровья кожи, формировании толерантности к комменсалам, сохраняя при этом способность реагировать на отдельные внутриклеточные патогены и вирусы при воспалительных состояниях.

Гранулоциты

Клетки с сегментированными ядрами и цитозольными гранулами происходят из общей полипотентной СК в костном мозге (рис. 12). Они осуществляют защитные функции в основном за счет фагоцитоза (нейтрофилы) и/или за счет секреции токсических субстанций, содержащихся в их гранулах (эозинофилы, базофилы, тучные клетки).

Нейтрофилы — полиморфно-ядерные лейкоциты с сегментированным ядром и многочисленными цитозольными гранулами. Классически считаются клетками, определяющими первую линию защиты врожденного иммунитета.

Они быстро мигрируют в больших количествах к участкам воспаления, уничтожая патогены в первые дни заражения. Основной состав гноя. Уничтожение патогенов нейтрофилами происходит с помощью:

- фагоцитоза — способности поглощать микроорганизмы или частицы;
- дегрануляции — высвобождения набора белков из гранул (секреторные везикулы, гранулы желатиназы, гранулы азурофилов, особые гранулы), которые обладают антимикробными свойствами;
- нетоза — запрограммированной гибели нейтрофилов с высвобождением нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET);
- продукции провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-12, IL-17A, G-CSF.

Морфологическая характеристика нейтрофилов определяется степенью зрелости клеток: юные, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы. Эти

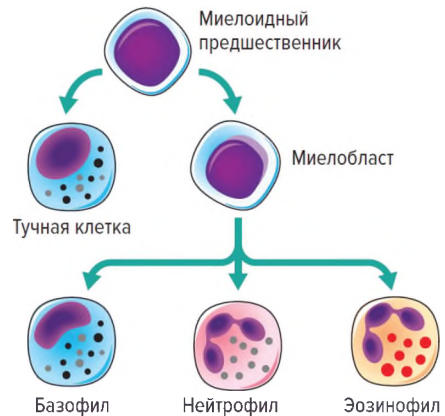


Рис. 12. Гранулоциты

популяции можно дополнительно идентифицировать с помощью набора клеточных маркеров (незрелые нейтрофилы экспрессируют CD15 и CD11b, при достижении полной зрелости — CD16).

Сегментоядерные нейтрофилы — терминально дифференцированные клетки, которые во время воспаления могут мигрировать в ткани и выполнять свои эффекторные функции [например, фагоцитоз, производство активных форм кислорода (ROS) и уничтожение бактерий]. Важно отметить, что нейтрофилы могут быстро менять свои характеристики и поведение по мере того, как они активируются, стареют или входят в новую среду при остром или хроническом воспалении (реализуют совершенно разные эффекторные механизмы).

Нейтрофильные гранулоциты обладают рядом свойств, обуславливающих их участие в патогенезе острого воспаления: богатый набор цитотоксических факторов; высокая чувствительность к всевозможным локальным изменениям гомеостаза; способность накапливаться в очагах поражения и инициировать цепную реакцию с выделением цитотоксических веществ и созданием локального перевеса в балансе эффектор–ингибитор; секреция биологически активных веществ, активирующих предшественников медиаторов воспаления.

Нейтрофилы принимают участие в реализации иммунокомплексных повреждений тканей и в антителозависимых цитотоксических реакциях.

Эозинофилы, базофилы, тучные клетки также относятся к гранулоцитам. В отличие от нейтрофилов, их защитная функция осуществляется не фагоцитозом, а мощной цитотоксической реакцией за счет дегрануляции. Учитывая их полиморфизм, с клинической точки зрения следует различать клетки, относимые к мукозальному иммунитету, которые заложены со времени эмбриогенеза (резидентные эозинофилы, тучные клетки), и традиционные эозинофилы и базофилы [продукты стволовых клеток костного мозга (СККМ)].

Тучные клетки — богатые гранулами иммунные клетки, которые распределены по всему организму в областях, где обычно возможно соприкосновение с микроорганизмами (барьерные ткани), таких как слизистые оболочки и кожа, а также в большинстве тканей, окружающих кровеносные сосуды и нервы. Традиционно выделяют две подгруппы тучных клеток — клетки соединительной ткани (СТМС) и клетки слизистой оболочки (ММС). По происхождению СТМС делят на самоподдерживающиеся, которые заселены в тканях до рождения, и СТМС, поддерживаемые костным мозгом.

Тучные клетки признаны регуляторными и эффекторными клетками как врожденного, так и адаптивного иммунитета, принимающими активное участие в развитии острых и хронических аллергических, аутоиммунных, воспалительных заболеваний и рака. Эти первичные, сигнальные клетки связаны со многими иммунными и неиммунными клетками, которые реагируют на патогены и инициируют защитный ответ, высвобождая большую группу медиаторов,

оказывающих различное действие на окружающие ткани. Выделяют медиаторы быстровысвобождаемые, находящиеся в связанном с гранулярным матриксом состоянии (гистамин, эозинофильный хемотаксический фактор анафилаксии, нейтрофильный хемотаксический фактор, арилсульфатаза А), прочно связанные, находящиеся в связанном с гранулярным матриксом состоянии (гепарин, химаза, триптаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза), и образуемые в ходе активации клетки (лейкотриены С₄, D₄, E₄, простагландин D₂, тромбоксан A₂, эндопероксида, фактор активации тромбоцитов и пр.). Они активно участвуют в формировании воспаления, аллергии и анафилаксии. Также тучные клетки играют важную роль в заживлении ран, ангиогенезе, иммунной толерантности, защите от патогенов и формировании гематоэнцефалического барьера.

Активация тучных клеток происходит за счет распознавания DAMP, и/или PAMP, и/или рецепторов, связанных с G-белком, также активаторами могут служить белки комплемента.

Отдельный механизм активации связан с рецептором IgE. Тучные клетки экспрессируют высокоаффинный рецептор (FcεRI) для Fc-области IgE. Этот рецептор имеет высокое сродство и необратимо связывается с IgE, в результате чего тучные клетки покрываются IgE. Как и любое АТ, оно специфично к одному конкретному антигену (аллергену). Аллерген связывается с переменными участками IgE, находящимися на поверхности тучных клеток, активирует их с быстрым высвобождением содержимого гранул (анафилактическая дегрануляция). Этим и обусловлены аллергические реакции.

Благодаря большому разнообразию других рецепторов тучные клетки реагируют на различные типы стимулов, включая микробные, нервные, иммунные, гормональные, метаболические и химические триггеры. Именно взаимодействие тучных клеток и нервов способствует возникновению боли и зуда.

Базофилы — наименее распространенный в периферической крови тип гранулоцитов, составляющий от 0,5 до 1% циркулирующих лейкоцитов. Морфологически, в отличие от других гранулоцитов крови, имеют базофильные гранулы, а в отличие от тучных клеток — сегментированное ядро, меньшие размеры и округлую форму. Базофилы функционально тесно связаны с тучными клетками, хотя совершенно разные по своему происхождению и развиваются из разных гемопоэтических клонов. В отличие от тучных клеток, базофильные гранулы базофилов содержат меньше протеаз, кроме того, этих гранул в базофилах в целом меньше. Базофилы секретируют сравнительно немного активных веществ, но эффективно выделяют ИЛ-4.

На поверхности базофилов представлено большое число хемотаксических рецепторов, однако спектр Toll-подобных рецепторов (TLR) представлен скудно. Подобно тучным клеткам, базофилы имеют два типа рецепторов к иммуноглобулинам E — высокоаффинные (FcεRI) и низкоаффинные (FcεRII, или CD23), а

также гистаминовые рецепторы H2. За счет этого базофилы быстро рекрутируются в лимфатические узлы, могут функционировать как антигенпрезентирующие клетки и имеют решающее значение для индукции дифференцировки Th2-клеток, а также связанных с ними воспалительных реакций после контакта с паразитами или аллергенами. Все это дает основание предполагать, что базофилы в основном являются регуляторными, а не эффекторными клетками иммунитета.

Эозинофилы — разновидность гранулоцитов с крупными эозинофильными гранулами и сегментированным ядром. Это больше тканевые клетки, чем циркулирующие, поэтому в периферической крови их не более 150 клеток/мкл (1–3%). Дифференцировка эозинофилов регулируется цитокинами (IL-3, IL-5, GM-CSF). После созревания IL-5 контролирует миграцию эозинофилов из костного мозга в кровь. Исходно эозинофилы локализуются в вилочковой железе, желудочно-кишечном тракте, матке и молочной железе. Эозинофилы способны секретировать на исходном уровне или при стимуляции большого количества разнообразных медиаторов (табл. 9).

Таблица 9

Состав гранул эозинофилов

Гранулы эозинофилов	Основное содержание	Назначение содержимого
Специфические (крупные, вторичные)	Главный основной белок 1 (MBP-1), главный основной белок 2 (MBP-2), эозинофильный нейротоксин (EDN), эозинофильный катионный белок (ECP), эозинофильная пероксидаза (EPO)	Внеклеточный цитолиз
Мелкие	Арилсульфатаза В, кислая фосфатаза, пероксидаза	Бактерицидность
Первичные	Лизофосфолипаза (кристаллы Шарко-Лейдена или галектин-10), митохондриальная ДНК	Липидный метаболизм
Липидные тельца	Арахидоновая кислота, липоксигеназа, циклоксигеназа для синтеза простагландинов, простаглицлинов, тромбоксанов, лейкотриенов и др.	Выработка эйкозаноидов
Секреторные везикулы	Ферменты: эластаза, гистаминаза, коллагеназа. Цитокины: IL-1, -2, -4, -5, -6, -8, -13, TNF α , GM-CSF. Факторы роста: TGF beta, VEGF, PDGF. Хемокины: CCL3, CCL5, CCL11, CXCL13	Регуляторная роль
Активные формы кислорода	O ₂ , H ₂ O ₂ , гидроксильные радикалы, синглетный кислород	Бактерицидность

Исходя из локализации (паренхима/барьерная ткань), морфологии ядра (кольцеобразная/сегментированная), поверхностного фенотипа, ответа на IL-5, различают два типа эозинофилов — резидентный (rEOS) и воспалительный (iEOS).

Характерной особенностью эозинофилов является их защитная антипаразитарная функция. Гельминты и продукты их жизнедеятельности, медиаторы воспаления (прежде всего гистамин) и хемокины, макрофаги, тучные и эпителиальные клетки привлекают эозинофилы в ткани. Оказавшись в месте

повреждения, эозинофилы прикрепляются к поверхности паразитов за счет своего рецептора к C3b (большинство гельминтов активируют систему комплемента по альтернативному пути с образованием C3b), высвобождают свои цитотоксические гранулярные белки, а также предварительно сформированные цитокины и липидные медиаторы, способствуя уничтожению паразитов, развитию воспаления и повреждению тканей.

Эозинофилы являются эффекторами в метаболизме гистамина, секретлируемого тучными клетками. Фермент гистаминаза, выделяемый эозинофилами, катализирует расщепление гистамина, также эозинофилы фагоцитируют гистаминсодержащие гранулы тучных клеток, адсорбируют гистамин на своей плазмалемме, связывая его своими рецепторами, помимо этого, эозинофилы секретруют фактор, тормозящий дегрануляцию и высвобождение гистамина из цитоплазмы тучных клеток.

Эозинофилы являются предполагаемыми антигенпрезентирующими клетками и играют существенную роль в активации тучных клеток, коммуникации и функции Т-клеток.

Лимфоциты — большая гетерогенная группа клеток иммунной системы. Морфологически выделяют два типа лимфоцитов: большие гранулярные лимфоциты (чаще всего это НК-клетки) и «малые» лимфоциты (Т- и В-клетки, которые морфологически не различаются). Все лимфоциты происходят от общего лимфоидного предшественника. Однако дифференцировка может происходить различными путями. Врожденные лимфоидные клетки и В-лимфоциты созревают в костном мозге, Т-клетки развиваются (или дозревают) в тимусе, однако основное различие связано с возможностью формировать VDJ-рекомбинацию на различные антигены и сохранять иммунную память. Рекомбинация V(D)J собирает гены иммуноглобулина и рецептора Т-клеток из ранее существовавших сегментов генов вариабельности (V), разнообразия (D) и соединения (J) по механизму вырезания и вставки. Эта стратегия диверсификации рецепторов обеспечивает эффективные иммунные ответы против патогенов.

Исходя из этих характеристик, все лимфоциты делятся на врожденные лимфоидные клетки (в первую очередь НК-клетки и ILCs) и клетки адаптивного иммунитета (Т- и В-лимфоциты). Отдельную группу составляют клетки, имеющие признаки клеток врожденного и адаптивного иммунитета, — врожденноподобные Т- и В-лимфоциты (рис. 13).

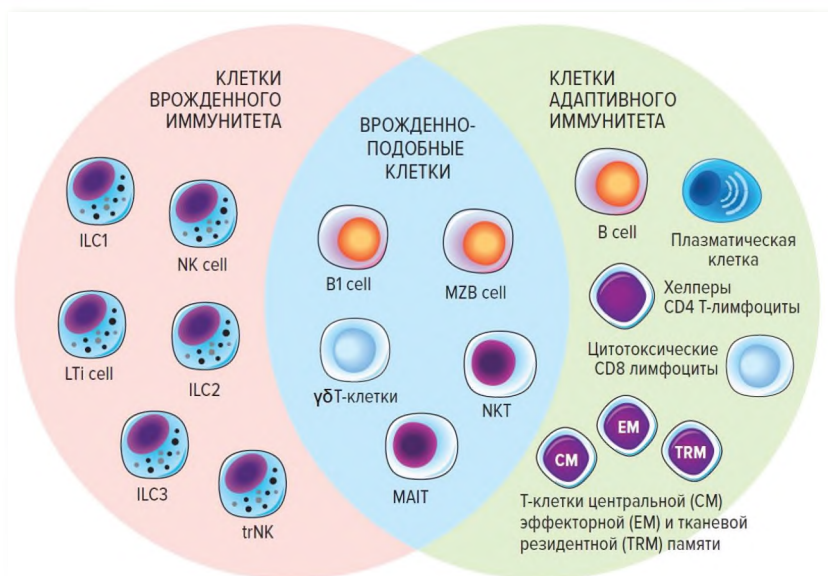


Рис. 13. Лимфоциты

Лимфоциты врожденного иммунитета (ILC) — система клеток врожденного иммунитета (отсутствует антигенспецифические рецепторы), которые происходят от общего лимфоидного предшественника (CLP) и принадлежат к лимфоидной линии. На основании путей развития, фенотипа и продуцируемых сигнальных молекулах ILC разделены на 5 групп: NK-клетки, ILC1, ILC2, ILC3 и LTI (рис. 14).

Помимо эффекторной функции, ILC участвуют во многих других физиологических функциях, включая гомеостаз ткани, морфогенез, метаболизм, репарацию и регенерацию.

Многие из этих функций аналогичны Т-клеткам, поэтому предполагается, что они являются врожденными аналогами Т-клеток. Нарушение регуляции ILC может привести к иммунной патологии. ILC1 и NK-клетки имеют много общих маркеров и функций, однако основная отличительная черта — то, что в ткани LC1 это нецитотоксические или слабоцитотоксические клетки,

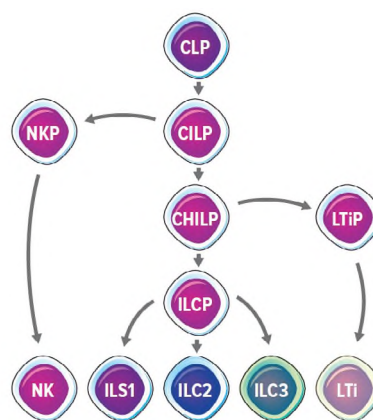


Рис. 14. Развитие лимфоидных клеток врожденного иммунитета

реагирующие на инфекции, вызываемые вирусами и некоторыми бактериями. Основными клетками этой группы лимфоцитов являются НК-клетки.

Естественные или натуральные киллеры (НК) — большие гранулярные лимфоциты («нулевые клетки», «не Т-, не В-клетки»). Число НК в крови — 5–15%, в лимфоузлах и селезенке — 2,5–5% (от всех мононуклеаров). Срок жизни — 7–10 суток. Т-клеточный рецептор (TCR) отсутствует. В тимусе не «обучаются», созревают в лимфатических узлах. Популяция не клонируется. Мишени НК-клеток — вирус-трансформированные и опухолевые клетки. Распознают «чужое» по отсутствию «своего» — ключевая роль принадлежит активирующим и ингибирующим сигналам. Основными лигандами активирующих рецепторов являются молекулы, которые появляются на поверхности собственных клеток организма при различных стрессовых ситуациях и инфицировании различными патогенами. Ингибиторные рецепторы — KIRs (иммуноглобулиновое суперсемейство) и гетеродимер NKG2A (лектиновый рецептор) CD94. Их лигандами являются молекулы МНС I класса. В норме эти молекулы представлены постоянно на поверхности нормальных, неизмененных клеток. Контактный цитолиз происходит в четыре этапа.

Первый этап представляет собой распознавание клеток-мишеней эффекторной клеткой. Ключевую роль в процессах распознавания клеток-мишеней играют МНС I класса.

Второй этап контактного цитолиза сопровождается формированием контакта (или иммунологического синапса) между клеткой-эффектором и клеткой-мишенью, что приводит к поляризации киллерной клетки. Ключевую роль в этих процессах играют интегриновые рецепторы. При этом движение гранул, содержащих перфорин и гранзимы, в зону контакта направляют микротрубочки, ориентированные в сторону клетки-мишени. Сокращение актиновых волокон приводит к выбросу гранул в зону контакта.

Третий этап — это экзоцитоз, или выброс гранул клеткой-эффектором. В состав гранул цитотоксических клеток входят несколько компонентов, ключевыми являются перфорин и гранзим В.

И, наконец, последним, четвертым, этапом контактного цитолиза является индукция апоптоза клетки-мишени при помощи описанных ниже механизмов.

В настоящее время описаны три способа индукции апоптоза цитотоксическими клетками в клетках-мишенях:

- цитолиз, осуществляемый за счет высвобождения перфорина, способного к полимеризации в плоскости мембраны клетки-мишени;
- запуск апоптоза в клетке-мишени за счет активации на ее поверхности рецепторов, принадлежащих к семейству TNF-подобных белков;

– индукция апоптоза в клетках-мишенях при помощи растворимых молекул семейства TNF, которые способны вызывать кластеризацию рецепторов и активацию каскада каспаз внутри клеток-мишеней.

НК-клетки синтезируют такие цитокины, как $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, GM-CSF, IL-10 или IL-13. $IFN\gamma$ ингибирует пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* и косвенно — рост опухоли *in vivo* путем индукции антиангиогенных факторов; $IFN\gamma$ усиливает цитотоксичность НК-клеток за счет избыточной экспрессии молекул адгезии и повышения чувствительности опухолевых клеток к цитотоксичности, обусловленной высвобождением гранул или TNF.

Из НК-клеток следует выделить отдельную популяцию клеток, получивших название резидентных, в ткани НК-клетки (trNK). Клетки trNK были выделены из НК-клеток и считаются «врожденными аналогами» T-RM-клеток. Впервые описаны в печени. В дальнейшем дифференцируются в матке, коже, почках, легких и жировой ткани. Популяция клеток trNK представляет собой CD56bright-клетки, экспрессирующие иммуноглобулиноподобный рецептор киллерных клеток (KIR), с низким уровнем CD16, CD57 и перфорина. Они продуцируют высокие уровни воспалительных цитокинов, таких как $IFN\gamma$, TNF и GM-CSF, плохо дегранулируют при стимуляции. Этот тип клеток был идентифицирован на границе раздела матери и плода. Их уменьшение ухудшает развитие плода и приводит к задержке его роста.

Важными регуляторами иммунного ответа являются популяции других врожденных лимфоидных клеток (табл. 10).

Таблица 10

Иммунная функция врожденных лимфоидных клеток

Тип клеток	Стимуляторы	Эфektorные молекулы	Иммунная функция
НК-клетки, ILC1	Опухоли, внутриклеточные микроорганизмы (вирусы, бактерии, паразиты)	$IFN-\gamma$, Granzymes, Perforin	Иммунитет 1-го типа (активация макрофагов, цитотоксичность)
ILC2	Крупные внеклеточные паразиты и аллергены	IL-4, IL-5, IL-13, IL-9, AREG	Иммунитет 2-го типа (альтернативная макрофагальная активация)
ILC3	Внеклеточные микробы (бактерии, грибы)	IL-22, IL-17, GM-CSF, Lymphotoxin	Иммунитет 3-го типа (фагоцитоз, антимикробные пептиды)
LTi	Ретиноевая кислота, CXCL13, RANK-L	RANK, Lymphotoxin, TNF, IL-17, IL-22	Формирование вторичных лимфоидных структур. Мезенхимальные клетки-организаторы

Они в основном представляют собой резидентные клетки, обнаруживаемые в тканях (как в лимфоидных, так и в нелимфоидных), редко — в периферической крови. Их особенно много на поверхности слизистых оболочек, где они

играют ключевую роль в локальном (мукозальном) иммунитете. Из-за их непосредственной близости к поверхности слизистой оболочки ILC поддерживают тканевой гомеостаз за счет поддержания комменсалов и реагирования на патогенные бактерии.

Это в основном регуляторные клетки, секретирующие цитокины для активации врожденного и/или адаптивного иммунитета. В зависимости от их дифференциации и функции ILC вместе с NK-клетками можно разделить на несколько подгрупп: ILC1, ILC2 и ILC3, которые из-за их сходных функций рассматриваются как аналоги трех основных CD4+ T-лимфоцитов, Th1, Th2 и Th17.

ILC 1-go muna не могут самостоятельно распознавать патогенные паттерны. Эти клетки активируются под влиянием цитокинов микроокружения, которые генерируют DCs и другие тканерезидентные клетки. В ответ на стимуляцию IL-12 и IL-18 ILC1 способны продуцировать IFN γ , TNF, GM-CSF. Это, а также экспрессия соответствующего транскрипционного фактора Tbet позволяют считать данные клетки аналогами Th1-лимфоцитов системы приобретенного иммунитета. Наиболее известными и хорошо изученными представителями ILC1 являются NK-клетки. В отличие от ILC1, NK-клетки, кроме Tbet+, дополнительно экспрессируют транскрипционный фактор Eomes. Фенотипически ILC1 можно описать как Lin – CD127 + лимфоциты.

ILC 2-go muna присутствуют в очень небольшом количестве в тканях легких, коже и кишечнике, а также в мезентериальном жире. Они характеризуются высокой экспрессией фактора транскрипции GATA-3, а также IL-7R, CD25, рецепторов IL-33 и IL-25. ILC2 человека, помимо этих маркеров, также экспрессируют CRTH2 (от англ. Chemoattract-ant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells или CD294) и CD161. Активация ILC2 происходит под действием IL-25, IL-33 и тимического стромального лимфопоэтина (TSLP) (от англ. thymic stromal lymphopoietin), которые продуцируются эпителиальными клетками после повреждения ткани при аллергии или гельминтозах. В ответ на активацию ILC2 человека продуцируют полный набор цитокинов, характерных для Th2, — IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13, а также некоторое количество провоспалительных IL-6, IL-8 и GM-CSF. ILC2 являются важнейшим источником IL-5, по крайней мере у мышей. ILC2 кишечника в ответ на поступление пищи, под действием вазоактивного кишечного пептида конститутивно экспрессируют IL-5 и IL-13. Клинические наблюдения указывают на то, что уровень ILC, продуцирующих IL-13, увеличивается у взрослых с филяриозными инфекциями (например, *Loa loa*, *Wuchereria bancrofti* или *Onchocerca volvulus*). У пациентов, инфицированных *Schistosoma haematobium*, была обнаружена взаимосвязь между площадью фиброзного поражения тканей и уровнем ILC2. Однако было показано, что у детей в возрасте от 6 до 9 лет количество ILC2 положительно коррелирует с успешным разрешением шистосомоза. Лучше всего исследована роль ILC2 при

аллергических реакциях, у пациентов с хроническим риносинуситом и бронхиальной астмой. Также ILC2 играют важную роль в процессах регенерации кожи.

ILC 3-го типа характеризуются экспрессией фактора транскрипции ROR γ t, который играет ключевую роль в регуляции экспрессии эффекторных молекул этих клеток, а также важен для их развития и эффективного функционирования при активации. Кроме того, они несут на своей поверхности IL-7R, способны к синтезу и секреции IL-17 и IL-22. ROR γ t+ ILC3, появляющиеся во время эмбриогенеза, важны для пренатального формирования периферических лимфоидных органов — лимфатических узлов и пейеровых бляшек. ROR γ t+ ILC3 присутствуют в небольшом количестве и после рождения у людей и мышей на поверхности слизистых оболочек. ILC3 человека характеризуются экспрессией ROR γ t, IL-7R, LT α 1 β 2 и IL-22 (и в меньшей степени — IL-17). Было показано, что в дополнение к упомянутым цитокинам ILC3 человека, выделенные из миндалин, экспрессируют IL-26, GM-CSF, TNF, CCL20 и IL-2. Продукция цитокинов ILC3 мыши и человека может быть вызвана при стимуляции IL-1 β и IL-23.

LTi-клетки считаются отдельной линией, хотя некоторые исследователи их относят к группе ILC3, поскольку они имеют много сходных характеристик. Они участвуют в образовании вторичных лимфатических узлов и пейеровых бляшек, способствуя развитию лимфоидной ткани. Эти клетки также контролируют образование фолликулоподобных структур, называемых третичными лимфоидными фолликулами, которые могут развиваться во время хронического воспаления в тканях.

Все остальные лимфоциты обладают способностью к VDJ-рекомбинациям на различные антигены и формированию иммунной памяти. Это Т- и В-лимфоциты и их врожденноподобные популяции.

Т-лимфоциты получили свое название от тимуса, где происходит их созревание и приобретение TCR. Это поверхностный белковый комплекс, состоящий из двух субъединиц — α и β либо γ и δ , представленных на поверхности Т-лимфоцитов, ответственный за распознавание фрагментов антигена, связанных с МНС (major histocompatibility complex). Поступая из костного мозга в тимус, клетки-предшественники созревают в несколько различных типов Т-клеток, которые выполняют множество важных функций в контроле и формировании иммунного ответа (рис. 15).

В процессе лимфопоэза в тимусе формируются несколько субпопуляций Т-лимфоцитов, которые отличаются друг от друга CD-маркерами.

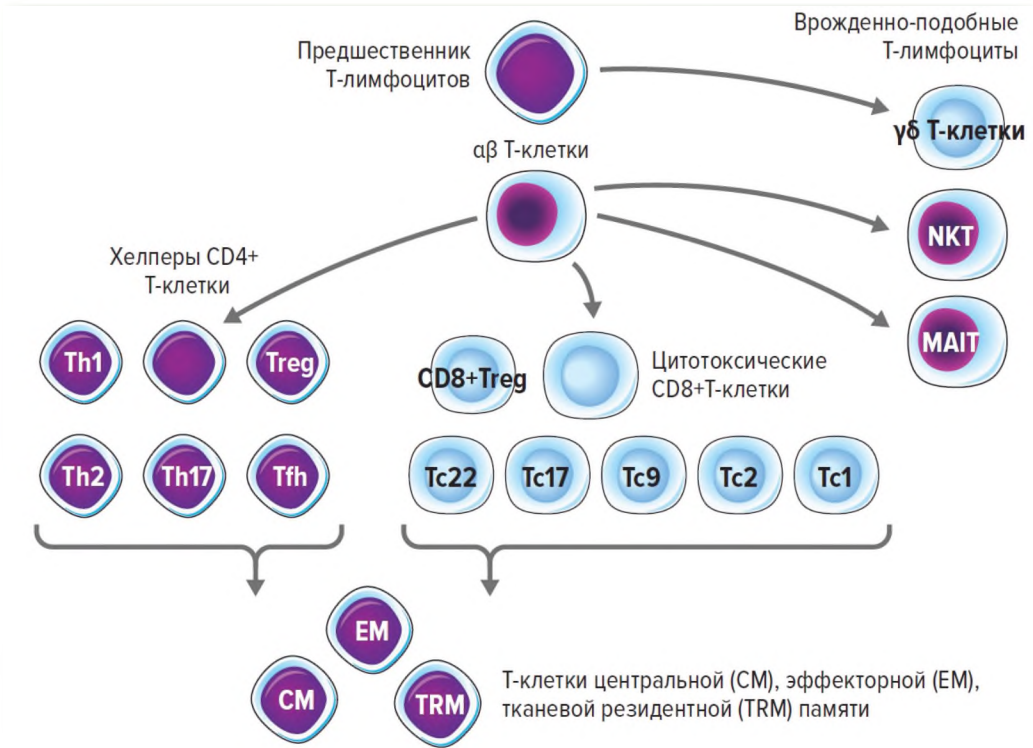


Рис. 15. Т-лимфоциты

Группой Т-лимфоцитов, имеющих кластер дифференцировки CD4, являются *Т-хелперы* и регуляторные Т-клетки. Описано более 30 разных популяций и субпопуляций клеток, обладающих стимулирующей и супрессорной функцией в отношении активности других клеток. Однако ведущая роль принадлежит Т-лимфоцитам, на поверхности которых выявляется рецептор CD4 (Т-хелперы, Th-клетки). Среди всех клеток систем врожденного и приобретенного иммунитета Т-хелперы (Th) выделяются особенным разнообразием выполняемых функций, что находит свое отражение в крайне высокой гетерогенности данной популяции. Все они дифференцируются из наивной Т-хелперной клетки (Th0). В последующем в зависимости от продукции цитокинов среди CD3 + CD4 + лимфоцитов выделяли клетки, способные к синтезу IFN γ и получившие название Т-хелперов 1-го типа (Th1), и клетки, названные Т-хелперами 2-го типа (Th2) и синтезировавшие IL-4. Далее были описаны Th17 и фолликулярные Т-хелперы (Tfh). Это основные субпопуляции Т-хелперов, реальное существование которых не подвергается сомнению (табл. 11).

Основные характеристики «поляризованных» Т-хелперов

Популяции Т-хелперов человека	Поверхностные молекулы	Цитокины дифференцировки	Факторы транскрипции	Секретируемые цитокины	Патоген	Роль в болезни
Th1	CXCR3, CCR5	IL-12, IFN γ	T-bet	IFN γ	Внутриклеточные патогены	Аутоиммунное воспаление, хроническое воспаление
Th2	CCR4, CCR8, CD294	IL-4, IL-5, IL-13	GATA3	IL-4, IL-5, IL-13	Гельминты	Аллергия
Th17	CCR6, CD161	IL-6, IL-23, IL-21, TCF β	ROR- γ t	IL-17A, IL-17F, IL-22	Внеклеточные бактерии и грибы	Аутоиммунное воспаление
Tfh	CXCR5, PD-1, CD40L	IL-21, IL-6, IL-27	BCL6	IL-21, IL-10	Внеклеточные патогены	Аутоиммунное воспаление

Однако все эти клетки объединяет общее свойство — они, продуцируя разные комбинации цитокинов, «руководят» функциями других клеток иммунной системы или помогают клеткам иммунной системы выполнять их функции. Поэтому они и получили название «хелперы».

Каждый из типов Т-хелперов за счет продукции цитокинов поддерживает определенный тип воспаления и адаптивного иммунного ответа. Так, поляризация в сторону Th1 регулирует макрофагально-лимфоцитарное воспаление, направленное преимущественно на элиминацию внутриклеточных патогенов. Поляризация в сторону Th2 способствует активации тучных клеток, базофилов и эозинофилов и развивает в ответ инвазию многоклеточными патогенами. Поляризация в сторону Th17 приводит к активации нейтрофилов, которые играют ключевую роль в уничтожении грибов и внеклеточно-паразитирующих бактерий. И, наконец, Tfh регулируют развитие гуморального иммунного ответа, активацию и дифференцировку В-лимфоцитов и продукцию антител. Мы остановимся только на этих четырех типах клеток, так как их реальное существование не подвергается сомнению большинством исследователей. Следует отметить, что с завидной регулярностью появляются работы, свидетельствующие о возможности перехода Th из одной популяции в другую в зависимости от сигналов микроокружения, цитокиновых сигналов, изменения метаболического профиля и широчайшего спектра других факторов.

Особую группу составляют *регуляторные Т-лимфоциты (Treg)*. Интерес к этим клеткам как основной популяции клеток периферической крови, способной подавлять развитие воспалительных реакций, не угасает уже многие годы. При снижении же функциональной активности Treg происходит нарушение

толерантности к собственным антигенам организма и развитию аутоиммунных патологических состояний. Популяция Treg не является однородной. Описаны как минимум две субпопуляции, циркулирующие в периферической крови и принципиально различающиеся по происхождению. «Тимические», или «натуральные», регуляторные Т-лимфоциты (от англ. thymus derived или natural Treg, nTregs или tTregs) проходят дифференцировку в тимусе в ходе антигеннезависимой стадии созревания Т-клеток. nTregs обладают фенотипом наивных клеток периферической крови — CD45RA + CD45RO – CD62L + CCR7+. Другая популяция — «периферические», или «индуцибельные», или «адаптивные» Treg (от англ. peripherally derived, induced или adaptive Treg, iTregs) — регуляторные Т-клетки формируются в процессе антигензависимой дифференцировки в периферических лимфоидных органах. В 2013 году была предпринята попытка стандартизировать номенклатуру Treg и было предложено Treg, дифференцирующиеся в тимусе, обозначать как nTreg, а Treg, формирующиеся из Th0 на периферии, в лимфатических узлах, — как pTreg. Название iTreg (от англ. in vitro — induced Treg) было предложено употреблять для обозначения регуляторных Т-клеток, которые были получены в ходе дифференцировки в условиях *in vitro*, чтобы отличать их от pTreg, формирующихся *in vivo*. Эффекторные молекулы регуляторных Т-лимфоцитов представлены на рис. 16.

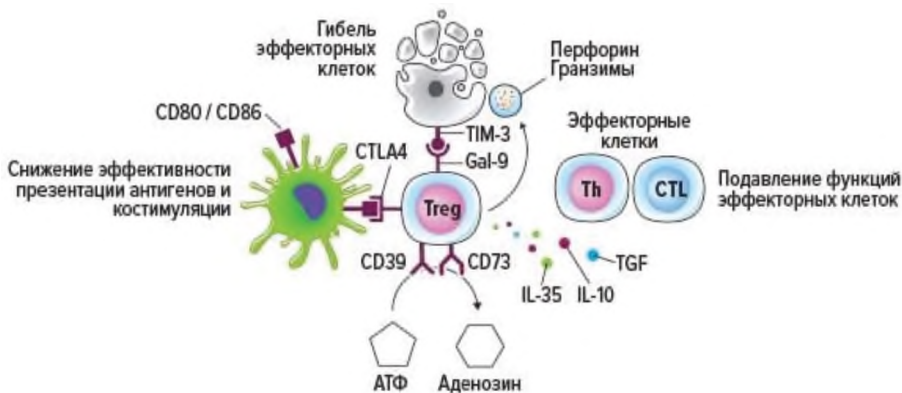


Рис. 16. Эффекторные молекулы регуляторных Т-лимфоцитов

Мишенями Treg являются все клетки врожденного (тканевые макрофаги, антигенпрезентирующие клетки, натуральные киллеры) и приобретенного иммунитета (эффекторные цитотоксические Т-лимфоциты и Т-хелперы, а также В-лимфоциты). Для реализации функций Treg используют различные механизмы, которые традиционно разделяют на бесконтактные (опосредованные действием высвобождаемых регуляторными Т-клетками различных растворимых молекул, диффундирующих в тканевые жидкости) и контактные

(опосредованные взаимодействием рецепторов Treg и поверхностных структур на клетке-мишени).

К эффекторным, *цитотоксическим Т-лимфоцитам* относят Т-лимфоциты, экспрессирующие на своей поверхности рецептор CD8. Основной функцией CD8+ Т-лимфоцитов является уничтожение зараженных или опухолевых клеток-мишеней. Эти клетки реализуют свой эффекторный потенциал при помощи трех основных механизмов:

- первый механизм основан на продукции эффекторных цитокинов IFN γ и TNF при распознавании клеток-мишеней через TCR;

- вторым механизмом является контактный цитоллиз, основанный на высвобождении из гранул перфорина и гранзимов, как это было описано ранее для NK-клеток;

- третий способ уничтожения клеток-мишеней — это запуск апоптоза за счет активации на их поверхности рецепторов, принадлежащих к семейству TNF-подобных белков (классическим примером является взаимодействие Fas/FasL). Подобно дифференцировке CD4+ Th1, IFN γ и IL-12 способствуют дифференцировке и созреванию цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов. Транскрипционный фактор T-bet активирует в цитотоксических Т-клетках для продукции IFN γ , а также является крайне необходимым для проявления их цитолитического потенциала. Более того, CD8+ Т-лимфоциты (в первую очередь Tc1) экспрессируют на своей поверхности хемокиновые рецепторы CCR5 и CXCR3, свойственные и для Th1, что позволяет этим двум популяциям Т-клеток направленно мигрировать в один и тот же очаг воспаления, локализованный в периферических тканях.

В ходе активации и клональной экспансии наивных Т-лимфоцитов формируются популяции клеток памяти, которые патрулируют разные компартменты организма и обеспечивают более быстрый и более сильный иммунный ответ при повторной встрече с антигеном.

1. *Т-лимфоциты центральной памяти:*

- не обладают выраженными эффекторными свойствами;

- способны пролиферировать и быстро дифференцироваться (обычно 3–5 дней) в эффекторные клетки;

- локализуются в периферических лимфоидных органах, а благодаря способности к «рециркуляции» регулярно посещают («патрулируют») периферические лимфоидные органы различной локализации, живут годами — отвечают за долговременный иммунитет;

- нуждаются в презентации антигена в периферических лимфоидных органах и костимуляции для проявления своих свойств и клональной экспансии.

2. Т-лимфоциты эффекторной памяти:

- быстро активируются и увеличивают уровень продукции цитокинов и других эффекторных молекул;
- обладают низкой способностью к пролиферации;
- постоянно находятся в периферических тканях — потенциальных участках повторного проникновения патогена;
- не нуждаются в презентации антигена в периферических лимфоидных органах и костимуляции.

3. Эффекторные Т-лимфоциты:

- обладают выраженными эффекторными свойствами, играют ведущую роль в продукции цитокинов, необходимых для эффективного функционирования эффекторных клеток (моноцитов и макрофагов в случае Th1; тучных клеток, базофилов и эозинофилов в случае Th2; клеток соединительной ткани, эпителиальных пластов и нейтрофилов в случае Th17) врожденного иммунитета;
- неспособны к пролиферации;
- короткоживущие, время жизни — 10–20 дней;
- локализуются преимущественно в периферических тканях, составляя основную популяцию резидентных лимфоидных клеток.

Врожденноподобные, или «нетрадиционные», Т-клетки. В этой группе выделяют три большие популяции: НКТ-клетки, МАИТ-клетки и гамма-дельта-Т-клетки. Они вызывают быстрые иммунные ответы независимо от распознавания пептидных антигенов в контексте молекулы МНС.

НКТ-клетки (Т-клетки натуральных киллеров) — группа Т-клеток, которые имеют общие поверхностные маркеры NK-клеток (CD16, CD56) и Т-клеточные дифференцировочные антигены (CD3, CD4, CD8). Значительная часть НКТ-клеток экспрессирует корцептор CD4, небольшая часть НКТ-клеток экспрессирует CD8 α , оставшиеся НКТ-клетки не экспрессируют CD4 и CD8. НКТ-клетки также экспрессируют различные маркеры, включая CD25, CD44, CD69 и CD122, которые типичны для Т-клеток с активированным фенотипом или фенотипом памяти, и CD161, который характерен для линии NK-клеток.

Презентация липидных антигенов через CD1d является основной определяющей характеристикой НКТ-клеток. Цитотоксические свойства НКТ-клеток связаны с экспрессией перфорина, CD95/CD95L и цитокинов. НКТ-клетки активируются и, быстро продуцируя большое количество цитокинов, таким образом влияют на состояние активации и функциональные свойства множества других типов клеток в иммунной системе и модулируют иммунные ответы против инфекционных агентов, аутоантигенов, опухолей, тканевых трансплантатов и алергенов путем собственной эффекторной функции, трансактивации NK-клеток, активации и дифференцировки Т- и В-клеток, активации ДК и макрофагов.

На основе экспрессии различных альфа-цепей TCR NKT-клетки подразделяются на две отдельные популяции. NKT-клетки 1-го типа (iNKT-клетки) экспрессируют инвариантную цепь TCR α и ограниченный профиль TCR β (отсюда и определение «инвариантные клетки»). NKT-клетки 2-го типа экспрессируют расширенный профиль TCR α и TCR β . iNKT также можно охарактеризовать на основе синтеза цитокинов и факторов транскрипции, уникальных для каждого подмножества

- 1) группа iNKT1 клеток, которые используют T-bet и секретируют IFN- γ ;
- 2) группа iNKT2 клеток, которые используют GATA-3 и секретируют IL-4;
- 3) группа iNKT17 клеток, которые используют ROR γ t и продуцируют IL-17.

NKT-клетки обнаруживаются в значительном количестве в тимусе, селезенке, печени и костном мозге, но лишь в небольшом количестве присутствуют в лимфатических узлах и периферической крови (приблизительно 1%, с высокой вариабельностью у разных людей).

Также идентифицируют дополнительные подмножества T-клеток с поверхностными рецепторами и функциями, сходными с NKT-клетками, которые называют NKT-подобными клетками, однако распознавание антигенов происходит без участия CD1d-молекулы.

Клетки MAIT — связанные со слизистой оболочкой инвариантные T-клетки. Как и обычные T-клетки, клетки MAIT подвергаются перестройке TCR и положительной селекции в тимусе. Однако, в отличие от обычных T-клеток, которые остаются наивными до антигенной стимуляции на периферии, клетки MAIT приобретают эффекторную способность до выхода из тимуса, обладая способностью обнаруживать инфекцию и реагировать на нее. Клетки MAIT функционируют аналогично обычным CD8⁺ эффекторным T-клеткам, секретируя провоспалительные цитокины и цитотоксические молекулы в ответ на микробные инфекции. В отличие от обычных TCR $\alpha\beta$ T-клеток, которые распознают пептидные антигены, представленные молекулами MHC-I или MHC-II, клетки MAIT активируются небольшими молекулами, представленными неполиморфной молекулой, родственной MHC класса I, MR1. Несмотря на инвариантную цепь TCR α и ограничения неполиморфной молекулой MHC, недавние исследования показали, что существует более разнообразный набор антигенов, которые могут распознавать клетки MAIT. Клетки MAIT в ответ на инфицированные клетки продуцируют провоспалительные цитокины, IFN- γ и TNF, что обеспечивает ранний контроль за бактериальными инфекциями, включая микобактерии туберкулеза.

MAIT-клетки, помимо слизистых оболочек, могут быть в крови, печени и легких. Клетки MAIT реагируют на воспалительные цитокины (IL-7, IL-12,

IL-15, IL-18, IFN- α/β). Инфицированные клетки слизистых представляют АГ МАИТ-клеткам, которые лизируют бактериально инфицированные клетки, используя гранзим В. МАИТ также вырабатывают провоспалительные цитокины и цитокины, активирующие адаптивный иммунитет, формируют иммунную память.

Гамма/дельта Т-лимфоциты (интраэпителиальные лимфоциты, $\gamma\delta$ Т-клетки) — популяция Т-клеток у которых TCR состоит из одной γ - и одной δ -цепи. $\gamma\delta$ Т-клетки составляют около 2% всех Т-клеток в периферической крови и вторичных лимфоидных органах, но представляют собой основную популяцию лимфоцитов в эпителии кишечника, кожи, легких и других органов.

Антигенная специфичность $\gamma\delta$ Т-клеток в значительной степени не определена, но было показано, что $\gamma\delta$ Т-клетки реагируют на фосфолипиды, вирусные белки и стресс-индуцированные молекулы. $\gamma\delta$ Т-клетки также могут реагировать на ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны посредством экспрессии на их поверхности многочисленных рецепторов распознавания паттернов, а также лигандов NK-рецепторов (Rae1 и MICA/B). В свою очередь, $\gamma\delta$ Т-лимфоциты продуцируют различные про- и противовоспалительные цитокины. Все $\gamma\delta$ Т-клетки можно разделить на эффекторные и регуляторные.

Эффекторные $\gamma\delta$ Т-клетки при активации, в т.ч. взаимодействуя со стресс-индуцированными молекулами, секретируют цитотоксические молекулы, воспалительные цитокины и активируют клетки адаптивного иммунитета. Они также могут лизировать опухолевые клетки за счет антителозависимой клеточной цитотоксичности (посредством связывания Fc-области IgG, депонированного на опухолевых клетках). Секретируемые $\gamma\delta$ Т-клетками цитокины (IFN- γ и IL-17) приводят к более высокой экспрессии МНС- I, стимуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, т.е. развивают Th1-ответ.

Регуляторные $\gamma\delta$ Т-клетки выполняют регуляторную и супрессорную роль, экспрессируя факторы транскрипции (FoxP3, Helios) при взаимодействии CD86-CTLA-4 между АПК и $\gamma\delta$ Т-клетками. Они также повреждают эффекторные иммунные клетки (DC, NK, iNKT, CD8+ Т-клетки) посредством IL-4, IL-10 и TGF- β . IL-17, секретируемый $\gamma\delta$ Т-клетками, также имеет проонкогенную роль (усиление ангиогенеза, рекрутирование макрофагов, экспансия и поляризация нейтрофилов и подавление CD8+ Т-клеток).

В-лимфоциты — большая популяция лимфоцитов, которые обеспечивают гуморальный адаптивный иммунитет, вырабатывая антитела. Однако за последнее десятилетие стало очевидным, что В-клетки не только вырабатывают антитела, но и активируют иммунную систему, вырабатывая цитокины и презентирова различные антигены. Кроме того, ряд В-клеток за счет различных регуляторных механизмов проявляют иммунодепрессивные функции. Исходя из этого, выделяют различные субпопуляции В-лимфоцитов, относящиеся к двум группам классические В-лимфоциты (В2-клетки) и неклассические (рис. 17).

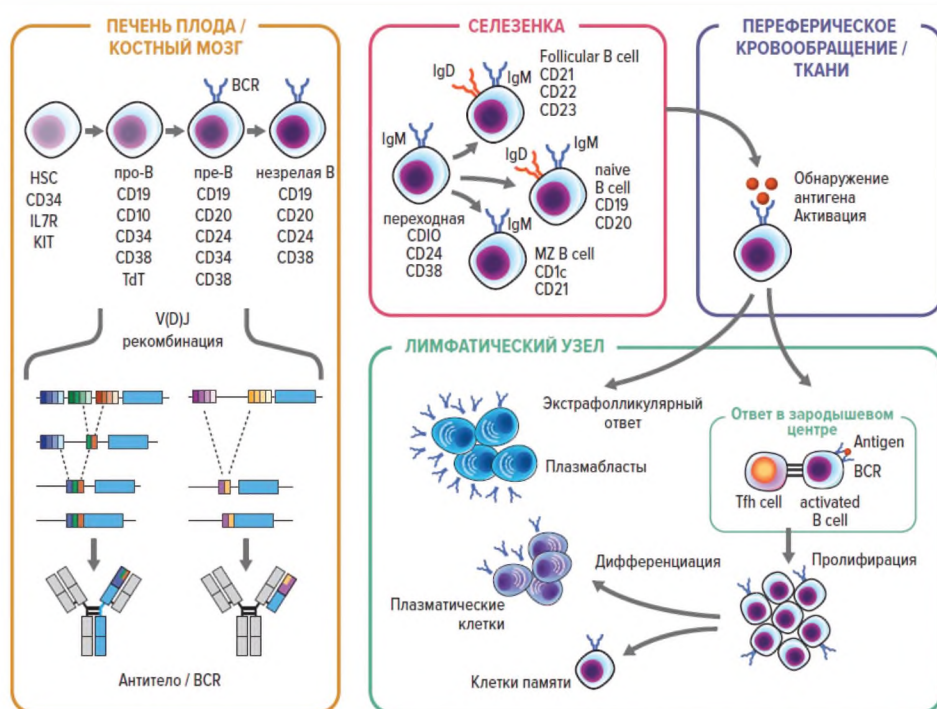


Рис. 17. Развитие и дифференцировка В-лимфоцитов

Обычные, классические В-лимфоциты (В2, или фолликулярные лимфоциты) созревают в костном мозге. В отличие от других В-лимфоцитов, В2-клетки экспрессируют высокие уровни IgD и CD23, низкие уровни CD21 и IgM при отсутствии CD1 или CD5. Их основная функция — связываться с антигеном, презентировать этот антиген фолликулярным Т-хелперам, получить помощь от Т-хелперов, дифференцироваться в плазматическую клетку, которая секретирует большое количество антител. Выделяют следующие популяции зрелых В-лимфоцитов, различающиеся по свойствам и функциям:

1) **В-клетки памяти** отвечают за формирование долговременной иммунологической памяти. Они способны пролиферировать и быстро, в течение 3–5 дней, дифференцироваться в плазматические клетки; при повторном контакте с антигеном в результате соматических гипермутаций способны к увеличению аффинности синтезируемых антител; локализуются в периферических лимфоидных органах, способны к рециркуляции, живут годами;

2) **долгоживущие плазматические клетки**: конститутивно (постоянно) синтезируют антитела только одного класса и только одной специфичности; быстро активируются и увеличивают уровень продукции антигенспецифических антител при повторном контакте с антигеном; преимущественно располагаются

в пределах красного костного мозга; неспособны к пролиферации и клональной экспансии;

3) *короткоживущие плазматические клетки*: время жизни — 10–20 дней; продукция антител только одного класса и только одной специфичности; локализуются преимущественно в периферических лимфоидных органах и соединительной ткани, подстилающей барьерные ткани организма; неспособны к пролиферации, переключению класса синтезируемых антител и запуску процесса соматических гипермутаций.

Плазматические клетки (как корот так и долгоживущие) продуцируют антитела, выполняющие широкий спектр функций, связанных с «наведением» атаки клеточных и гуморальных факторов иммунной системы на патоген.

К неклассическим В-лимфоцитам имеет смысл отнести В-клетки маргинальной зоны, В1-лимфоциты, Breg (регуляторные В-клетки).

В-клетки маргинальной зоны представляют собой зрелые нециркулирующие В-клетки, которые, как и В1-лимфоциты, могут быть быстро задействованы в ранних адаптивных иммунных ответах Т-клетками независимым образом. Позиционируются как первая линия защиты от системных антигенов, попадающих в кровоток. Свое название получили по расположению в маргинальной зоне (MZ) селезенки и некоторых других типах лимфоидной ткани (лимфатические узлы, крипты миндалин, субэпителиальная область лимфоидных тканей, связанных со слизистой оболочкой) вместе с макрофагами и ДК. Быстро дифференцируются в плазматические клетки, что способствует ускоренному первичному ответу антител. В-клетки MZ обычно экспрессируют высокие уровни IgM, CD21, CD1, CD9 и низкие или незначительные уровни IgD, CD23, CD5 и CD11b (этим отличаются от фолликулярных В-клеток и В1-клеток).

В1-лимфоциты — это небольшая популяция В-клеток (около 5% от общей популяции В-клеток). Осуществляют быстрые реакции на проникновение через барьеры широко распространенных бактерий (противобактериальные «пограничники»), поэтому и локализованы в основном в прибарьерных полостях (брюшная и плевральная полости). Там же находятся и клетки — предшественники В1-лимфоцитов, т.к. их пул поддерживается без участия СК костного мозга. В1-лимфоциты продуцируют IgM (определяется как IgM крови, который в основном и вырабатывается В1-лимфоцитами). Помимо этого, В1-лимфоциты продуцируют аутоантитела, структурно похожие на бактериальные антигены, например белки системы групп крови АВО. Имеется мнение, что В1-клетки можно разделять на подклассы В1а и В1b, хотя они сходны по своим свойствам. В1b-клетки являются наиболее распространенными В-клетками. Они реагируют, не получая сигнала активации от Т-хелперов, поэтому активно участвуют в выработке антител во время инфекции или вакцинации.

Breg (регуляторные В-клетки) — иммуносупрессивный тип В-лимфоцитов, который останавливает, угнетает иммунный ответ посредством секреции ИЛ-10, ИЛ-35 и ТФР-β. Кроме того, регуляторные В-клетки способствуют

образованию регуляторных Т-клеток (Treg). Описано множество различных субпопуляций В-клеток с регуляторными свойствами, они включают клетки с фенотипическими маркерами незрелых или зрелых В-клеток, плазматических клеток или клеток В1а; есть мнение, что почти все типы В-клеток могут дифференцироваться в клетки Treg посредством механизмов, включающих воспалительные сигналы и распознавание BCR.

Вспомогательные клетки

Вспомогательными клетками являются секреторные клетки, тромбоциты, эритроциты, фибробласты, клетки стромы. Основное предназначение этих клеток — обеспечение межклеточных контактов, формирование особого микроокружения для развития и поддержания функциональной активности всех участников иммунных реакций.

К клеткам, обладающим защитными свойствами, имеет смысл отнести и многочисленные секреторные клетки, которые вырабатывают вещества различной химической природы. Так, например, в кишечнике функционально схожие с нейтрофилами клетки Панета под воздействием бактерий или бактериальных антигенов секретируют антимикробные пептиды (дефенсины, лизоцим и фосфолипазу А2) в просвет кишечной железы, тем самым способствуя поддержанию желудочно-кишечного барьера.

Особыми клетками в этой группе являются **тромбоциты**. Они играют центральную роль во врожденном иммунитете, обеспечивая целостность внешних барьеров, инициируют и участвуют во множественных воспалительных процессах, непосредственно связывают патогены. В последние годы даже было введено понятие «иммунотромбоз». Иммунотромбоз обозначает врожденный иммунный ответ, вызванный образованием тромбов внутри кровеносных сосудов, в частности в микрососудах. Иммунотромбоз поддерживается иммунными клетками и специфическими молекулами, связанными с тромбозом, и создает внутрисосудистый каркас, который облегчает распознавание, сдерживание и уничтожение патогенов, тем самым защищая целостность организма, не вызывая для него серьезного побочного ущерба. Однако, если его не контролировать, иммунотромбоз является основным биологическим процессом, способствующим развитию патологий, связанных с тромбозом.

Тромбоциты быстро размещаются в местах повреждения или инфекции, вместе с каскадом коагуляции создают первую линию защиты, образуя тромб, и модулируют воспаление (иммунотромбоз). Хотя тромбоз в интактных сосудах обычно рассматривается как патологический процесс, приводящий к обтурации просвета сосуда и последующему гипоксическому повреждению тканей, направленный тромбоз локально контролирует распространение инфекционного заболевания.

Взаимодействуя с лейкоцитами и секретируя цитокины, хемокины и другие медиаторы воспаления, тромбоциты за счет образования тромбоцитарно-

лейкоцитарных агрегатов (они типичны для сепсиса и других тяжелых инфекций) стимулируют дегрануляцию и усиливают фагоцитоз нейтрофилами. Помимо этого, CD40L, который в большом количестве синтезируется тромбоцитами, индуцирует продукцию ROS и повышает экспрессию молекул адгезии (E-селектин, ICAM-1 и VCAM-1) в нейтрофилах и макрофагах.

В случае дисбаланса всей регуляции иммунотромбоза этот процесс может быстро стать патологическим в виде диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдром) или тромбоза глубоких вен. ДВС-синдром при сепсисе, COVID-19 и ряде других инфекций является ярким примером нарушения регуляции процесса свертывания.

Наиболее распространенными клетками соединительной ткани у человека являются **фибробласты** (от лат. *fibra* — «волокно»). Основная функция фибробластов — поддержание структурной целостности соединительных тканей за счет непрерывной секреции внеклеточного матрикса и коллагена, что является важнейшим условием для создания структурного каркаса (стромы) тканей. Это свойство фибробластов является основополагающим в регенерации и репарации ткани. Фибробласты морфологически неоднородны и имеют разнообразный внешний вид в зависимости от их местоположения и активности. Помимо формирования структурных компонентов, фибробласты играют важную роль в иммунном ответе на повреждение тканей путем индукции синтеза хемокинов.

Молекулы иммунной системы

Клетки иммунной системы вырабатывают большое количество биологически активных молекул, которые выполняют эффекторные и регуляторные функции. Все эти вещества, играющие важную роль в процессе распознавания и элиминации в организме человека чужеродных веществ, тесно взаимосвязаны между собой и в то же время могут функционировать автономно (табл. 12). Необходимо отметить, что основная роль в том, что человек не болеет, принадлежит мукозальному и врожденному иммунитету. Именно от способности нейтрализовать патоген при его появлении в организме зависят все остальные «сценарии» развития заболевания.

Таблица 12

Молекулы иммунной системы

Эффекторные		Регуляторные		
Специфические	Неспецифические	Цитокины	Медиаторы	Гормоны
Антитела (иммуноглобулины А, М, G, E, D)	α- и β-интерфероны, комплемент, СРБ, ПКТ и др. белки острой фазы, факторы свертывания крови	Интерлейкины, γ-интерферон, ФНО, КСФ, хемокины, факторы роста	Гистамин, серотонин, простагландины, лейкотриены	Тимозин, тимопэтин

К химическим факторам, способствующим защите поверхности эпителия, можно отнести различные растворимые секреты (слизь, слеза, слюна, моча), в большом количестве присутствующие на слизистых и коже (см. выше).

Помимо растворимых факторов защиты, к гуморальным факторам врожденного иммунитета относятся и другие белки. Они синтезируются при «прорыве» локального иммунитета и направлены на мобилизацию всех функций организма на защиту от патогена. Они получили название **белков острой фазы воспаления** (табл. 13). Это класс белков, концентрация которых в плазме крови

Таблица 13

Белки острой фазы

Наименование	Механизм действия	Эффект действия
СРБ	Связывается с поврежденными клетками и некоторыми типами бактерий, активирует систему комплемента (C1q)	Усиливает фагоцитоз и распознавание NK-клетками
САА сывороточный амилоид А	Активирует каскад инфламасом, индуцируя синтез провоспалительных цитокинов	Участвует в патогенезе хронических воспалительных заболеваний, артритах, атеросклерозе
MBL-лектин, связывающий маннозу	Распознает образцы углеводов на поверхности патогенных микроорганизмов (бактерии, вирусы, простейшие и грибы)	Активирует лектиновый путь системы комплемента, связывает апоптотические клетки и дебрис, усиливает поглощение фагоцитами
Ферритин	Связывает железо, ингибирование, потребление железа микробами	Препятствует развитию микроорганизмов
Гепсидин	Ингибирует перенос железа из кишечника	Препятствует развитию микроорганизмов
Церулоплазмин	Основной белок крови, переносящий медь; участвует в метаболизме железа	Подавляет образование свободных кислородных радикалов
Фибриноген, протромбин, фактор Виллебранда, D-димер	Образуют локальные тромбы в области воспаления	Улавливают вторгшиеся микробы, вызывают хемотаксис
Альфа-1-антитрипсин, альфа-1-антихимотрипсин	Противодействуют повышенному высвобождению протеаз	Уменьшают повреждения тканей

значительно увеличивается (положительные белки острой фазы) и/или снижается (отрицательные белки острой фазы) во время воспаления. Печень является основным местом синтеза этих белков. В совокупности белки острой фазы вызывают многие хорошо известные реакции на микробную инвазию: лихорадка; анорексия; депрессия; изменения метаболизма, гемодинамики и коагуляции; активация лейкоцитов. Цитокины, главным образом TNF, IL-1 и IL-6, глюкокортикоиды и факторы роста стимулируют и модулируют экспрессию генов и транскрипцию белков острой фазы. Концентрация в сыворотке основных белков острой фазы, сывороточного амилоида А- и СРБ во время реакции острой фазы

может увеличиваться до 100 раз. Интересно, что, несмотря на интенсивный синтез во время реакции острой фазы, роль каждого из этих основных белков до сих пор не совсем ясна.

Среди циркулирующих белков острой фазы важнейшим цитолитическим фактором является **система белков комплемента**. Большая часть компонентов комплемента синтезируется гепатоцитами и мононуклеарными фагоцитами и циркулирует в крови в неактивной форме. В условиях воспалительной реакции первый компонент этой системы (C1q) распознает комплекс антиген–антитело. Также возможна активация комплемента по альтернативному и лектиновому пути в результате контакта с АГ на поверхности бактериальных клеток (рис. 18). Последовательная активация всех компонентов системы комплемента имеет ряд последствий.

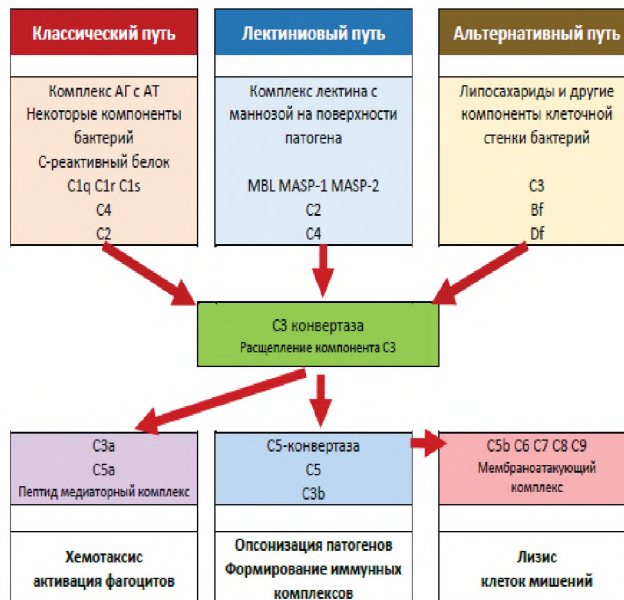


Рис. 18. Система белков комплемента

Во-первых, происходит каскадное усиление реакции, образуется большое количество продуктов реакции, которые обладают, в частности, хемотаксической активностью (C3a и C5a).

Во-вторых, на поверхности бактерии фиксируются компоненты (C6, C7, C8 и C9) комплемента, резко усиливающие фагоцитоз этих клеток.

В-третьих, при ферментативном расщеплении белков системы комплемента образуются фрагменты, обладающие мощной воспалительной активностью. При включении в комплекс антиген–антитело последнего компонента комплемента этот комплекс приобретает способность формировать пору в

клеточной мембране и тем самым вызывать гибель чужеродных клеток (полимеризация С9 в плоскости мембраны).

Комплемент активируется любым комплексом АГАТ, недостаточность в системе комплемента может приводить к развитию патологических процессов.

Цитокины — это низкомолекулярные регуляторные белки или гликопротеины, секретируемые клетками иммунной системы и различными другими клетками в ответ на ряд стимулов. С их помощью осуществляется межклеточная коммуникация: регулируются функция клеток, пролиферация и дифференцировка, хемотаксис, активация специфических мембранных рецепторов, секреция других цитокинов и иммуноглобулинов, развитие иммунных эффекторных клеток. Некоторые цитокины обладают собственными эффекторными функциями. Также цитокины могут связываться с рецепторами на мембране той же самой клетки, которая их секретирует, оказывая аутокринное действие; они могут связываться с рецепторами на клетке-мишени в непосредственной близости от клетки-продуцента, оказывая паракринное действие; в некоторых случаях он может связываться с клетками-мишенями в отдаленных частях тела, оказывая системное действие. В одних случаях один и тот же цитокин может стимулировать пролиферацию клеток, в других — их дифференцировку, в-третьих — изменять функциональное состояние. Многие цитокины характеризуются целым спектром эффектов, оказываемых на различные ткани, — тканеспецифичность действия, которая определяется различными типами рецепторов, экспрессирующихся на клетках, и факторами транскрипции, активирующимися при передаче сигнала. При этом биологические эффекты, оказываемые разными цитокинами, могут в значительной степени перекрываться, поскольку многие рецепторы используют общие цепи и/или запускают сходные внутриклеточные каскады. Именно от их баланса зависит исход развития патологического процесса как в ранний, так и в отсроченный период.

У здоровых людей концентрация цитокинов в крови ничтожно мала (пикограммы 1 мкл), при развитии патологического процесса «по запросу» начинаются синтез и секреция цитокинов, но они вырабатываются непродолжительное время (матричная РНК цитокинов — короткоживущая). При отсутствии «запроса» клетка, синтезирующая цитокины, переключается на синтез супрессорных цитокинов и/или экспрессирует ингибиторные рецепторы или рецепторы для сигналов к апоптозу.

Традиционно цитокины подразделяют на несколько групп: интерфероны, интерлейкины, семейство фактора некроза опухолей, хемокины, ростовые и факторы дифференцировки. Однако с клинических позиций удобнее всего распределить все цитокины по их основным механизмам действия, а именно: группа интерферонов I и III типа; провоспалительные цитокины; хемокины; гемопоэтические цитокины; иммунорегуляторные цитокины; противовоспалительные цитокины; трансформирующие факторы роста (цитокины дифференциации и роста).

В качестве факторов защиты в ответ на вторжение вируса и некоторых бактериальных агентов зараженные клетки различных тканей вырабатывают **интерфероны I и III типа (IFN)**. Они секретируются сразу после контакта с вирусом и прямо пропорциональны заражающей дозе. Под воздействием IFN в клетке происходит выработка сотен белков, вызывающих различные эффекты, прежде всего РНК-активируемой протеинкиназы и рибонуклеазы L, приводящих к разрушению вирусной РНК. Новые вирусные частицы либо вовсе не формируются, либо их число уменьшается в десятки или сотни раз. Помимо этого, секретируемый IFN защищает соседние клетки от вирусов, активирует клетки иммунной системы, подавляет пролиферацию клеток, усиливает экспрессию МНС I класса. Участвует IFN и в формировании системных реакций (лихорадка, слабость, недомогание, головная боль), регулирует гемопоэз (рис. 19).

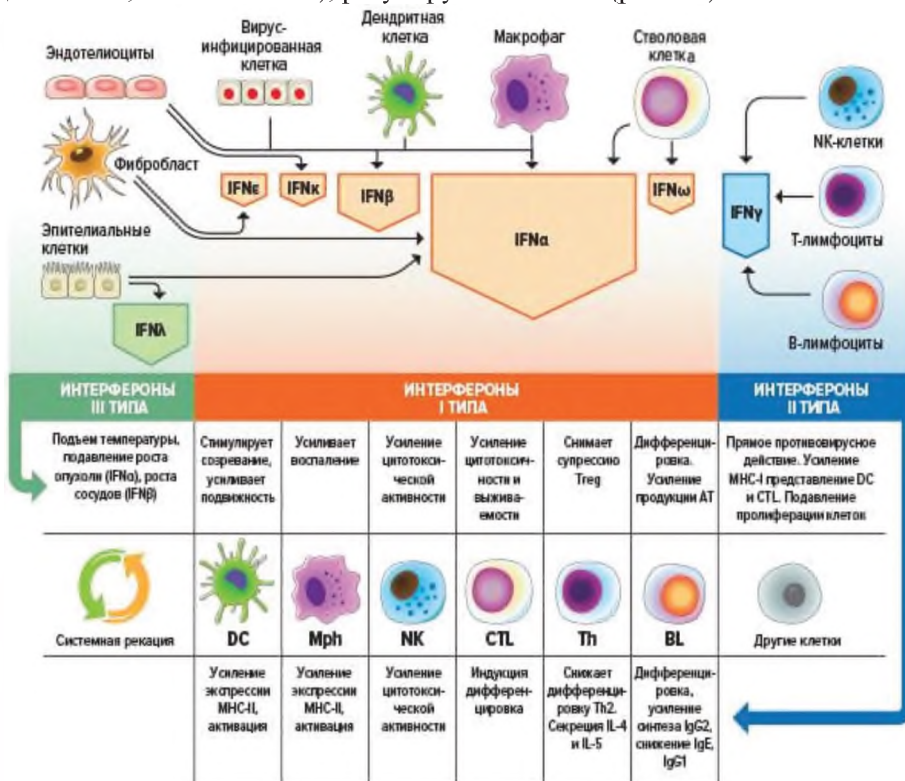


Рис. 19. Интерфероны

При несостоятельности местных защитных реакций синтез цитокинов возрастает в разы. Прежде всего, это синтез **провоспалительных цитокинов врожденного иммунитета (IL-1, IL-6, TNFα)** и в меньшей степени — **провоспалительных цитокинов активированных Т-лимфоцитов (TNFβ, IL-5, IL-16, IL-17, IL-25, IFNγ)** (табл. 14). Их действие важно при регуляции острого и хронического

Провоспалительные цитокины

Цитокины	Клетки-продуценты	Мишени	Эффекты
цитокины врожденного иммунитета			
Семейство IL-1 (IL-1α, IL-1β, IL-18, IL-33, IL-36, IL-37, IL-38)	Моноциты, макрофаги, ДК, NK-клетки, В-лимфоциты, эпителиальные и эндотелиальные клетки	Клетки сосудистой системы, гипоталамуса, печени	Вызывает воспалительные сосудистые реакции, повышение температуры тела, индукцию секреции белков острой фазы
Семейство IL-6 (IL-6, IL-27, IL-31, LIF)	Макрофаги, Т-клетки, эндотелиальные клетки, кератиноциты, другие, в т.ч. опухолевые, клетки	Гепатоциты, моноциты, Th, В-лимфоциты, плазматические клетки	Индукция секреции белков острой фазы, ингибитор TNF и IL-1, стимулирует дифференцировку В-клеток, активирует Т-лимфоциты и дифференцирует их в Th17-клетки. Миокины
TNFα	В основном макрофаги, а также моноциты, NK-, Th1-клетки	Сосудистая система, печень, нейтрофилы и многие другие типы клеток	Кахексия. Сосудистые реакции, индукция секреции белков острой фазы, активирует нейтрофилы, вызывает апоптоз клеток, в т.ч. опухолевых
продукт активированных Т-лимфоцитов			
TNFβ (LTα)*	Th1, ЦТЛ	Многие типы клеток	Активность сходна с TNF α , сильное противоопухолевое действие
IL-5 (CSF для эозинофилов)	Th2, тучные клетки	Эозинофилы, В-лимфоциты	Дифференцировка и активация эозинофилов. Переключение синтеза на IgA
IL-16	ЦТЛ, эпителиальные клетки, эозинофилы	Т-лимфоциты, ДК, макрофаги, моноциты, эозинофилы	Хемоаттрактант и активатор для клеток, экспрессирующих CD4 (Th, макрофаги, ДК, моноциты, эозинофилы)
Семейство IL-17 (IL-17A, IL-17B, IL-17C, и др., IL-25)	Т-лимфоциты (Th17)	Эпителиальные и эндотелиальные клетки, фибробласты	Стимулирует секрецию провоспалительных цитокинов, хемокинов и простагландинов, ангиогенез
IFNγ	Th1-, NK-, ЦТЛ, В-лимфоциты	Моноциты, макрофаги, В-лимфоциты, Th2-лимфоциты	Активация макрофагов и нейтрофилов, усиление МНС I и II, индукция молекул адгезии на эндотелии

воспаления, а также других иммунных реакциях, таких как лихорадка и синтез белков острой фазы. Иммунная, эндокринная и нервная системы интегрированы благодаря существованию взаимных путей передачи информации за счет цитокинов. Доказано, что выработка цитокинов в головном мозге может быть вызвана не только периферической иммунной стимуляцией, но и собственно нервными клетками, стимулированными определенными нейросенсорными сигналами. Например, психосенсорный стресс индуцирует прямую церебральную продукцию цитокинов.

Во всех процессах миграции большая роль принадлежит хемокинам и их рецепторам. Семейство этих небольших цитокинов или сигнальных белков, секретируемых практически всеми видами клеток, играет центральную роль в регуляции миграции клеток, особенно лейкоцитов (табл. 15).

Таблица 15

Хемокины, привлекающие клетки иммунной системы

Привлекаемые клетки	Хемокины	
Моноциты/макрофаги	CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL22	
Т-лимфоциты	CCL2, CCL1, CCL22, CCL17 CXCR3 Индукцируемые IFN γ хемокины — CXCL9, CXCL10, CXCL11	
Тучные клетки	CCL2, CCL5	CXCL8 ингибирует тучные клетки
Эозинофилы	CCL11, CCL24, CCL26, CCL5, CCL7, CCL13, CCL3 CCL11 (эотаксин), CCL5 (RANTES)	
Нейтрофилы	CXCL8 (IL-8)	

Хемокины стимулируют хемотаксис — направленная миграция в межклеточном пространстве за счет градиента концентрации хемотаксических веществ в очаге воспаления (продукты протеолиза тканей) и разности потенциалов между отрицательно заряженным лейкоцитом и положительным зарядом ткани. Хемотаксис имеет значение на всех этапах миграции лейкоцитов, особенно в ткани, в которой отсутствуют сосуды.

Однако с активацией хемокинов связано и множество других биологических процессов, включая пролиферацию, выживаемость, дифференцировку, продукцию цитокинов, дегрануляцию и респираторный взрыв (рис. 20).

У человека известно около 50 хемокинов (по структуре это четыре группы: CXC, CC, CX₃C, C). Рецепторы хемокинов экспрессируются во всех лейкоцитах (наибольшее их количество и разнообразие — на Т-лимфоцитах). Именно от различных комбинаций хемокиновых рецепторов (описано 19 хемокиновых рецепторов четырех семейств) зависят различные пути миграции лейкоцитов. По выполняемым функциям хемокины можно разделить на постоянно вырабатываемые (гомеостатические) для миграции лейкоцитов и образующиеся при патологических состояниях (воспалительные).

Воспалительные хемокины продуцируются в высоких концентрациях во время инфекции или травмы и определяют миграцию воспалительных лейкоцитов в поврежденную область (CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10).

Основной из них — CXCL8 — действует как хемоаттрактант для нейтрофилов. Поэтому клеточный состав экссудата в значительной степени зависит не только от этиологического фактора, но и от состава хемокинов и их рецепторов. Так, если воспаление вызвано стафилококками и стрептококками, в вышедшей жидкости преобладают нейтрофильные гранулоциты, если оно протекает на иммунной основе (аллергия) или вызвано паразитами (гельминты) — содержится много эозинофилов. При хроническом воспалении (туберкулез, сифилис) в экссудате имеется много мононуклеаров (лимфоциты, моноциты).

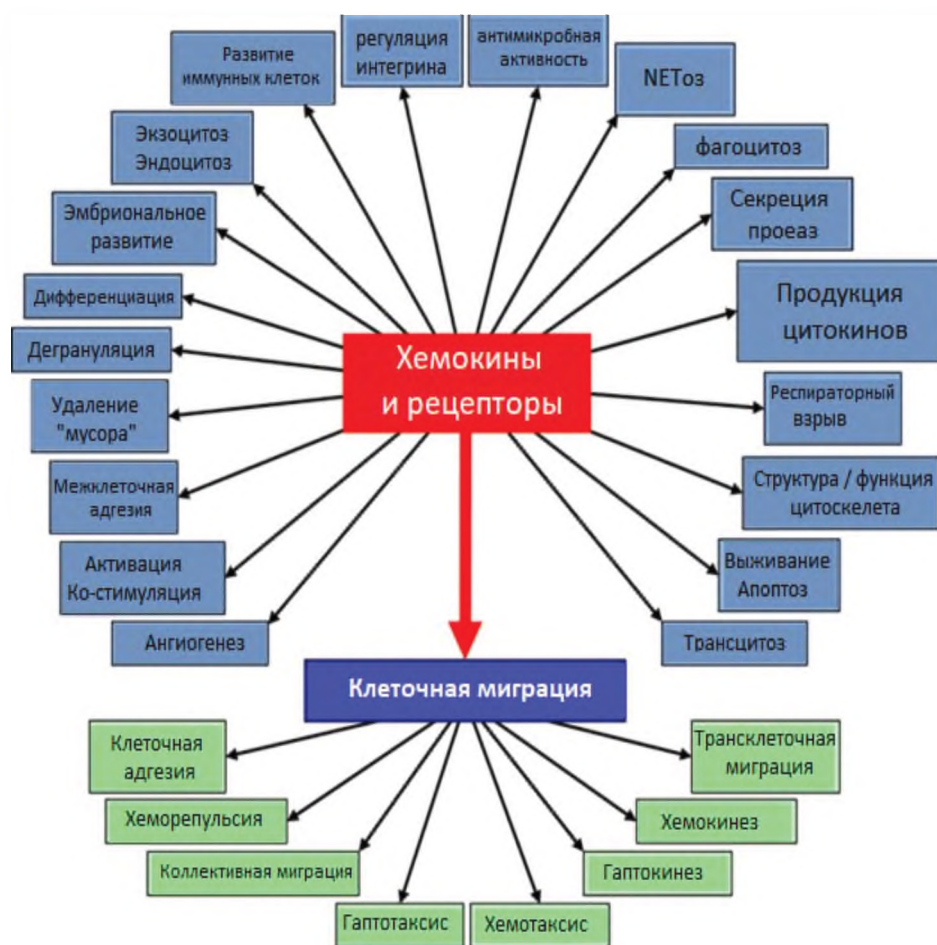


Рис. 20. Функции хемокинов и их рецепторов

Действие цитокинов на кроветворную систему связано с существенной активацией гемопоэза за счет **цитокинов, влияющих на гемопоэз** (табл. 16).

Увеличение числа лейкоцитов необходимо для наращивания количества клеток, убивающих патогены, и для восполнения потерь нейтрофильных гранулоцитов в очаге гнойного воспаления. Они попадают в циркуляцию, и их действие проявляется на системном уровне. Формируется системная воспалительная реакция. Она может проявляться множеством симптомов, от легких, похожих на грипп (лихорадка, утомляемость, головная боль, сыпь, артралгия и миалгия), до тяжелых, угрожающих жизни проявлений чрезмерной воспалительной реакции (цитокиновый шторм).

Одно из первых проявлений связано с действием цитокинов на терморегуляторный центр гипоталамуса, с подъемом температуры тела. Увеличение

Таблица 16

Основные гемопоэтические цитокины

Цитокин	Клетки-продуценты	Мишени	Эффекты
Эритропоэтин	Один из гормонов почек, также секретируется в клетках печени	Стимулятор эритропоэза	Связываясь с рецептором эритропоэтина (EpoR), блокирует апоптоз эритроцитов и их предшественников
Тромбопоэтин	Клетки печени, в меньшей степени — в почках и поперечно-полосатой мускулатуре	Стимулирует выработку и дифференцировку мегакариоцитов	Повышает числ тромбоцитов, уменьшает уровень тромбопоэтина, воздействует на мегакариоциты
IL-1 α (гемопоэтин-1)	Эпителиальные клетки, моноциты, макрофаги, ДК, NK-клетки, В-лимфоциты	Клетки сосудистой системы, печени гипоталамуса	Вызывает воспалительные сосудистые реакции, повышение температуры тела, индукцию секреции белков острой фазы
M-CSF(CSF1)*	Моноциты, гранулоциты, фибробласты и эндотелиальные клетки	СККМ, моноциты	Стимулирует пролиферацию моноцитов, активирует их и макрофаги, стимулирует секрецию провоспалительных цитокинов
GM-CSF(CSF2)*	Фибробласты, эндотелиальные клетки, макрофаги, Th	СККМ, клетки миелоидного ряда, эндотелиальные клетки	Стимулирует пролиферацию гранулоцитов и моноцитов. Хемоаттрактант для нейтрофилов, стимулирует фагоцитоз, вызывает созревание ДК
G-CSF(CSF3)*	Эндотелиальные клетки нейтрофилы, моноциты, макрофаги, фибробласты	СККМ, гранулоциты, клетки плаценты	Стимулирует пролиферацию предшественников гранулоцитов
IL-3 (мульти-CSF)	Кератиноциты, тучные клетки, эндотелиальные клетки, Т-лимфоциты, NK-клетки, моноциты	СККМ, макрофаги, мегакариоциты, эозинофилы, тучные клетки	Направляет дифференцировку СКК в сторону миелоидного ряда, стимулирует пролиферацию всех клеток миелоидного ряда
IL-7 (CSF для лимфоцитов)	Строма тимуса и костного мозга, эпителиальные клетки кишечника	Предшественники В-лимфоцитов, Т-лимфоциты, NK-клетки, моноциты, мегакариоциты	Направляет дифференцировку СКК в сторону лимфоидного ряда, стимулирует пролиферацию В- и Т-лимфоцитов, синтез воспалительных цитокинов моноцитами
IL-11	Строма костного мозга	Мегакариоциты, остеокласты, адипоциты, гепатоциты	Стимулирует пролиферацию мегакариоцитов и эритроцитов, секрецию белков острой фазы, ингибирует адипоциты

температуры является одной из эффективных защитных реакций, так как при повышенной температуре снижается способность ряда бактерий к размножению и, напротив, возрастает пролиферация лимфоцитов.

В печени под влиянием цитокинов увеличивается синтез острофазных белков и компонентов системы комплемента, необходимых для борьбы с патогеном, одновременно снижается синтез альбумина. Т.е. на уровне регуляции генов цитокины направляют энергетические потоки, для развития защитных реакций. Действие провоспалительных цитокинов на центральную нервную систему приводит также к снижению аппетита и изменению всего комплекса поведенческих реакций. Более тяжелые случаи характеризуются гипотонией, высокой температурой и могут прогрессировать до неконтролируемой системной воспалительной реакции с цитокиновым штормом, требующим реанимационных мероприятий.

Поэтому важно, чтобы своевременно началась выработка **противовоспалительных цитокинов** (табл. 17).

Таблица 17

Противовоспалительные цитокины

Цитокин	Клетки-продуценты	Мишени	Эффекты
Семейство IL-10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24)	T-(Th1, Th2 и Th22) и В-лимфоциты, моноциты, макрофаги, кератиноциты	Th1, ЦТЛ, В-лимфоциты, антигенпрезентирующие клетки	Ингибирование функции макрофагов (снижение секреции TNF, IL-1, IL-12, экспрессии MHC II), Th1 (угнетение IL-2, IL-3, IFN γ), стимуляция пролиферации В-лимфоцитов
IL-4	Th2, тучные клетки	В- и Th	Подавляет активность макрофагов, стимулирует экспрессию MHC-II. переклюкает синтез IgG1 и IgE
IL-8 (хемокин CXCL8)	Моноциты, макрофаги, эндотелий	Нейтрофилы, наивные Т-лимфоциты	Мобилизация, активация и дегрануляция нейтрофилов, хемотаксис лимфоцитов. Стимулирует ангиогенез
IL-13	Th2, тучные клетки	Макрофаги, В-лимфоциты, эпителий кишечника	Подавляет макрофаги, переключает синтез антител на IgG1 и IgE, стимулирует выработку слизи. Медиатор аллергического воспаления
IL-26	Т-лимфоциты	Эндотелиальные клетки	Усиливает секрецию IL-8 и IL-10 эндотелиальными клетками

Гуморальная регуляция в системе адаптивного иммунитета также осуществляется за счет цитокинов. **Цитокины, регулирующие адаптивный иммунитет**, представлены в таблице (табл. 18).

Таблица 18

Иммунорегуляторные цитокины

Цитокин	Клетки-	Мишени	Эффекты
---------	---------	--------	---------

	продуценты		
Семейство IL-2 (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21)	Т-лимфоциты	Лимфоциты	Стимулирует пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток
Семейство IL- 12 (IL-12, IL- 23, IL-27, IL- 35)	Макрофаги, ДК, В-лимфоциты	NK-клетки, Th1 и Th2	Вызывает дифференцировку Th1, ингибирует Th2, стимулирует секрецию IFN γ , усиливает активность NK-клеток и ЦТЛ
IL-14	Т-лимфоциты, В-лимфоцитарные опухоли	В-лимфоциты	Контролирует рост и пролиферацию В-клеток, подавляет секрецию Ig
IL-18	Макрофаги, ДК, эпителиальные клетки	Th1, NK-клетки, В-лимфоциты	Стимулирует выработку IFN γ , увеличивает активность NK-клеток, усиливает продукцию IgG, стимулирует ангиогенез
IL-34	Клетки селезенки, печени, тимуса, кишечника и пр.	CD14+ макрофаги и моноциты	Регулирует дифференцировку, пролиферацию и выживание моноцитов, макрофагов и остеокластов
IFN γ	Th1-, NK-, ЦТЛ, В-лимфоциты	Моноциты, макрофаги, В-лимфоциты, Th2-лимфоциты	Противовирусный и противоопухолевый эффект (стимулирует экспрессию МНС I и II). Активирует макрофаги и нейтрофилы. Индуцирует молекул адгезии на эндотелии, подавляет Th2. Подавляет ангиогенез
APRIL	ДК, макрофаги, моноциты, нейтрофилы, Т-клетки	В-лимфоциты	Дифференцирует В-лимфоциты, выживание долгоживущих плазматических клеток в костном мозге
BAFF	Т-лимфоциты, макрофаги, ДК, В-лимфоциты	В-лимфоциты	Фактор активации и дифференцировки В-лимфоцитов, продуцируется аутокринно и стимулирует пролиферацию активированных В-лимфоцитов
MIF	Макрофаги, лимфоциты, эпителиальные клетки, опухолевые клетки	Макрофаги, многие другие клетки	Связываясь с CD74 на иммунных клетках, ингибирует их миграцию. Предотвращает апоптоз опухолевых клеток. Важное значение при развитии гиперчувствительности замедленного типа

Большая группа цитокинов относится к **факторам роста**. Это сигнальные молекулы, которые связываются со специфическими рецепторами на поверхности клеток-мишеней и индуцируют сигнальные пути, которые затем регулируют процессы пролиферации, активации, дифференцировки и миграции клеток. Кроме того, факторы роста контролируют процессы, необходимые для развития, включая организацию тканей, морфогенез и ангиогенез. Во взрослых организмах факторы роста также участвуют в регуляции метаболизма, заживлении ран и поддержании тканевого гомеостаза (табл. 19).

Таблица 19

Основные цитокины дифференциации и роста

Цитокин	Клетки-	Мишени	Эффекты
---------	---------	--------	---------

	продуценты		
Эпидермальный фактор роста (EGF)	Тромбоциты	Эпителиальные клетки	Стимулирует рост эпидермальных и эпителиальных клеток
Трансформирующий фактор роста альфа (TGF-α)	В слизистой оболочке желудка и клетках головного мозга. Макрофаги и кератиноциты		Индукцирует развитие эпителия, способствует заживлению ран, ангиогенезу, стимулирует пролиферацию нервных клеток
Плацентарный фактор роста (PIGF)	Плацентарный трофобласт	Трофобласты, клетки сердца, легких, мышц	Ключевой фактор ангио- и васкулогенеза
Фактор роста кератиноцитов (KGF)	Кератиноциты	Эндотелиальные клетки	Стимулирует пролиферацию, дифференцировку эпителиальных клеток
23 фактора роста фибробластов (FGF)	Макрофаги	Многие типы клеток	Участвует в восстановлении тканей и реакции на повреждения
Трансформирующий фактор роста (TGFβ)	T-лимфоциты, макрофаги, эндотелиальные клетки, многие опухолевые клетки		Ингибирует T-клетки, макрофаги, эндотелиальные клетки, фибробласты, гепатоциты, переключает синтез на IgA, стимулирует рост сосудов
Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)	Макрофаги, клетки эпителия, гипофиза, гладких мышц, опухолевые клетки	Эндотелиальные клетки, макрофаги, гранулоциты	Участвует в формировании сосудов, стимулирует миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, хемотаксис макрофагов и гранулоцитов
Фактор роста гепатоцитов (HGF)	Мезенхимальные СК	Эпителиальные и эндотелиальные клетки, T-клетки	Участвует в развитии органов эмбриона, регенерации органов взрослого человека и заживлении ран
Фактор СК (SCF)	Фибробласты, клетки стромы костного мозга эндотелиальные клетки	СККМ, меланоциты, тучные клетки, врожденные лимфоидные клетки (ILC3)	Связывается с рецептором KIT (CD117), увеличивает выживаемость гемопоэтических СК, тучных клеток, меланоцитов и половых клеток
Инсулиноподобные факторы роста (IGF-1, -2)	Многие типы клеток	Многие типы клеток	Стимулирует пролиферацию клеток и ингибирование гибели клеток (апоптоза)

Основными эффекторными продуктами адаптивного иммунитета являются **иммуноглобулины (антитела)**. Это белки, гликопротеины, относящиеся к γ -глобулиновой фракции белков крови, продуцируемые плазматическими клетками (конечный этап дифференцировки В-лимфоцитов), (рис. 21). Термины «антитело» и «иммуноглобулин» часто используются взаимозаменяемо, хотя термин «антитело» иногда зарезервирован для секретируемой растворимой формы, т.е. исключая рецепторы В-клеток.

Основой структуры различных классов или изоформ антител (IgA, IgM, IgG, IgE, IgD) является большой Y-образный белок, состоящий из четырех полипептидных цепей (две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи), соединенные дисульфидными

связями. Функционально антитело можно разделить на два антигенсвязывающих фрагмента (Fab) и константный участок (Fc), участвующий во взаимодействиях с другими компонентами иммунной системы. Fab содержит паратоп, который специфичен для одного конкретного эпитопа, распознающего уникальную молекулу возбудителя, называемую антигеном (АГ), взаимодействуя между собой подобно замку и ключу. Используя этот механизм связывания, антитело может пометить микроб или инфицированную клетку для уничтожения другими факторами иммунитета или нейтрализовать его непосредственно. Особая группа антител — это секреторные антитела IgA (sIgA). Данные антитела представляют собой димеры молекул IgA, соединенных J-цепью и секреторным

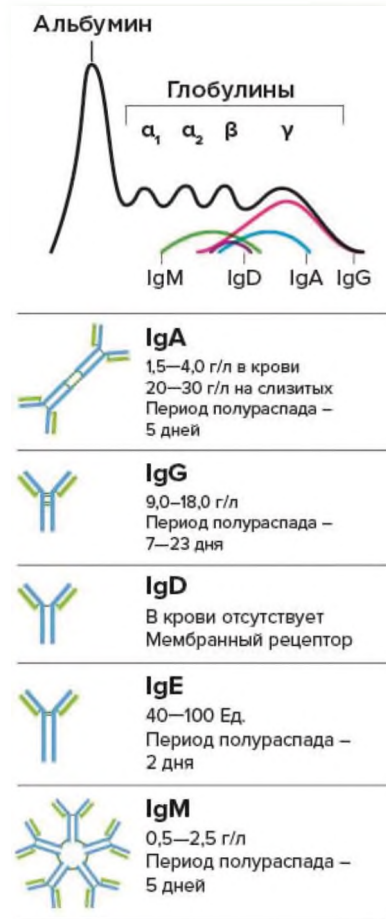


Рис. 21. Иммуноглобулины человека

компонентом, который транспортируется через барьер эпителиальных клеток в просвет органа (до 5 г в день). Секреторный компонент sIgA защищает иммуноглобулин от действия протеолитических ферментов. sIgA связывается со слоем слизи желудочно-кишечного тракта, предстательной железы, респираторного эпителия, слезой, слюной, потом, выделением из мочеполовых путей, покрывает эпителий и действует как антигенспецифический барьер для патогенов и токсинов. Наличие его в молозиве обеспечивает иммунитет новорожденных и способствует формированию, а в дальнейшем — и регулированию состава комменсальной микробиоты. Этот эффект достигается тем, что Fc-концы sIgA сшиты и не активируют фагоциты и комплемент.

Антитела разных классов различаются по тому, где они выделяются в организме и на какой стадии иммунного ответа действуют.

В целом все многообразие функций антител можно свести к четырем основным (рис. 22):

1) нейтрализация патогенов и их токсинов (например, блокада контакта патогенов с клетками эпителиальных пластов слизистых оболочек — IgA или нейтрализация различных токсинов при помощи IgM);

2) опсонизация и усиление фагоцитоза патогенов (взаимодействие комплексов IgG-антиген и Fcγ-рецепторов на поверхности фагоцитов в очаге воспаления);

3) антителозависимая клеточная цитотоксичность (вирус-специфические или опухоль-специфические IgG, связавшиеся с клеткой-мишенью, и Fcγ-рецепторы на поверхности НК-клеток);

4) активация каскада комплемента — данная функция связана в первую очередь с сывороточными антителами классов IgM и IgG, образовавшими иммунные комплексы со специфическими антигенами, которые могут находиться как в жидкой фазе, так и на поверхности клеток-мишеней. При этом можно выделить три аспекта, связанных с активацией каскада комплемента, так как данный белковый каскад участвует в:

а) дополнительной опсонизации патогена и усилении его поглощения при помощи фагоцитоза за счет C3 и его производных, к которым на поверхности фагоцитов имеются специфические рецепторы;

б) усилении воспаления за счет формирования анафилатоксинов C3a и C5a, привлекающих и активирующих лейкоциты в очаге проникновения патогена;

в) сборке мембраноатакующего комплекса и лизисе клеток-мишеней.

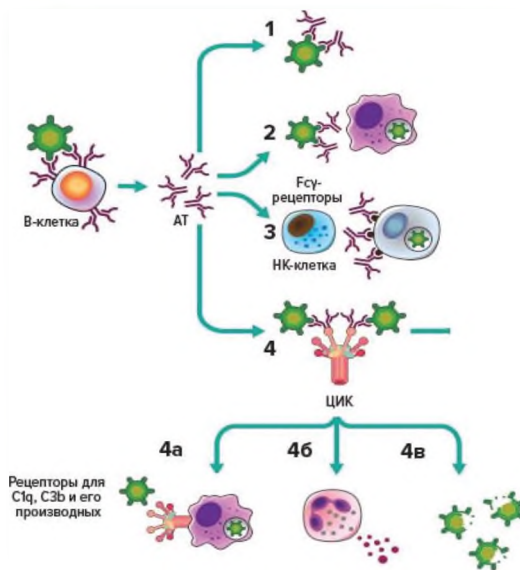


Рис. 22. Основные функции секретируемых антител при реализации гуморальных реакций

Глава 2. Локальный иммунитет



Основной задачей иммунной системы является предотвращение действия различных патогенов на организм человека. При этом защита должна осуществляться и чаще всего осуществляется без формирования заболевания.

С современных позиций болезнь — это нарушение нормальной жизнедеятельности организма, возникающее вследствие наследуемого генетического дефекта и/или действия на организм повреждающего фактора, характеризующееся развитием закономерного динамического комплекса взаимосвязанных патогенных и адаптивных изменений, а также ограничением диапазона биологических и социальных возможностей индивида. Хотя здоровье и представляет собой состояние, противоположное болезни, оно может быть связано с ней различными переходными состояниями и не иметь четких границ.

Механизмы возникновения, развития и исходов болезни, переход от здоровья к болезни — процесс динамичный. Необходимо отметить, что основная роль в том, что человек не боится, принадлежит барьерным органам (мукозальному иммунитету) (рис. 23). Его компоненты и механизмы действия описаны выше.

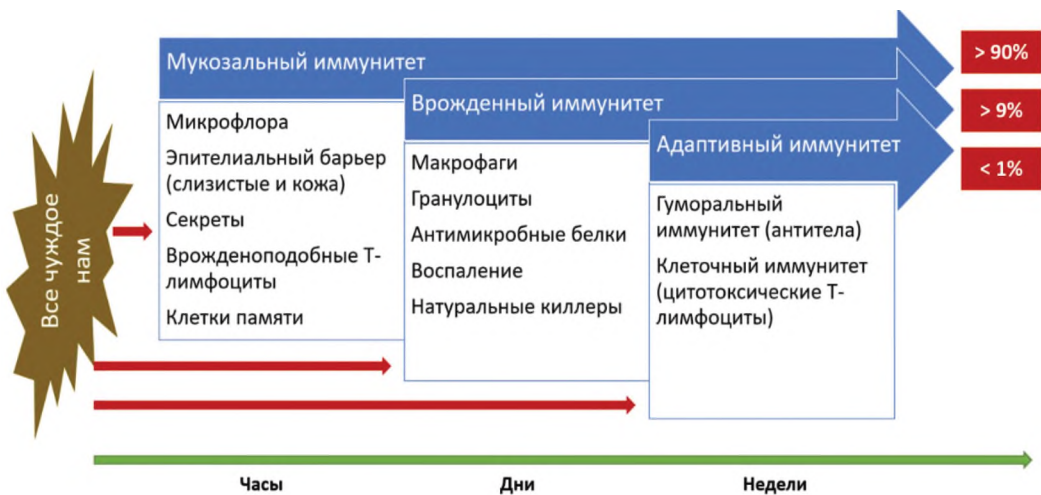


Рис. 23. Роль различных факторов иммунитета в развитии заболевания

Любой повреждающий агент-фактор, который по силе и длительности превосходит адаптационные возможности ткани, может вызвать ответную защитную реакцию организма. Эти факторы принято делить на внешние (экзогенные — микроорганизмы, химические вещества, физические воздействия) и внутренние (эндогенные — появляющиеся в самом организме в результате патологического процесса). Защитная реакция направлена на то, чтобы не допустить распространения патогена, ограничив и уничтожив его на месте проникновения, привлекая факторы всего организма (в отличие от мукозального иммунитета, где реакции обычно ограничиваются «местными» клетками и молекулами). Это достигается, прежде всего, воспалением.

Воспаление

Воспаление представляет собой скоординированный каскад системных иммунных, эндокринных и неврологических реакций, возникающий в случае, когда повреждающий агент по силе и длительности превосходит барьерные возможности ткани, проявляется в локальных и системных реакциях, направленных на устранение патогена и максимального восстановления зоны повреждения.

Несмотря на многообразие факторов, вызывающих воспалительную реакцию, закономерности ответа на повреждение, которые происходят в тканях, однотипны (рис. 24).

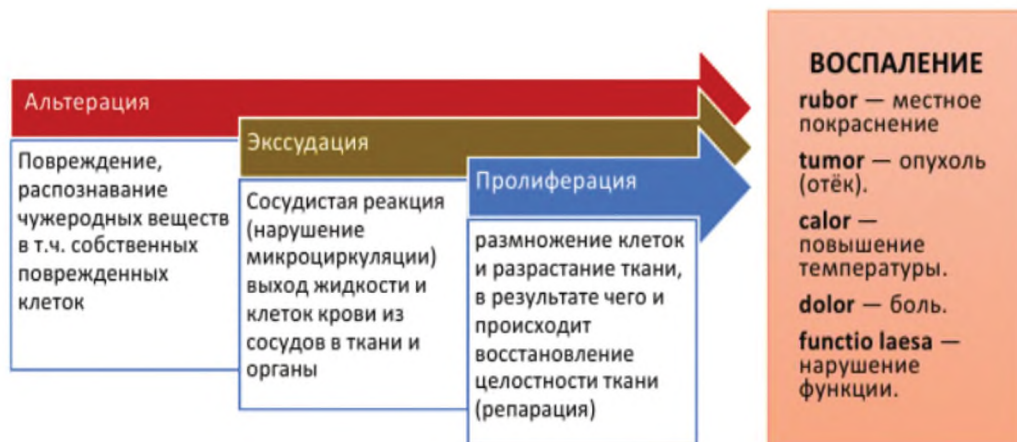


Рис. 24. Этапы воспаления

Альтерация и распознавание патогена

Воспаление всегда начинается с повреждения ткани и распознавания чужеродных веществ. При этом причина повреждения клеток (некроз) может быть различной этиологии — физической, химической, вирусной и т. д. С первичным повреждением всегда связано вторичное, которое возникает из-за запрограммированной гибели клеток. Механизмы такой гибели достаточно обширные (табл. 20).

Таблица 20

Виды клеточной гибели

Вид	Механизм
Некроз	Местная гибель ткани за счет экзогенных и/или эндогенных факторов, приводящих к нарушению целостности клеточной мембраны и высвобождению продуктов гибели клеток (DAMP) во внеклеточное пространство с развитием воспаления
Некроз, зависимый от проницаемости митохондрий (MPT)	При сильном окислительном стрессе (ОС) и значительном повышении концентрации ионов кальция в цитозоле происходит исчезновению электрохимического градиента на мембране митохондрий с их разрушением
Некроптоз	Запрограммированная форма некроза, воспалительная гибель клеток в результате клеточного повреждения или инфильтрации патогенами
Пироптоз	Под воздействием бактериальных липополисахаридов и активации каспазы в мембране формируются поры с последующей гибелью клетки
Ферроптоз	Иницированное окислительными нарушениями повреждение клеточных липидов из-за ионов железа, некроз с повреждением митохондрий
Партанатоз	Независимая от каспаз гибель клеток за счет активации PARP1 [Поли (АДФ-рибоза)-полимеразы] фермента, обнаруживающего повреждение ДНК, с последующей биоэнергетической катастрофой и деградацией ДНК
Лизосомальная гибель клеток (LDCD)	При повреждении лизосом происходит высвобождение в цитоплазму их содержимого (протеолитические ферменты), за счет чего активируются внутриклеточные каскады, приводящие к гибели клетки
Иммуногенная клеточная гибель	Гибель клетки, которая определяется активацией адаптивного иммунного ответа
Немоз	Процесс активации и гибели фибробластов создает большое количество медиаторов воспаления (простагландины)
Апоптоз: внешний и внутренний	За счет внешних сигналов (рецепторный путь) и/или выхода апоптогенных белков из митохондрий в цитоплазму клетки (митохондриальный путь) клетка под действием каспазного каскада распадается на отдельные апоптотические тельца, которые фагоцитируются макрофагами и расщепляются в их лизосомах без воспаления
Аноиксис	Специфический вариант внутреннего апоптоза, инициированного потерей интегринзависимого закрепления
Митотическая смерть	Внутренний апоптоз, вызванный митотической катастрофой
Эриптоз	Гибель эритроцитов, которая возникает в поврежденных эритроцитах из-за различных факторов, включая гиперосмолярность, ОС, истощение энергии, воздействие тяжелых металлов или ксенобиотиков
Аутофагия	Компоненты клетки захватываются лизосомой (микроаутофагия), окружаются мембраной и, сливаясь с лизосомами (макроаутофагия) или в денатурированные белки, доставляются в лизосомы шаперонами (шапероновая аутофагия). Остатки клетки (дебрис) поглощаются макрофагами
Эффероцитоз	Механизм захвата и удаления мертвых клеток и их фрагментов фагоцитами
Энотическая гибель клеток	Возникает в результате актомиозинзависимой интернализации клетки, в клетке (энтоз) осуществляется лизосомами
Корнификация	Клетки внешнего слоя эпидермиса погибают за счет накопления кератина, образуя роговой слой (слой мертвых кератиноцитов — ороговевание)
Параптоз	Гибель клеток за счет активации митогенактивированной протеинкиназы и N-концевой киназы с внутриклеточным образованием вакуолей и набуханием митохондрий

Можно выделить шесть групп молекулярных механизмов, имеющих большое значение в патогенезе повреждения клетки.

1. Липидные механизмы повреждения клетки, происходящие за счет перекисного окисления липидов (ПОЛ), активации мембранных фосфолипаз и детергентного действия свободных жирных кислот.

2. Кальциевые механизмы — повреждение клетки обусловлено повышением концентрации ионов кальция в ее цитоплазме. В основе такого повышения могут лежать два механизма: избыточное поступление Ca^{2+} в цитоплазму и нарушение удаления их из цитоплазмы.

3. Электролитно-осмотические механизмы обусловлены сдвигами в содержании главных клеточных катионов (Na^+ и K^+).

4. Ацидотические механизмы — в основе этой группы механизмов повреждения лежит увеличение концентрации ионов водорода в клетке, т.е. внутриклеточный ацидоз.

5. Протеиновые механизмы, включающие в себя ингибирование ферментов, денатурацию и протеолиз, осуществляющийся под действием лизосомальных гидролитических ферментов (катепсинов) и Ca^{2+} -активируемых протеаз.

6. Основу нуклеиновых механизмов повреждения клеток составляют нарушения трех процессов: репликации ДНК, транскрипции и трансляции.

На субклеточном уровне реализация рассмотренных выше молекулярных механизмов повреждения клетки приводит к нарушению строения и функции отдельных ее органелл. Поскольку большинство из них относится к мембранным образованиям, универсальным механизмом повреждения субклеточных структур является нарушение проницаемости и целостности клеточных мембран.

Повреждение цитоплазматической мембраны может проявляться нарушениями ее барьерной функции, расстройствами систем активного транспорта веществ (Na^+ , K^+ - и Ca^{2+} -насосов, Na^+ , Ca^{2+} - и Na^+ , H^+ -обменных механизмов и др.), изменениями белков, образующих специфические каналы ионной проводимости, повреждением рецепторных макромолекул, воспринимающих внешние регуляторные сигналы, нарушениями белковых комплексов, осуществляющих межклеточные взаимодействия, и, наконец, изменениями гликопротеидов, определяющих антигенность клетки.

Наиболее характерными проявлениями повреждения митохондрий являются эффекты разобщения окисления и фосфорилирования и угнетение клеточного дыхания. Основной патогенетический фактор разобщения окисления и фосфорилирования — нарушение барьерной функции внутренней митохондриальной мембраны, в результате чего не может быть реализован механизм сопряжения клеточного дыхания и ресинтеза аденозинтрифосфата (АТФ).

Повреждение эндоплазматического ретикулума проявляется нарушениями свойственных ему многочисленных функций: синтетической,

детоксикационной, депонирующей и др. Повреждение лизосом сопровождается выходом и активацией многочисленных гидролитических ферментов, в результате чего повреждение клетки становится необратимым, происходит ее аутолиз. С повреждением микротрубочек и микрофиламентов могут быть связаны изменения формы клетки, нарушение ее подвижности, угнетение процессов клеточного деления.

Воспаление начинает формироваться с процесса **распознавания чужеродных веществ**, образуемых при повреждении ткани. Чужеродным веществом выступают патогенные микроорганизмы, которые имеют молекулярные структуры, отсутствующие в организме человека, — PAMP [pathogen-associated molecular patterns (образы патогенности), чужеродные структуры патогенов]. Это пептидогликаны, ЛПС (липополисахариды), липопротеины, липотейхоевая и тейхоевая кислоты, флагеллин, нуклеиновые кислоты вирусов и бактерий, вирусные белки и др., являющиеся составными частями микроорганизма.

Помимо патогенов, иммунная система распознает и нейтрализует молекулярные структуры, связанные с повреждением собственных тканей — DAMP [danger-associated molecular patterns (образы опасности), эндогенные вещества клеток (белки теплового шока, белки S100, фибриллы амилоида-β, дефенсины, кателицидины, галектины, аннексины, тимозины, цитокины (ИЛ-1α и ИЛ-33), хроматинсвязанный белок HMGB1, мочевая кислота и др., образуемые при повреждении клеток и клеточном стрессе)]. В зависимости от функции рецептора и их лигандов выделяют различные рецепторы врожденного иммунитета (табл. 21).

Таблица 21

Рецепторы врожденного иммунитета

Рецептор	Лиганд	Функция
Рецепторы распознавания образов (PRR)	Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP)	Посредством производства цитокинов инициируют воспаление
Киллер-активируемые и киллер-ингибируемые рецепторы (KAR и KIR)	MHC I + молекулы стресса (MICA и MICB), лектины С-типа и пр.	Позволяют NK-клеткам идентифицировать аномальные клетки-хозяева (KAR) или подавлять несоответствующее разрушение клеток-хозяев (KIR)
Рецепторы комплемента	Белки комплемента, например микробов	Позволяют фагоцитам и В-клеткам распознавать микробы и иммунные комплексы
Рецепторы Fc	Комплексы эпитоп–антигено	Стимулируют фагоцитоз
Цитокиновые рецепторы	Цитокины	Регулируют и координируют иммунные ответы

В процессе разрушения клеток выходит большое количество DAMP, которые совместно с PAMP распознаются макрофагами, эпителиальными клетками и кератоцитами с формированием в них инфламмасом (цитозольный мультибелковый олигомер, ответственный за активацию воспалительных реакций) с активным синтезом провоспалительных цитокинов и инициации пироптоза. Все эти рецепторы составляют группу рецепторов врожденного иммунитета. Рецепторы врожденного иммунитета одинаковы у разных людей, ограничены по количеству и разнообразию.

Помимо PAMP и DAMP, которые могут распознаваться разными рецепторами, иммунная система способна распознавать и индивидуально формировать рецепторы (иммуноглобулиновые и/или специальные TCR совместно с молекулами MHC II класса) к генетически чужеродным молекулярным структурам — антигенам (АГ). Это длительный и сложный процесс, зависящий от многих факторов, но способный обеспечить распознавание молекулярной структуры любой природы. Принято выделять экзогенные и эндогенные АГ. Экзогенные АГ — инфекционные и паразитарные молекулярные структуры вирусов, риккетсий, бактерий, грибов, одно- и многоклеточных паразитов и неинфекционные чужеродные белки; белоксодержащие соединения; антигены и гаптены в составе пыли, пищевых продуктов, пыльцы растений, ряда лекарственных средств, перерабатываемые антигенпрезентирующими клетками с презентацией АГ. Подобные реакции могут запускать и собственные структуры организма, распознанные как чужеродные (поврежденные белки и содержащие белок собственные клетки, неклеточные структуры и жидкости организма при конъюгации с ними гаптенных в результате мутаций, приводящих к синтезу аномальных белков, при сбоях иммунной системы). Функционально необходимо выделить антигенраспознающие рецепторы и рецепторы Т-клеток (табл. 22).

Таблица 22

Рецепторы адаптивного иммунитета

Рецептор	Лиганд	Функция
Антигенраспознающие рецепторы	Эпитопы (антигенные детерминанты)	Дифференцировка В-клеток в плазматические клетки и пролиферация
Рецепторы Т-клеток	Линейные эпитопы, связанные с MHC	Активация Т-клетки

Рецепторы распознавания патогенов

Локальный иммунный ответ основан на распознавании чужеродных агентов с помощью специальных патогенраспознающих рецепторов (PRR) экспрессирующих в основном на клетках врожденного иммунитета (эпителиальные

клетки, макрофаги, моноциты, ДК, нейтрофилы и пр.). Они напрямую распознают специфические молекулярные структуры на поверхности патогенов, апоптотических клеток, поврежденных и стареющих клеток. Благодаря распознаванию и связыванию лигандов PRR осуществляют иммунозащитные эффекты.

PRR состоят из доменов распознавания лиганда, промежуточных доменов и эффекторных доменов. Распознавая и связывая соответствующие лиганды через свои эффекторные домены, PRR привлекают адапторные молекулы, инициируя нижестоящие сигнальные пути для оказания множества эффектов: рекрутирование и высвобождение цитокинов, хемокинов, гормонов и факторов роста; индуцирование хронического воспаления; формирование воспалительного микроокружения; инициирование врожденного иммунного уничтожения и последующего приобретенного иммунного ответа с поддержанием баланса микроэкологии хозяина; удаления мертвых или мутировавших клеток.

Распознавание и связывание PRR с лигандами не только имеет решающее значение в инициации и правильном функционировании врожденного иммунитета, но и опосредованно осуществляет своевременную инициацию антигенспецифического адаптивного иммунного ответа.

По функции все PRR могут быть разделены на сигнальные и эндоцитозные (рис. 25). Первая группа рецепторов позволяет выявлять патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMP) и/или молекулярные структуры, связанные с повреждением, — DAMP. Вторая группа рецепторов — эндоцитозные PRR — обеспечивает процессы фагоцитоза и последующую доставку патогена в лизосомы (начало адаптивного иммунного ответа) и активирует эффероцитоз (узнавание и поглощение апоптотических клеток).

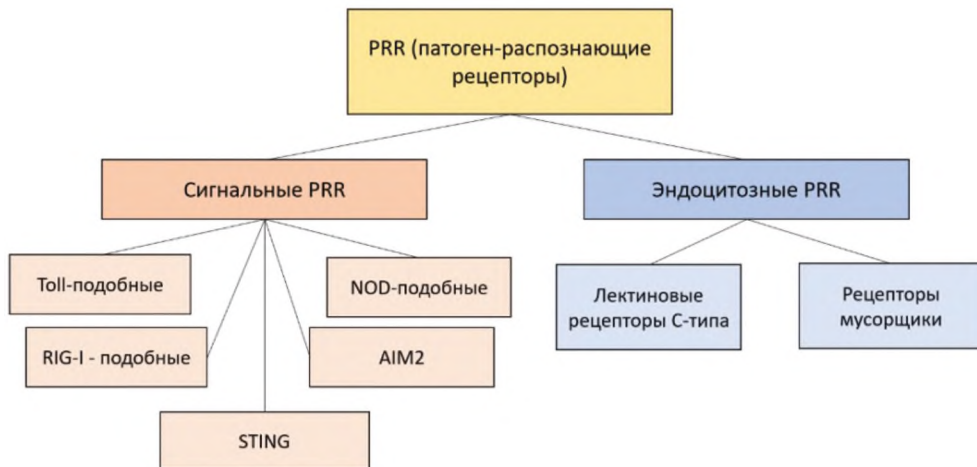


Рис. 25. Разновидности патоген-распознающих рецепторов

По гомологии белковых доменов PRR можно разделить на пять типов:

- TLR;
- рецепторы, подобные домену олигомеризации нуклеотидов (NLR);
- индуцируемые ретиноевой кислотой ген-1-подобные рецепторы (RLR);
- лектиновые рецепторы С-типа (CLR);
- отсутствующие в меланоме-2 (AIM2)-подобные рецепторы (ALR).

Особым сенсором является стимулятор генов интерферона (STING).

Отдельную группу составляют рецепторы распознавания образов (PRM), которые обладают в основном эффекторными, реже — регуляторными механизмами действия.

Toll-подобные рецепторы

TLR — это класс сигнальных клеточных патоген-распознающих рецепторов с одним трансмембранным фрагментом, способных распознавать патоген-ассоциированные молекулярные структуры, специфичные для больших групп патогенов, и/или молекулярные структуры, связанные с повреждением, с последующим продуцированием и секрецией различных провоспалительных и противовирусных факторов (табл. 23).

TLR представляют собой трансмембранные гликопротеины типа I и состоят из внеклеточной области, трансмембранной области и внутриклеточной области (TIR-домен). Внеклеточная область содержит повторы, богатые лейцином (LRR), которые ответственны за распознавание специфических лигандов и выполняют распознавание внеклеточного паттерна. TLR активируются различными лигандами. Типы TLR перекрывают практически весь спектр структурных компонентов бактерий, вирусов и грибов. После активации TLR происходит их олигомеризация. Олигомерный рецептор способен связывать несколько внутриклеточных адаптерных белков, которые обеспечивают последующую передачу сигнала. Всего существуют 5 адаптерных белков с TIR-доменом: MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM и SARM. Различные рецепторы имеют свой набор этих адаптерных белков, необходимых для передачи сигнала. Адаптерные белки связываются со специфическими ферментами-киназами (IRAK1, IRAK4, TBK1 или IKKi), которые значительно усиливают сигнал и приводят в итоге к индукции конкретных генов, которые определяют воспалительный ответ клетки.


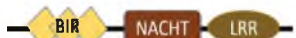
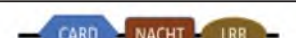


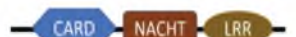






NOD-подобные рецепторы (NLR) — большое семейство внутриклеточных рецепторов, имеющих общий консервативный центральный нуклеотид-связывающий домен олигомеризации (NACHT), С-концевую область, содержащую богатые повторы лейцина (LRR), участвующие в распознавании молекулярных паттернов, и переменный N-концевой эффекторный домен (табл. 24).

Таблица 23

Толл-подобные рецепторы

Рецептор	Лиганд	Локализация	Экспрессия на клетках
Расположены на клеточной поверхности			
TLR1 CD281	Различные триацллипопептиды	Бактерии	Моноциты/макрофаги, ДК, В-лимфоциты
TLR2 CD282	Гликолипиды, липопротеины, липопептиды, липотейхоевая кислота	Бактерии	Моноциты/макрофаги, миелоидные ДК, тучные клетки
	Пептидогликан	Грам(+) бактерии	
	HSP70	Клетки хозяина	
	Зимозан	Грибы	
TLR4 CD284	Липополисахарид	Грам(-) бактерии	Моноциты/макрофаги, миелоидные ДК, тучные клетки
	Белки теплового шока Hsp60 и Hsp70	Бактерии, клетки хозяина	
	Фибриноген, фрагменты гепарансульфата и гиалуроновой кислоты	Клетки хозяина	
	Белковая оболочка вирусов	Вирусы	
TLR5 TIL3	Флагеллин	Бактерии	Моноциты/макрофаги, ДК, эпителий кишечника
TLR6 CD286	Диациллипопептиды	Микоплазма	Моноциты/макрофаги, тучные клетки, В-лимфоциты
TLR10 CD290	Неизвестно	Неизвестно	Моноциты/макрофаги, В-клетки
Внутриклеточная локализация			
TLR3 CD283	Двухцепочечная РНК, полимер — поли (I:C)	Вирусы	ДК, В-лимфоциты
TLR7	Имидазохинолин, локсорибин (аналог гуанозина), бропиримин	Синтетические компоненты	Моноциты/макрофаги, плазмацитоидные ДК, В-лимфоциты
	Одноцепочечная РНК	Вирусы	
TLR8 CD288	Синтетические компоненты; одноцепочечная РНК	Вирусы	Моноциты/макрофаги, ДК, тучные клетки
TLR9 CD289	Неметилированные участки CpG ДНК	Бактерии	Моноциты/макрофаги, плазмацитоидные ДК, В-лимфоциты

NOD-подобные рецепторы

Семейство	Рецептор	Белковая структура	Функции	
NLRA	CIITA		Экспрессия гена MHC II класса	
NLRB	NAIP		Распознавание PAMP, ингибирование апоптоза, активация воспаления NLR4 Inflammasome	
NLRC	NOD1		Активация NF-κB, вызывает апоптоз и аутофагию, кишечный гомеостаз	
	NOD2		Активация NF-κB, регуляция IFN и аутофагии, кишечный гомеостаз	
	NLRC3		Ингибирование Т-клеток	
	NLRC4		Активация воспаления	
	NLRC5		Экспрессия MHC I класса, регуляция врожденного иммунного ответа	
NLRP	NLRP1		Активация воспаления	
	NLRP2		Эмбриогенез, инфламмосома (?), негативный регулятор NF-κB	
	NLRP3		Активация воспаления	
	NLRP4		Аутофагия. NF-κB и регулирование IFN	
	NLRP5		Эмбриогенез	
	NLRP6		Отрицательный регулятор NF-κB и IL 1, каноническая и неканоническая инфламмосома	
	NLRP7		Отрицательный регулятор IL1	
	NLRP8		Неизвестный	
	NLRP9		Активация воспаления в ответ на Roatviurs?	
	NLRP10			Отрицательный регулятор каспазы-1
	NLRP11			Отрицательный регулятор путей NF-κB и IFN
	NLRP12	Негативный регулятор канонического и неканонического путей NF-κB		
	NLRP13	Неизвестный		
	NLRP14	Сперматогенез		
NLRX	NLRX1		Индукция АФК, регуляция NF-κB и IFN и воспаление	

В соответствии с природой их N-концевых областей NLR делятся на подсемейства: NLRA содержит кислый домен трансактивации (AD) (подсемейство), NLRB — домен, подобный бакуловирусным ингибирующим повторам (BIR), NLRC — домен активации и рекрутирования каспазы (CARD), NLRP — пириновый домен (PYD), NLRX1 — содержащий сигнал локализации митохондрий.

Функционально NOD-подобные рецепторы можно выделить как:

- транскрипционные трансактиваторы, к ним относятся СИТА, активирующий транскрипцию MHC-II, и NLRC5, контролирующей базальную экспрессию гена MHC I и индукцию IFN γ ;

- активаторы путей NF- κ B и MAPK — NOD1 и NOD2, которые распознают компоненты бактериальных пептидогликанов и мурамилдипептид и через пути NF- κ B и MAPK индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов (TNF, IL-6 и IL-1 β);

- активаторы воспаления — NLRP1, NLRP3, NLRP6 и NLRC4, участвующие в формировании инфламмосомы, которые приводят к активации каспазы 1, необходимой для созревания IL-1 β и IL-18, а также усилению сигнальных путей NF- κ B, JNK и p38 MAPK. Эти NLR обеспечивают активную секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов в пораженном участке, а также опосредуют пироптозную гибель клеток;

- регуляторные NLR — NLRP2, NLRC3, NLRP4, NLRP6, NLRP7, NLRP10, NLRP12 и NLRX1, которые участвуют в негативной регуляции провоспалительных реакций путем ограничения секреции IL-1 β , передачи сигналов NF- κ B и IFN I типа (IFN-I), ингибирующие функции инфламмосом.




RIG-I-подобные рецепторы (RLR)

Индукцируемые ретиноевой кислотой рецепторы, подобные гену I, являются цитозольными РНК-сенсорами, важными для инициации противовирусного иммунитета. Это семейство рецепторов распознавания цитоплазматического паттерна для внутриклеточной вирусной РНК обеспечит защиту от вирусных инфекций в большинстве тканей.

Выделяют три разновидности RLR: RIG-I, MDA5 (белок 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы) и LGP2 (белок лаборатории генетики и физиологии 2). Они содержат структурно консервативную DExD/H-box РНК-хеликазу и C-концевой домен. При этом RIG-I, MDA5 за счет CARD-домена способны индуцировать клеточный ответ. LGP2 неспособен сам иницировать ответ, но необходим для эффективного противовирусного клеточного ответа, опосредованного RIG-I и/или MDA5 во время острой стадии инфекции, и ограничивает передачу сигналов во время разрешения инфекции (табл. 25).

Таблица 25

Структура RIG-I-подобных рецепторов

Рецептор	Белковая структура
RIG-I	
MDA5	
LGP2	

AIM2-подобные рецепторы (ALR) — это группа интерферон-индуцируемых белков: AIM2, также известный как отсутствующий при меланоме 2 (AIM2), IFI16 (индуцируемый интерфероном белок 16), IFIX, также называемый PYHIN1 (белок X, индуцируемый интерфероном, или ген-супрессор опухоли при раке молочной железы), и MNDA (антиген миелоидной ядерной дифференцировки). Каждый член семейства ALR обладает N-концевым пириновым доменом (PYD) и одним или несколькими С-концевыми гемопоэтически индуцируемыми интерферон ядерными белками (HIN, классифицируемыми как HIN A, HIN B и HIN C). Домен HIN связывается с ДНК, PYD опосредует гомотипное белок-белковое взаимодействие, приводящее к связыванию каспазы-1 и формированию инфламмосомы AIM2 (табл. 26).

Таблица 26

Структура AIM2-подобных рецепторов

Рецептор	Белковая структура
AIM2	
IFI16	
IFIX	
MNDA	

Стимулятор генов интерферона

STING работает как прямой датчик чужеродной цитозольной ДНК и как адаптерный белок в передаче сигналов интерферона I типа через различные

молекулярные механизмы. Он индуцирует выработку интерферона типа I при инфицировании внутриклеточными патогенами (вирусы, микобактерии и др. внутриклеточные паразиты). Помимо этого, он также обнаруживает ДНК, полученную из опухоли, и создает внутренний противоопухолевый иммунитет. В некоторых случаях aberrантная активация STING может привести к аутоиммунным и воспалительным заболеваниям.

Эндоцитозные рецепторы

Эндоцитозные рецепторы представлены CLR и рецепторами-мусорщиками (scavenger receptor) (SR).

Лектины (от лат. *legere* — «собирать») — это группа белков и гликопротеинов, обладающих способностью высокоспецифично связывать остатки углеводов на поверхности клеток, участвуют в клеточном распознавании углеводов и белков. Микроорганизмы (бактерии, вирусы и грибы) используют лектины для прикрепления и связывания их клетками-мишенями.

CLR представляют собой кальций-зависимые лектины. Они выполняют широкий спектр функций, включая межклеточную адгезию, иммунный ответ на патогены и апоптоз.

Выделяют две группы CLR: растворимые и трансмембранные. Растворимые CLR циркулируют в плазме или растворены в слизистых секретах. Все они относятся к семейству коллагенсодержащих лектинов (коллектинов) и участвуют в удалении микробов посредством опсонизации, активации системы комплемента, ингибирования роста микробов (см. ниже).

Трансмембранные CLR связаны с клеточной мембраной. После связывания с рецепторами этой группы происходит эндоцитоз патогена. Выделяют две группы CLR.

Первая группа экспрессирует несколько доменов, распознающий углеводы и N-терминальный регион на поверхности клетки. К ней относят рецептор маннозы (CD206), DEC-205 (CD205), Endo180 (CD280), рецептор фосфолипазы A2 M-типа (PLA2R). Рецептор маннозы функционирует на поверхности ДК и макрофагов. Он способен связывать остатки маннозы, фукозы и сульфатированных углеводов, участвует в фагоцитозе и презентации антигенов.

DEC205 присутствует на поверхности ДК и эпителиальных клеток тимуса, участвует в распознавании клеток, погибших в результате некроза и апоптоза. Обеспечивает становление толерантности к собственным антигенам CD8+ и CD4+ Т-клеток, так как инициирует презентацию антигенов как через MHC I-, так и через MHC II-молекулы.

Endo180 (CD280) участвует в поддержании гомеостаза и ремоделировании тканей, при физиологических (эмбриональное развитие, заживление ран, репарация тканей) и патологических состояниях (опухолевый рост, воспаление).

Он способствует внутриклеточной деградации коллагена за счет нефагоцитарного захвата коллагена и направления его в лизосомы.

Трансмембранные CLR 2-й группы содержат единственный домен, распознающий углеводы и внутриклеточную N-терминальную часть. В этой группе выделяют четыре варианта CLR:

1) молекулы, содержащие ITAM-подобный регион (Dectin2, MDL-1, BDCA-2, MinCLE, MCL);

2) молекулы, содержащие сигнальную последовательность Hem-ITAM (Dectin-1, CLEC2, DNGR-1);

3) молекулы, содержащие последовательность ITIM (DCIR, DCIR-1 (DCIR-2), MICL, LY49Q);

4) молекулы, функционирующие независимо от ITAM/ITIM-последовательностей (DC-SIGN, L-SIGN, SIGN-R1, LSICtin, Langerin, MGL, MGL-1).

Как показано выше, репертуар CLR и связанных с ними лигандов огромен. Некоторые ЦТЛ изучаются уже много лет, и, соответственно, связанные с ними лиганды в целом хорошо определены, однако для других многое остается неизвестным.

Рецепторы-мусорщики (SR)

SR представляют собой большое семейство рецепторов клеточной поверхности, которые разнообразны по своей структуре и биологической функции и делятся на разные классы. SR могут связываться с рядом лигандов и усиливать элиминацию измененных или чужеродных мишеней. Функциональные механизмы, которые приводят к их очистке от вредных веществ, включают фагоцитоз, эндоцитоз, адгезию и передачу сигналов. SR считаются PRR, которые распознают не только DAMP, но и патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, включая компоненты клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий, такие как липотейхоевая кислота и липополисахарид, а также β -глюкан из клеточных стенок грибов. Все они объединены общими функциональными свойствами, а не структурной гомологией и генетическим происхождением.

SR подразделяются на 12 классов (от A до J), с различными вариантами, обозначенными арабской цифрой, указывающей тип молекулы внутри класса, варианты сплайсинга молекулы обозначаются точкой и арабской цифрой после типа молекулы внутри класса.

SR класса A (SR-A): SR-A1 (CD204), SR-A1.1, SR-A3, SR-A4, SR-A5 и SR-A6. В основном они экспрессируются на тканевых макрофагах, клетках Купфера, кортикальных и медуллярных макрофагах тимуса, а также на субпопуляциях ДК и венолах с высоким эндотелием на тучных клетках. Рецептор SR-A распознает различные эндогенные и экзогенные лиганды, включая белки теплового шока,

поверхностные молекулы амилоида- β (A β) грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также ацетилированные и окисленные молекулы липопротеина низкой плотности (OxLDL).

SR класса B (SR-B): SR-B1 (CD36L), SR-B2 (CD36). представляет собой интегральный мембранный белок, обнаруженный на поверхности многих типов клеток. Связывает многие лиганды, включая коллаген, тромбоспондин, зараженные *Plasmodium* эритроциты, окисленные липопротеины низкой плотности, нативные липопротеины, окисленные фосфолипиды и жирные кислоты

SR класса D (SR-D) SR-D1 (CD68) экспрессируются на моноцитах и тканевых макрофагах в брюшине, печени, микроглии, легких и селезенке, функционируют как рецепторы-поглотители OxLDL.

SR класса E (SR-E) представляют собой CLR 2-й группы. В структурном отношении они принадлежат к подсемейству рецепторов естественных киллеров (NK). Также SR-E1 экспрессируется на ДК, макрофагах, эндотелиальных клетках сосудов, гладкомышечных клетках, тромбоцитах и адипоцитах. Уникальной характеристикой SR-E1 является его способность связывать СРБ и OxLDL, распознавать PAMPs, в том числе из грамотрицательных и грамположительных бактерий. SR-E2 экспрессируется преимущественно на макрофагах, нейтрофилах и ДК. Он может регулироваться микробными стимулами и цитокинами и служит SR для бактериальных, грибковых и растительных углеводов. SR-E3 участвует в фагоцитозе различных молекул, таких как покрытые маннозой частицы и гликаны на поверхности патогенных микроорганизмов. SR-E4 представляет собой гепатоцеллюлярный поверхностный рецептор, который связывает асиалогликопротеины, представляющие собой гликопротеины, в которых отсутствуют терминальные остатки сиаловой кислоты. Он играет важную роль в связывании, интернализации и транспорте множества гликопротеинов, содержащих остатки N-ацетилгалактозамина или галактозы. Этот рецептор также связывается с различными белками плазмы, включая трансферрин и фибронектин, а также с апоптотическими клетками и ферментами, такими как щелочная фосфатаза. SR-E4 играет роль в удалении циркулирующих десиаилированных белков, что защищает печень от повреждений.

SR класса F (SR-F) были идентифицированы как эндотелиальные рецепторы модифицированных ЛПНП. Они характеризуются наличием множественного внеклеточного эпидермального фактора роста (EGF) и EGF-подобных доменов. Этот рецептор связывает грибковые патогены и белки теплового шока и уничтожает апоптотические клетки. SR-F2 также участвует в клиренсе апоптотических клеток путем связывания белка комплемента C1q.

SR класса G (SR-G) представляют собой трансмембранный гликопротеин типа I, который содержит хемокиновые домены CXC и муциноподобные домены. Функционируют как рецепторы для OxLDL и фосфатидилсерина и

опосредуют фагоцитоз бактерий антигенпрезентирующими клетками. Уникальной характеристикой SR-G1 является наличие растворимой формы, которая продуцируется расщеплением мембранного домена, и эта форма служит хемоаттрактантом для плазматических клеток костного мозга и Т-клеток через свой рецептор CXCR6. Это единственный известный белок с комбинированной активностью SR и хемокина.

SR класса H (SR-H) в основном экспрессируются на макрофагах, гемопоэтических СК, мононуклеарных клетках и эндотелиальных клетках. SR-H2 экспрессируется на синусоидальных эндотелиальных клетках. Они выполняют двойную функцию, поскольку являются фагоцитарными рецепторами, а также участвуют в клиренсе апоптотических клеток и старых эритроцитов макрофагами. Кроме того, эти SR опосредуют межклеточные взаимодействия во время адгезии лимфоцитов, внутриклеточного переноса и ангиогенеза.

SR класса I (SR-I): SR-I1, SR-I2, SR-I3. SR-I1 преимущественно экспрессируются на макрофагах и моноцитах, играют особую гематологическую роль, связываясь с комплексами гаптоглобин-гемоглобин, для увеличения клиренса гемоглобина посредством эндоцитоза, связывают грамположительные и грамотрицательные бактерии, участвуют во внутриклеточной передаче сигналов через киназы, что приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и IL-10. Используются в качестве маркера периваскулярных макрофагов в головном мозге, что позволяет отличать их от микроглии. SR-I2 экспрессируются клетками миелоидного ряда и участвуют в дифференцировке моноцитов в макрофаги. SR-I3 экспрессируются $\gamma\delta$ и $\alpha\beta$ Т-клетками, а также в толстой и тонкой кишке.

SR класса J (SR-J). SR-J1 являются членами суперсемейства иммуноглобулинов (Ig), которые могут связывать конечные продукты усиленного гликирования (AGE), белок S-100 и белок группы высокой подвижности box-1 (HMGB1). Передача сигналов SR-J1 может опосредовать ОС, воспаление и апоптоз, и эти события могут быть связаны с патогенезом ряда заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания, атеросклероз, инсульт и диабет. SR-J1.1 представляют собой биологически активную растворимую форму SR-J1.

SR класса K (SR-K) SR-K1 являются первичными рецепторами гиалуронана, важного компонента внеклеточного матрикса. Между SR-K1 и другими SR нет общих конструктивных особенностей. SR-K1 опосредуют клиренс лигандов внеклеточного матрикса посредством эндоцитоза.

SR класса L (SR-L). SR-L1 являются основными рецепторами клиренса холестерина плазмы. SR-L2 экспрессируются на апикальной мембране эпителиальных клеток в легких, проксимальных канальцах почек, желчном пузыре и щитовидной железе, а также в чувствительных к стероидам тканях, таких как матка, яичники, предстательная железа и придаток яичка. Они также экспрессируются

на гематоэнцефалическом барьере, где связывают и интернализуют многие лиганды, такие как инсулин, лептин и Аβ.

Помимо вышеописанных SR, имеются и другие потенциальные SR. Они обладают активностью поглотителя, но не принадлежат к современным классам SR. Эти рецепторы включают CD11b/CD18α и CD14. CD11b/CD18α представляет собой рецептор, экспрессируемый макрофагами и микроглией, и может распознавать различные лиганды, такие как LPS, фибриноген и Аβ, и способствовать их клиренсу. CD14 представляет собой гликозилфосфатидилинозитол-связанный белок, экспрессируемый на полиморфноядерных лейкоцитах и моноцитах. Как и другие SR, CD14 связывают несколько лигандов, таких как LPS и липидизированные фрагменты микробной клеточной стенки, и помогают в их клиренсе.

Внеклеточные растворимые молекулы распознавания патогенов

Это большая группа молекул, которые после синтеза не остаются связанными с клеткой, которая их производит, а работают, автономно обладая в основном эффекторными функциями.

В отличие от PRR, связанных с клетками, внеклеточные растворимые PRM являются важной частью неспецифического гуморального иммунитета. Внеклеточные растворимые PRM состоят из различных молекулярных семейств: это белки комплемента (см. выше), коллектины (лектин, связывающий маннозу (MBL), белки сурфактанта, А и D, коллектин 1 печени (CL-L1), коллектин 1 плаценты (CL-P1), конглоутинин, 43-кДа коллектин (CL-43) и 46-кДа коллектин (CL-46), фиколины [М-фиколин (моноцитарный фиголин или фиголин-1)]; L-фиголин (фиголин печени или фиголин-2); Н-фиголин (антиген Хаката или фиголин-3); пентраксины [короткие — СРБ, сывороточный амилоид Р (SAP), длинные — пентраксин 3 (PTX3)], галектины (лектины, связывающие β-галактозиды), растворимый CD14 и TLR, лизоцим и пр.

Обычно они функционируют двумя способами: во-первых, они распознают различные патогенные факторы и устраняют их посредством активации комплемента, опсонизации, агрегации и нейтрализации воспалительной регуляции; во-вторых, они взаимодействуют с клеточными PRR и регулируют их функции, чтобы совместно регулировать врожденный иммунный ответ.

Процесс взаимодействия между патогенными молекулами и иммунной системой происходит по рецепторному типу. В качестве лиганда выступают молекулярные вещества (PAMP, DAMP, АГ), которые образуют комплекс с клеточным рецептором, отвечающим за обнаружение такого лиганда, после чего происходит связывание с адапторными молекулами (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM, SARM) и привлечением киназ семейства IRAK (IRAK 1–4), в результате чего происходит активация NF-κB (ядерного фактора «каппа-би») и MAP-киназ,

основных регуляторов генов иммунного ответа, интерферонов α и β , апоптоза и клеточного цикла.

Уже при первом контакте эпителиальные клетки имеют патоген-распознающие рецепторы, позволяющие выявлять PAMP (рис. 26). Взаимодействие PRR с PAMP и/или DAMP через последовательную активацию адапторных белков, протеинкиназ и транскрипционных факторов приводит к синтезу и секреции цитокинов (ИЛ-1, -2, -6, -8, -12, TNF- α , IFN- γ , ГМ-КСФ). За счет этого происходит активация самих клеток, несущих PRR, значительно усиливается их защитный потенциал (активируется продукция противомикробных пептидов и комплемента, усиливаются фагоцитоз, переваривающая активность, продукция ROS).

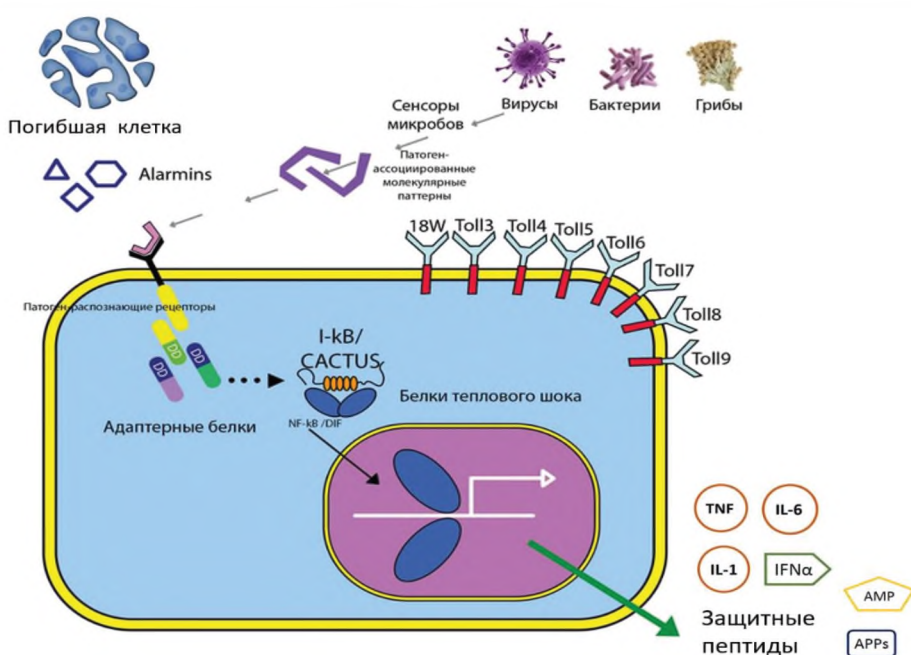


Рис. 26. Упрощенная схема активации эпителиальных клеток

Эпителиальные клетки в основном имеют сигнальные PRR. Однако от их способности синтезировать защитные пептиды, обеспечить доступ лейкоцитов к тканям зависит исход развития заболевания.

Подобные PRR экспрессируются и на других клетках, находящихся в тканях, и, прежде всего, на тканевых гранулоцитах (тучные клетки, базофилы, эозинофилы), системе мононуклеарных фагоцитов (моноциты, макрофаги и ДК), группе тканевых лимфоцитов и других неиммунных клеток (эндотелиальные клетки, фибробласты и др.). Именно активный синтез цитокинов привлекает периферические нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и тучные клетки к

субэпителиальным областям кишечника и ускоряет активацию и дифференцировку местных лимфоцитов.

Процесс взаимодействия между патогенными молекулами и иммунной системой происходит по рецепторному типу. В качестве лиганда выступают молекулярные вещества (PAMP, DAMP, АГ), которые образуют комплекс с клеточным рецептором, отвечающим за обнаружение такого лиганда.

После чего в клетке происходит серия биохимических реакций, инициируемых стимулом (первый мессенджер), передаваемым внутрь клетки через вторичные мессенджеры, которые усиливают сигнал и направляют его эффекторным молекулам, заставляя клетку реагировать на первоначальный стимул в виде биохимических, физиологических или фармакологических эффектов (рис. 27).

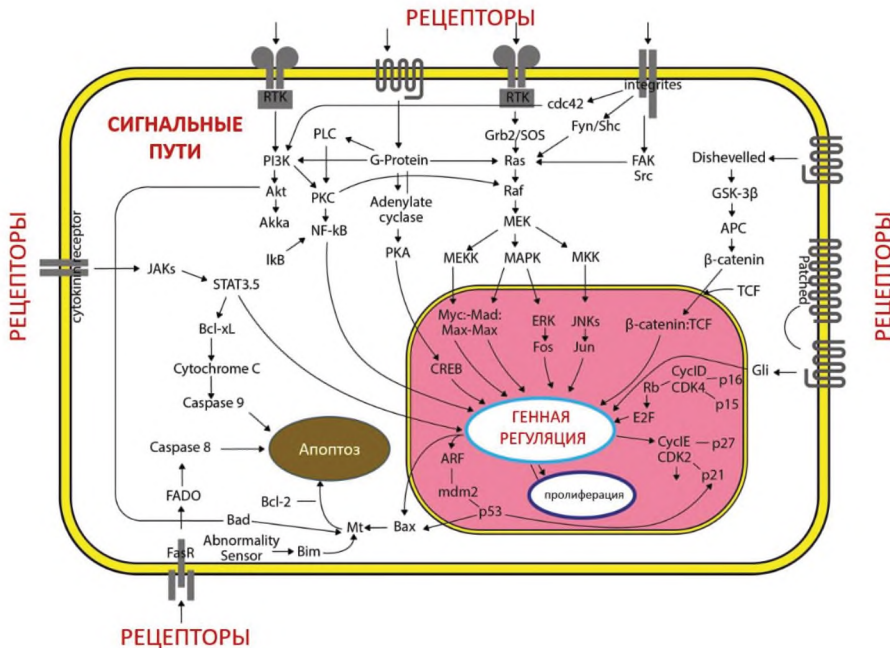


Рис. 27. Передача сигнала

Происходит активация большого количества клеток с формированием сосудистой и клеточной реакции. На повреждение отвечают все элементы ткани: микроциркуляторные единицы (артериолы, капилляры, венулы), соединительная ткань, тучные и нервные клетки; формируется воспаление.

Сосудистая реакция и экссудация

Сосудистая реакция начинается со **спазма сосудов** — кратковременной реакции, которая переходит в фазу артериальной гиперемии (более длительная). Гиперемия — это усиленное кровенаполнение ткани за счет увеличенного

притока крови: возрастает скорость кровотока, повышаются давление в сосудах и интенсивность обмена веществ в капиллярах. Отсюда внешние признаки воспаления в этой фазе — покраснение, местный жар (повышение температуры), боль, вызванная действием медиаторов. Уже на этой стадии начинается процесс экссудации.

Под действием медиаторов происходит выход жидкой части плазмы за пределы сосуда — **экссудация**. Экссудат содержит большое количество белка в связи с нарушением проницаемости сосуда. Он сдавливает вены, и происходит смена артериальной гиперемии на венозную. Чем больше экссудата, тем более выражены явления венозного застоя. Венозная гиперемия постепенно переходит в венозный стаз. Именно в этой фазе происходят значительные изменения поврежденной ткани — так называемые явления вторичного повреждения. Любой венозный застой сопровождается **гипоксией**: переход на анаэробный процесс окисления — гликолиз, возникновение ацидоза за счет недоокисленных продуктов, т.е. те изменения, которые характерны для первичного повреждения. Накопление кислых продуктов в фазу венозного застоя достигает колоссального количества. Наблюдается резко выраженный **ацидоз** (сдвиг рН до 6,0–5,8), а такой сдвиг рН уже непереносим клетками, и они погибают. В центре очага воспаления возникает **некроз**. При незначительном повышении концентрации водородных ионов (на периферии очага воспаления), нелетальных повреждений клеток незначительный сдвиг рН стимулирует разрастание грануляционной ткани — образуется **грануляционный вал** на периферии, здоровая ткань отграничивается от поврежденной. Она богата фиксированными макрофагами, способна поглощать поврежденные клетки, токсины, очищая очаг.

Вторичное повреждение также проявляется **гиперосмией** и **гиперонкией**. Развитие гиперосмии определяется усиленным катаболизмом и распадом тканей. Распад белковых частиц, жиров, углеводов, выброс калия из клеток с усилением диссоциации солей создают высокую осмотическую концентрацию — гиперосмию. Гиперонкия — увеличение концентрации белков за счет распада ткани, экссудации плазменных белков из сосудов с нарушенной проницаемостью. Эти явления создают порочный круг, усиливая процесс экссудации. Белки как бы притягивают воду, а гиперосмия является повреждающим фактором, который повышает проницаемость стенки сосуда.

При экссудации изменяются биологические свойства крови — увеличивается ее вязкость, кровоток замедляется, усиливаются процессы тромбообразования, наблюдается краевое стояние лейкоцитов, которые выстраиваются вдоль сосудистой стенки, а затем наблюдается их миграция в очаг воспаления. Изменение спектра плазменных белков (выход альбумина, повышение концентрации γ -глобулинов, простагландинов и других медиаторов) влияет на состав мембран,

повышает ригидность, преобразует поверхностное натяжение мембран эритроцитов, что усиливает их способность к агрегации (причина ускоренного СОЭ).

Тромбоциты тоже приобретают способность к агрегации, но, в отличие от эритроцитов, этот процесс идет на поверхности сосудистой стенки, в месте ее повреждения. При воспалении происходит ее повреждение, количество простаглицлина, который предотвращает адгезию и агрегацию тромбоцитов, уменьшается, начинаются процессы адгезии и агглютинации тромбоцитов. Из тромбоцитов выделяются тромбоксаны — мощные стимуляторы процессов адгезии и агрегации. В нормальных условиях простаглицлин-тромбоксановая система уравновешена. При воспалении происходят активация фактора Хагемана, уменьшение содержания гепарина, что ведет к коагуляции и множественным **процессам тромбообразования** в очаге воспаления.

Экссудация способствует отграничению очага воспаления, препятствует оттоку токсинов, микробов, распавшихся тканей. В составе экссудата в поврежденную ткань выходят биологически активные вещества, медиаторы, которые способны нейтрализовать токсины, защитные белки, АТ, лейкоциты.

Клеточная миграция

За счет увеличения проницаемости сосудистой стенки происходит проникновение не только белков, но и клеток — клеточная миграция. При этом различные популяции мигрирующих клеток появляются в очаге воспаления в определенном порядке. Первыми, как правило, прибывают нейтрофилы (через 1,5–2 часа). В течение первых суток их популяция преобладает среди пула клеток воспалительного экссудата.

На вторые сутки в очаг начинают поступать мононуклеарные фагоциты и лимфоциты. Позже других мигрируют цитотоксические Т-клетки и В-лимфоциты. Следует отметить, что, как и многие другие процессы при воспалении, миграцию не всегда удается трактовать однозначно. Она изменчива и зависит от целого ряда факторов как эндотелиального, так и лейкоцитарного происхождения. Миграция зависит и от анатомической области, где протекает воспаление, и от присутствия хемотаксических молекул, и от наличия различных цитокинов в тканях (прежде всего хемокинов), и от характера активации мигрирующих клеток (наличие на их поверхности рецепторов), и т.д. В процессах миграции можно выделить несколько основных этапов (рис. 28).

Адгезия лейкоцитов на эндотелии сосудов, осуществляемая за счет молекул межклеточной адгезии (связанные с плазматической мембраной белки, обеспечивающие механическое взаимодействие клеток друг с другом). Выделяют: **интегрины** — молекулы, функционирующие как клеточно-субстратные, так и межклеточные адгезивные рецепторы; **адгезивные рецепторы суперсемейства иммуноглобулинов (ICAM)**, которые участвуют в межклеточной

адгезии, заживлении ран и иммунном ответе; **селектины** (-L, -P и -E), которые обеспечивают

адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам; **адрессины** находятся на мембране эндотелиоцитов — лиганды для селектинов - обеспечивают адгезию клеток к стенке сосуда, и дальнейшее проникновение в очаг поражения; **кадгерины** — кальций-зависимые гомофильные межклеточные адгезивные белки; **хонинговые рецепторы** — молекулы, обеспечивающие попадание лимфоцитов в специфическую лимфоидную ткань.

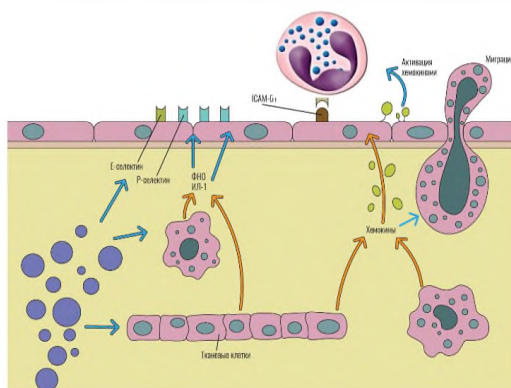


Рис. 28. Клеточная миграция

Трансэндотелиальная миграция лейкоцитов осуществляется под действием медиаторов воспаления, взаимодействия интегринов и молекул адгезии. Клетки преодолевают эндотелиальный слой за счет повышенной сосудистой проницаемости и тока жидкости из сосуда в ткань, а базальные мембраны — за счет лизосомальных протеиназ, растворяющих ее, и катионных белков, изменяющие ее коллоидное состояние.

Хемотаксис — направленная миграция в межклеточном пространстве за счет градиента концентрации хемотаксических веществ в очаге воспаления (продукты протеолиза тканей) и разностью потенциалов между отрицательно заряженным лейкоцитом и положительным зарядом ткани.

Микроциркуляторный гемостаз

В процессе миграции тромбоциты тоже приобретают способность к агрегации, но, в отличие от эритроцитов, этот процесс идет на поверхности сосудистой стенки, в месте ее повреждения. При воспалении происходит ее повреждение, количество простаглицина, который предотвращает адгезию и агрегацию тромбоцитов, уменьшается, начинаются процессы адгезии и агглютинации тромбоцитов. Из тромбоцитов выделяются тромбоксаны — мощные стимуляторы процессов адгезии и агрегации. В нормальных условиях простаглицин-тромбоксановая система уравновешена. При воспалении происходят активация фактора Хагемана, уменьшение содержания гепарина, что ведет к коагуляции и множественным процессам тромбообразования в очаге воспаления. Запускается система свертывания крови (рис. 29).

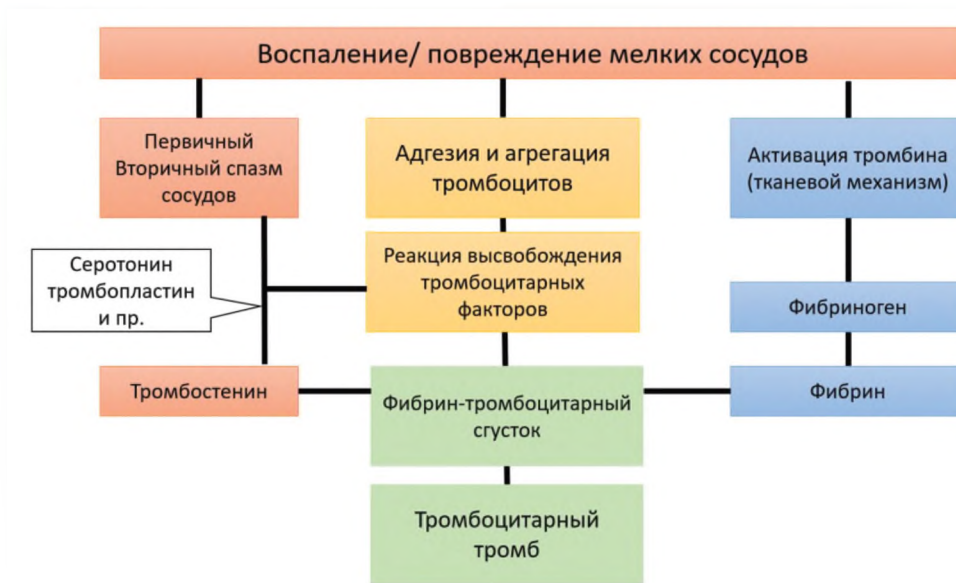


Рис. 29. Микроциркуляторный гемостаз

Действие на систему свертывания крови направлено на усиление свертываемости, которое необходимо для остановки кровотечения и для прямого блокирования патогена.

Система гемостаза — сложный комплекс механизмов, обеспечивающих жидкое состояние циркулирующей крови, ее свертывание в месте повреждения сосуда, формирование сгустка и его растворение. Она включает в себя свертывающую, противосвертывающую и фибринолитическую системы. Для формирования воспаления большое значение принадлежит так называемому сосудисто-тромбоцитарному (микроциркуляторному) гемостазу.

Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз сводится к образованию тромбоцитарной пробки или тромбоцитарного тромба (белого тромба). Можно выделить 3 стадии его развития:

1) временный (первичный) спазм сосудов, обусловленный выбросом в кровь в ответ на болевое раздражение адреналина и норадреналина. В дальнейшем наступает вторичный спазм, обусловленный активацией тромбоцитов с выходом в кровь сосудосуживающих агентов: серотонина, тромбоксана А₂, адреналина и др.;

2) образование тромбоцитарной пробки за счет адгезии (прикрепление к поврежденной поверхности) и агрегации (склеивание между собой) кровяных пластинок;

3) ретракция (сокращение и уплотнение) тромбоцитарной пробки.

Экссудация способствует отграничению очага воспаления, препятствует оттоку токсинов, микробов, распавшихся тканей. В составе экссудата в поврежденную ткань выходят биологически активные вещества, медиаторы, которые способны нейтрализовать токсины, защитные белки, АТ, лейкоциты.

Фагоцитоз

При миграции клетки уже на уровне слизистой оболочки осуществляют активный фагоцитоз. Основными фагоцитирующими клетками являются нейтрофилы, моноциты, ДК и макрофаги.

Под фагоцитозом понимают процесс поглощения объекта с дальнейшим ферментативным разрушением его структуры. Процесс имеет несколько этапов (рис. 30).



Рис. 30. Этапы фагоцитоза

Захваченная клетка или макромолекула подвергается действию целого ряда бактерицидных механизмов обезвреживания. Ряд микробов, будучи фагоцитированы, погибают в анаэробных условиях цитоплазмы. Бактерицидность обусловлена также снижением в вакуолях pH. Лизосомальные ферменты (лизоцим, липазы, нуклеазы, пероксидазы, протеазы, эстеразы, карбогидразы, фосфорилазы, нейраминидаза и др) вызывают деструкцию. Помимо лизосомальных ферментов катионные белки разрушают бактериальную мембрану, лактоферрин, связывает железо, кальпротектин — цинк необходимый для метаболических процессов бактерий.

Мощное бактерицидное действие оказывают супероксиданион, пероксид водорода, синглетный активный кислород и гидроксильные радикалы, возникающие за счет изменения метаболизма. Происходят также усиление окисления глюкозы (гексозомонофосфатный шунт) и генерация восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН), который используется для восстановления молекулярного кислорода, связанного с уникальным мембранным цитохромом. Микробные клетки обычно погибают в фагоцитах в течение нескольких минут. Более того, сочетание пероксида, миелопероксидазы и ионов галогенов создает мощную систему галогенирования, способную вызвать гибель не

только бактерий, но и вирусов. После переваривания бактерий либо продукты деградации высвобождаются из клетки, либо содержимое вакуоли растворяется в цитоплазме и фагоцит аутолизируется.

Весь набор ферментов гранулоцитов может не только действовать внутри клетки, но и высвободиться в окружающие ткани, уничтожая таким образом паразитов, не подвергающихся фагоцитозу по своим размерам.

Нейтрофилы и другие гранулоциты и тучные клетки при особой программируемой смерти могут высвобождают NET, которые в основном состоят из содержимого их клеточных ядер, таких как ДНК и гистоны, и обладают антимикробным действием.

Пути развития иммунного ответа

Острый период любого заболевания может протекать в различных вариантах: бессимптомно или с разнообразными клиническими проявлениями, с развитием осложнений, нарушением функции одного или нескольких органов. Все эти варианты заболевания непосредственно связаны с функцией иммунной системы. Этот феномен хорошо исследован и описан на примере новой коронавирусной инфекции.

Обычно мукозальный иммунитет блокирует инфекцию без развития заболевания. Если патоген преодолевает эту защиту, врожденный иммунитет быстро распознает инфекцию и запускает синтез IFN типа I и связанных с ним молекул (рис. 31А). Врожденный иммунитет ограничивает репликацию вируса в инфицированных клетках, создает локально противовирусную защиту за счет воспаления и привлечения эффекторных клеток врожденной иммунной системы, презентует антигены адаптивному иммунитету. Для адаптивного иммунитета требуется 6–10 дней после «праймирования», чтобы генерировать достаточное количество эффекторных клеток для контроля над вирусной инфекцией. При таком развитии событий Т-клеточные реакции и антитела достаточно быстро контролируют инфекцию и заболевание протекает бессимптомно или в легкой форме (рис. 31Б).



Рис. 31. Варианты развития иммунного ответа

При инфицировании клеток вирусом SARS-CoV-2 с предотвращением или замедлением запуска синтеза интерферонов I и III типа вирус способен поражать другие клетки. Пораженные клетки запускают программируемую клеточную смерть в виде пироптоза. Это воспалительный тип гибели клеток (по типу некроза) с повреждением клеточных мембран и выходом в межклеточное пространство большого количества аларминов или молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMP). Сама вирусная РНК выявляется патоген-распознающими рецепторами (TLR-3, -7, -8, RIG-I, MDA5) и через систему адаптивных белков запускает синтез провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-18, TNF). Распознавание DAMP приводит к активации цитоплазматического комплекса — инфламасомы, позволяющей переводить некоторые провоспалительные цитокины (например, IL-1 β и IL-18) из проформы в активный и готовый для секреции белок. В целом воспаление — это необходимая часть иммунного ответа, без которой успешное разрешение инфекционного процесса и прекращение повреждения клеток невозможны, однако в некоторых случаях обычно на 7–10-е сутки болезни наблюдается ухудшение состояния пациентов. Нарастают лихорадка, одышка, повышаются острофазовые маркеры воспаления (СОЭ, СРБ, ферритин), развиваются коагулопатии (повышение концентрации D-димера) и цитолиз (повышение активности АЛТ, АСТ, КФК, ЛДГ). Это все проявления синдрома системной воспалительной реакции гиперцитокинемии, или цитокинового шторма. Развивающийся цитокиновый шторм приводит к поражению органов и систем и формированию острой полиорганной недостаточности. Если адаптивный иммунный ответ в течение длительного времени не запускается, это приводит к тяжелому заболеванию (рис. 31 В).

При нормальном локальном иммунном ответе IFN I и III типа блокируют развитие инфекции в зараженных клетках, вирус-специфические Т-лимфоциты поступают в очаг воспаления в самом начале воспалительного процесса и элиминируют пораженные клетки до распространения вируса. Нейтрализующие антитела блокируют вирусную инфекцию, альвеолярные макрофаги распознают комплексы антитело–вирус, а также клетки, подвергшиеся апоптозу, и уничтожают их путем фагоцитоза. Таким образом, происходит клиренс вирусов при минимальном повреждении ткани (рис. 31 Б). При этом синтез и секреция цитокинов происходят непродолжительное время (матричная РНК цитокинов короткоживущая), так как «запрос» на их синтез из-за блокирования вируса прекращается. Клетки, синтезирующие цитокины, переключаются на синтез супрессорных цитокинов и/или экспрессируют ингибиторные рецепторы или рецепторы для сигналов к апоптозу. При несостоятельности мукозального и локального иммунитета синтез цитокинов возрастает в разы. Прежде всего, это синтез провоспалительных цитокинов врожденного иммунитета, в меньшей степени — цитокинов продукта активированных Т-лимфоцитов. Формируется гиперактивация иммунной системы. Возможно вторичное повреждение органов с развитием полиорганной недостаточности (рис. 32).



Рис. 32. Развитие иммунного ответа

В процессе развития воспаления клетки участники синтезируют и секретируют большое количество цитокинов, обладающих как про- так и противовоспалительным действием. Именно от их баланса зависит путь дальнейшего развития иммунного ответа. В идеале локальная реакция должна закончиться с формированием урегулирования про- и противовоспалительных реакций и активацией адаптивного иммунитета, конечная цель которого — системно по всему организму нейтрализовать им распознанный патоген, сформировать иммунную память и сконцентрировать факторы защиты (клетки памяти и антитела) в мукозальном иммунитете. Такой системный иммунный ответ следует считать адекватным.

При недостаточной эффективности противовоспалительной системы, но при выраженном воспалительном ответе течение заболевания затягивается, что может привести к персистирующему хроническому воспалению с иммуносупрессией и катаболическим синдромом.

С другой стороны, при явном преобладании противовоспалительной системы и, соответственно, неадекватном адаптивном иммунном ответе возможно развитие прогрессивной иммуносупрессии, при умеренном дисбалансе с преобладанием противовоспалительной системы — усиление катаболизма белков, кахексии и в самых неблагоприятных случаях — смерти в отдаленном периоде. За счет дисрегуляции про- и противовоспалительных реакций и нарушением работы адаптивного иммунитета формируются различные иммунопатологические синдромы: синдром системного воспаления [(SIRS), systemic inflammatory response syndrome], синдром компенсаторного противовоспалительного ответа [(CARS), compensatory anti-inflammatory response syndrome], синдром

смешанного антагонистического ответа [(MARS), mixed antagonist response syndrome], синдром стойкого воспаления, иммуносупрессии и катаболизма [(PICS), persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome].

Именно из-за такой дисрегуляции у больных, перенесших заболевания, определяются длительные нарушения функции иммунной системы. Они разнообразны, но в основном страдает эффекторное звено иммунитета. Если иммунные нарушения не восстановить, у больного затянется период реконвалесценции и могут развиваться различные осложнения. Повышается риск развития опухолей (особенно на фоне длительной вирусной репликации). Нарушаются процессы регенерации. С дисфункцией иммунной системы связано развитие различных инфекций, в том числе их хронических форм, аутоиммунной патологии, различных видов аллергий, т.е. формированием хронического критического заболевания. Все это требует проведения иммунореабилитационных мероприятий у переболевших пациентов с признаками иммунных нарушений.

Глава 3. Системный воспалительный ответ



Основной проблемой для врача является распознавание и лечение синдрома системного воспалительного ответа. Системное воспаление — типовой мультисиндромный, фазоспецифичный патологический процесс, развивающийся при системном повреждении и характеризующийся тотальной воспалительной реактивностью эндотелиоцитов, плазменных и клеточных факторов крови, соединительной ткани, а на заключительных этапах — и микроциркуляторными расстройствами в жизненно важных органах и тканях. Его раннее выявление и нейтрализация является одним из важнейших мероприятий по нормализации работы иммунной системы, в том числе и при реабилитации любого заболевания.

Сам термин «синдром системного воспалительного ответа» (ССВО) (от англ. Systemic inflammatory response syndrome, или SIRS) был принят в 1992 году на заседании Согласительной комиссии Американского колледжа пульмонологов и Общества критической медицины. Тогда же было определено, что этот термин предпочтительнее термина «сепсис» при описании распространенного воспаления (или клинической реакции на это воспаление), которое может возникнуть у пациентов с такими разнообразными заболеваниями, как инфекция, панкреатит, ишемия, множественная травма, геморрагический шок и т.д., а также опосредованными активностью иммунной системы повреждениями органов.

Основанием для диагностики ССВО было определено наличие двух или более представленных клиникодиагностических критериев:

температура тела более 38 °С или менее 36 °С;
частота сердечных сокращений более 90 уд/мин;
частота дыхания более 20 в минуту;
уровень лейкоцитов крови более $12 \times 10^9/\text{л}$ или менее $4 \times 10^9/\text{л}$;
содержание молодых форм гранулоцитов более 10%.

Критерии диагностики были приняты в 1992 году и до сих пор для многих клинических специалистов являются определяющими. Однако со временем стало очевидно, что постановка диагноза на основании этих критериев

представляет трудности. Кроме того, эти критерии были описаны при диагностике сепсиса, а не асептического ССВО.

Недостатком предлагаемого способа диагностики ССВО, например, применительно к пациентам после полостных оперативных вмешательств является то, что тахикардия и тахипноэ в большинстве клинических ситуаций не являются диагностически значимыми ввиду проводимой противоаритмической терапии и продленной искусственной вентиляции легких. На температуру тела в значительной степени влияет применение анальгетиков, обладающих жаропонижающим эффектом. После проведенной операции со значительным повреждением тканей и органов лейкоцитоз со сдвигом формулы влево является естественной реакцией, а не проявлением осложненного ССВО.

Важно отметить сложные взаимоотношения системного воспаления, инфекции и полиорганной недостаточности. ССВО может быть ассоциирован с большим количеством патологических состояний, таких как травма, ожоги, панкреатит, ишемия, геморрагический шок и т.д.

Блокировка системного воспалительного ответа является одним из важнейших мероприятий первого этапа реабилитации. Однако на следующих этапах важно выявить его микросимптоматику, т.к. имеющееся персистирующее воспаление может привести к снижению функции иммунитета, продолжающемуся повреждению органов и, как следствие, потере мышечной массы и функции костного мозга с преобладанием «аварийного миелопоэза» и недостаточностью метаболической адаптации.

Патогенез системного воспалительного ответа сложен и все время продолжает исследоваться и уточняться. Системный воспалительный ответ развивается в ответ на повреждение тканей и реализуется при участии инфламмасом, носит с одной стороны, компенсаторно-приспособительный характер, с другой стороны, при чрезмерной выраженности этих процессов развивается комплекс реакций повреждения и дезадаптации. При этом решающую роль в выраженности эффектов цитокинов и, соответственно, их направленности (протективное или повреждающее) играет степень дисбаланса цитокинов. Так, TNF α , IL-1, IL-6 воздействуют на центр терморегуляции, вызывают повышение температуры тела с лихорадкой, что является протективной реакцией организма. Те же цитокины могут стимулировать продукцию лейкоцитов в костном мозге. IL-1 и IL-6 являются мощными стимуляторами продукции белков острой фазы (например, СРБ) печенью. Вместе с тем чрезмерно высокие уровни провоспалительных цитокинов могут вызывать неблагоприятные эффекты. Например, большое количество TNF приводит к снижению сердечного выброса, повышенной проницаемости сосудов, усилению тромбообразования, метаболическим нарушениям, связанным с развитием резистентности к инсулину, и в конечном счете — к развитию шока.

Следующим значимым фактором патогенеза системного воспаления, определяющим повреждающие эффекты, является ОС. Антиоксидантная система играет ключевую роль в защите тканей от ишемического повреждения [супероксиддисмутаза, гемоксигеназа, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза (ГР)]. При воспалении, гипоксии (ишемия) и стрессорной реакции антиоксидантный потенциал больных часто оказывается недостаточным для компенсации развивающихся нарушений, что служит пусковым моментом в запуске ОС. Восстановление перфузии тканей приводит к активному поступлению кислорода и глюкозы в клетки, вызывая резкую интенсификацию процессов свободнорадикального окисления и/или снижение резерва антиоксидантной защиты, результатом чего будет значительное накопление ROS. В свою очередь ROS, в частности H_2O_2 , индуцируют появление одонитевых разрывов ДНК, которые усиливают экспрессию главного проапоптотического белка p53, приводя к апоптотической гибели клеток. Кроме того, ROS обуславливают запуск программы апоптоза по митохондриальному пути с высвобождением растворимых межмембранных белков. Среди них имеется ряд ключевых апоптогенных факторов: цитохром C, прокаспазы-2, -3 и -9, белок AIF и эндонуклеаза G.

Наряду с ROS существенную роль в патологических процессах играют активные формы азота и их метаболиты. Окись азота (NO) — внутренняя регуляторная молекула, включенная в ряд физиологических процессов, как, например, регулирование тонуса сосудов и пролиферация гладкомышечных клеток. NO синтезируется во всех типах клеток, в том числе эндотелиальных и кардиомиоцитах, из L-аргинина.

В патологических условиях происходит перегрузка клеток ионизированным кальцием. Этот процесс опосредован через нарушение проводимости кальциевых каналов либо через высвобождение ионизированного кальция из эндоплазматического ретикулума в цитозоль. Повышение в цитоплазме ионизированного кальция приводит к пермеабилзации мембраны митохондрий и запуску апоптоза по митохондриальному пути. Ионы кальция участвуют в развитии апоптоза путем прямой активации Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы и последующей межнуклеосомной деградации ДНК.

Лизосомы (вместе с клеточным ядром и митохондрией) играют важную роль в апоптотической гибели клеток. Ряд факторов (ROS, гипоксия, перегрузка клеток кальцием, цитокины, перерастяжение кардиомиоцитов) прямо или косвенно стимулируют пермеабилзацию лизосомальных мембран и высвобождение в цитозоль катепсинов — цистеиновых лизосомальных протеиназ. В цитозоле катепсины могут запускать клеточную смерть различными путями, включая активацию каспаз, высвобождение проапоптотических факторов из митохондрий, а также расщепление антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и Bid.

В патогенезе системного воспалительного ответа важно участие эндокринной системы, особенно в отношении взаимной регуляции с иммунной системой. Активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатoadреналовой систем с выходом большого количества кортизола и катехоламинов, по-видимому, приводит к нарушению баланса Th1/Th2 клеток. Предполагается, что ключевую роль в регуляции иммунных нарушений играют снижение экспрессии и сигналинга IL-12 и повышение экспрессии Treg. Кроме того, цитокины, продуцируемые Th2, повышают экспрессию аргиназы-1 в миелоидных супрессорных клетках, приводя тем самым к дефициту аргинина, что в дальнейшем снижает функциональную активность лимфоцитов.

На ранних этапах развития ССВО большое количество лейкоцитов прикрепляется к активированным эндотелиальным клеткам стенок сосудов, что может нарушать микроциркуляцию. Отчасти адгезия лейкоцитов связана с повышенной экспрессией молекул адгезии на поверхности эндотелиальных клеток, к которой приводят высокие уровни медиаторов воспаления, таких как TNF α и IL-1. Помимо механического закупоривания микроциркуляторного русла, активированные лейкоциты могут повреждать окружающие эндотелиальные клетки и периваскулярные ткани. В результате развивается дисфункция эндотелия.

Активированные эндотелиальные клетки экспрессируют несколько факторов (например, тканевой фактор, молекулу адгезии тромбоцитов к эндотелиальным клеткам, тромбоксан), которые преобразуют их локальный коагулянтный статус из нейтрального в прокоагулянтный. Кроме этого, TNF α запускает каскады коагуляции путем активации внешних путей. Фактор XIIa как запускает внутренний путь свертывания крови посредством активации фактора XI, так и побуждает эндотелиальные клетки и макрофаги продуцировать тканевой фактор, который в свою очередь активирует внешний путь коагуляции. Возможно повышение уровней тканевого активатора плазминогена (tPA) в плазме, оно быстро уравнивается высвобождением ингибитора активатора плазминогена (PAI). Процессу нарушения коагуляционного гемостаза способствуют множественное действие тромбина и нарушение естественных ингибиторных механизмов, таких как антитромбин III, протеин S, протеин C и плазменные ингибиторы фибринолиза. Эта прокоагулянтная среда в сочетании с повреждением эндотелиальных клеток предрасполагает к развитию чрезмерного количества микротромбов, дополнительно затрудняя местный кровоток и усугубляя дисфункцию органов-мишеней. Потенциально деструктивные местные и системные реакции при ССВО (повышенная периферическая вазодилатация, чрезмерная проницаемость микрососудов, ускоренное свертывание в микрососудах, активация лейкоцитов/эндотелиальных клеток) способствуют развитию глубоких патологических изменений в различных органах и считаются основными этиологическими факторами при развитии септического шока, ДВС, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и других дисфункций органов-мишеней, приводящих к синдрому полиорганной недостаточности (СПОН).

Таким образом, выброс провоспалительных белков и дисбаланс цитокинов являются наиболее важными компонентами развития системного воспалительного ответа. При этом продуцентами цитокинов являются не только клетки иммунной системы, но и клетки других органов и тканей (эндотелиоциты, кардиомиоциты, макрофаги, гепатоциты и т.д.). Гиперпродукция провоспалительных цитокинов, оксидативный стресс, протеазный взрыв — важные патогенетические составляющие фазы первичного флоготического удара системного воспаления. В этих процессах ключевую роль играет врожденная иммунная система. Воспаление является типовым патологическим процессом, однако события, связанные с ним, в различных органах имеют отличия. Дисбаланс цитокинов в системном кровотоке, развивающийся при системном воспалительном ответе, является отражением сложной сети разнонаправленных регулирующих сигналов, модулируемых специфическими клетками микроокружения. Исходя из этого представления, ткани могут являться источником биологически активных веществ, инициирующих и поддерживающих системное воспаление за счет дистантного действия и вовлечения в процесс отдаленных органов. При этом триггерами местного «стерильного» воспаления являются ишемия/реперфузия, ОС, апоптотическое, некротическое, механическое повреждение тканей (рис. 33).

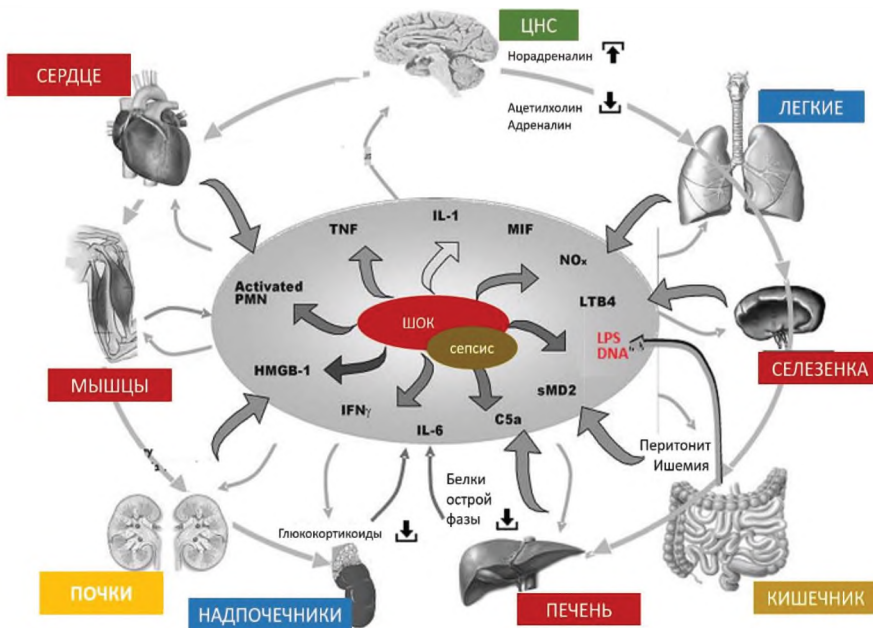


Рис. 33. Порочный круг развития системного воспаления и его распространение из одного компартмента в другой

(адаптировано из Journal of Endotoxin Research, Vol. 12, No 3, 2006

DOI 10.1179/096805106X102246)

Таким образом, за счет развития микроциркуляторных расстройств, нарушений гемостаза, вовлечения отдаленных органов в патологический процесс системный воспалительный ответ может иметь неблагоприятное течение с формированием изолированных органных дисфункций или полиорганной недостаточности. Однако в качестве противовеса ССВО имеется комплекс клеток и цитокинов, его блокирующий, с формированием системы компенсаторного противовоспалительного ответа (КПВО). Считается, что за развитие ССВО отвечает система врожденного иммунитета, а КПВО обеспечивается активностью адаптивной иммунной системы. IL-10 является ключевым цитокином противовоспалительного ответа и продуцируется CD4+ Th2-клетками, моноцитами и В-клетками. Именно этот цитокин является главным в попытке иммунного ответа контролировать гипервоспаление.

С про- и противовоспалительных иммунных позиций формируется ряд синдромов (табл. 27):

CARS — синдром компенсаторного противовоспалительного ответа;

MARS- синдром смешанного антагонистического ответа;

PICS — стойкое воспаление, иммуносупрессия и синдром катаболизма.

Таблица 27

Реакции иммунитета при формировании синдромов системного ответа

Реакция иммунитета	SIRS	CARS	MARS	PICS
Провоспалительная	+++	+	+++	++
Противовоспалительная	+	+++	+++	+

Возможные взаимоотношения, а также варианты исходов клинического течения в зависимости от преобладания активности той или иной системы представлены на рис. 34. Так, при гиперэргическом воспалительном ответе и полной несостоятельности противовоспалительной системы, а также стремительном течении возможно развитие полиорганной недостаточности, приводящей к смерти пациента.

Таким образом, баланс воспалительной (врожденный иммунитет) и противовоспалительной (адаптивный иммунитет) систем является ключевым для течения ССВО и быстрого выздоровления либо затяжного течения и развития неблагоприятных исходов в случае дисбаланса этих систем.

Системный воспалительный ответ нельзя рассматривать как синоним инфекционного процесса. Если для генерализованной инфекции системная воспалительная реакция является обязательным и неизменным атрибутом, то локализованный процесс может протекать и без явлений системного воспаления. |

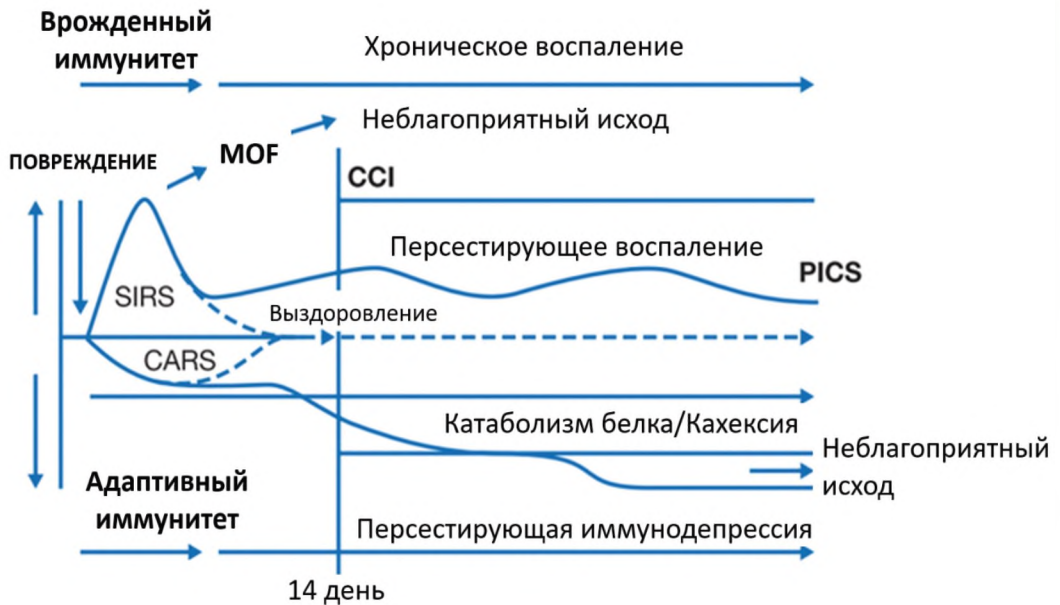


Рис. 34. Модель взаимоотношения систем воспалительного и противовоспалительного ответа, а также варианты клинических исходов

CCI — хроническое критическое заболевание

MOF — полиорганная недостаточность

SIRS — синдром системного воспалительного ответа

PICS — синдром стойкой иммуносу-

CARS — компенсаторный противовоспалительный ответ

прессии и катаболизма

(адаптировано из J Trauma Acute Care Surg. 2014 Jan; 76(1): 21–30.

DOI:10.1097/TA.0b013e3182ab1ab5)

Существует масса примеров запуска ССВО без инфекционного компонента. В частности, к таким ситуациям могут относиться управляемая ишемия и реперфузия, сопровождающая проведение операции по реваскуляризации миокарда, когда, кроме ишемии/реперфузии, существует большое количество триггеров, к которым относятся механическое повреждение тканей с выходом большого количества аларминов, повреждение клеток вследствие развившегося ОС, контакт иммунокомпетентных клеток с большим количеством чужеродных материалов (трубки системы ИК, фильтры, оксигенаторы и т.д.), использование большого количества фармацевтических препаратов для проведения наркоза, кардиоплегии, поддержания функции жизненно важных органов. Кроме того, провоцировать системное воспаление может назначение препаратов, обладающих высокой медиаторной активностью, таких как фактор некроза опухоли и других цитокинов. Возможными осложнениями могут быть ОРДС, шок, почечная недостаточность, полиорганная недостаточность. В 2001 году на международной конференции по сепсису было предложено ввести ряд диагностических критериев системного воспаления, включающих в том числе биохимические и иммунологические показатели (табл. 28).

Диагностические критерии системного воспаления

Показатель	Значение
Общие параметры	
Лихорадка (температура тела)	>38,3 °C
Гипотермия (температура тела)	<36 °C
Частота сердечных сокращений	ЧСС >90 ударов/мин
Тахипноэ	>30 в минуту
Нарушения в ментальном статусе	Психосимптоматика
Отеки или отрицательный жидкостный баланс	Более 20 мл/кг за сутки
Гипергликемия в анамнезе	Глюкоза плазмы >7,7 ммоль/л
Критерии воспаления	
Лейкоцитоз	>12 000/мкл
Лейкопения	<4000/мкл
Нормоцитоз с молодыми формами в формуле	>10%
СРБ плазмы	>2 стандартных отклонений от нормальных значений
Прокальцитонин плазмы	
Гемодинамические критерии	
Артериальная гипотензия (мм рт.ст.)	Систолическое <90 или диастолическое >40, среднее артериальное <70
Сатурация кислорода венозной крови	>70%
Параметры органичных дисфункций	
Артериальная гипоксемия	PaO ₂ /FIO ₂ <300
Острая олигурия	Моча <0,5 мл/кг/час
Повышение креатинина	≥0,5 мг/дл
Нарушения коагуляции	МНО >1,5 АЧТВ >60 с
Кишечник	Отсутствие шумов перистальтики
Тромбоцитопения	<100 000/мкл
Гипербилирубинемия	Общий билирубин > 70 ммоль/л
Гиперлактатемия	>3 ммоль/л
Микроциркуляторные расстройства	Уменьшение наполнения капилляров, пятнистость

Но все эти проявления касаются острого этапа заболевания. Когда острые воспалительные реакции не прекращаются после того, как патоген нейтрализован, формируется хроническое системное воспаление (*Systema inflammationis chronicae responsionis*) (SCI или SICR), которое способно нанести вред тканям и органам с формированием хронических критических заболеваний. Хроническое системное воспаление слабовыражено, часто остается незамеченным, может длиться месяцами или даже годами. На первый план выступают психоэмоциональные и когнитивные изменения, нарушения, связанные с функцией

иммунитета, подтверждающиеся лабораторными исследованиями. Единые критерии SCI еще не определены. Тем не менее можно выделить клинические проявления синдрома хронического системного воспалительного ответа (табл. 29).

Таблица 29

**Клинические проявления
хронического системного воспалительного ответа**

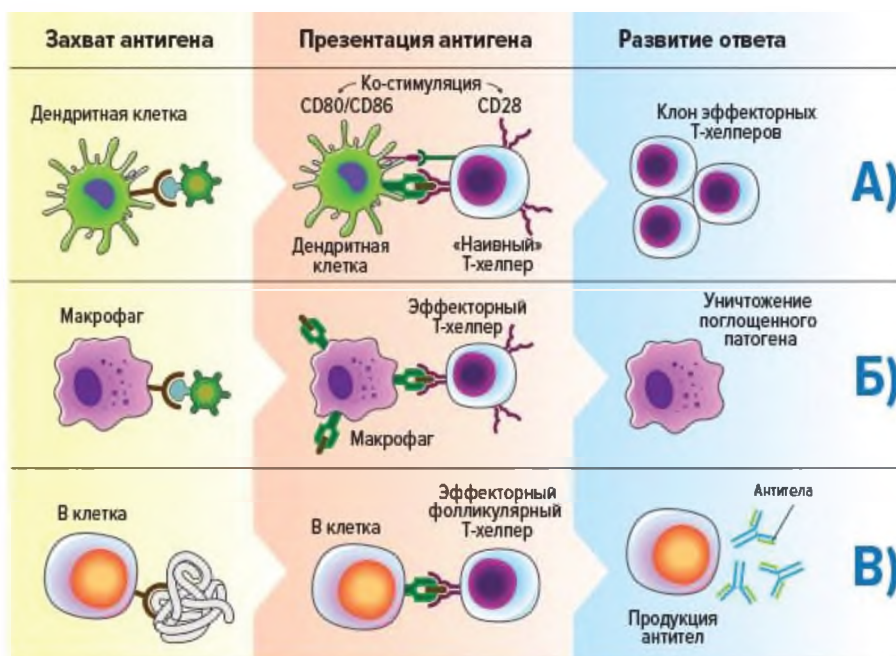
Симптом	Показатель
Психоэмоциональные и когнитивные нарушения	Быстрая утомляемость, вялость. Депрессия. Ухудшение умственной работоспособности, снижение памяти
Температура тела	Постоянный или перемежающийся субфебрилитет с возможными пиками температуры $>38,0$ °C и ознобами
Нарушения функции иммунной системы	Формирование различных, в том числе комбинированных, иммунопатологических синдромов
Нарушение пищеварения	Запор и поносы, вздутие живота
Нарушения гемостаза	Фибриноген $<1,5$ г/л, D-димер более 243 нг/мл
Нарушения обмена белка	Мышечная атрофия (саркопения, кахексия). Общий белок <50 г/л
Нарушение обмена углеводов	Гликированный Hb >6
Нарушение обмена липидов	Триглицериды натощак $>3,0$ ммоль/л
Нарушения кислотно-щелочного баланса	Метаболический ацидоз — HCO_3^- — в сыворотке крови <24 ммоль/л., pH мочи $< 5,0$
Изменения, связанные с повреждением органов и тканей	Повышение билирубина, АСТ, АЛТ, мочевины, креатинина, ЛДГ
Лимфаденопатия/Гепатомегалия/Спленомегалия	Системное увеличение периферических лимфатических узлов. Пальпируются печень и селезенка
Лейкоцитоз	$>12 \times 10^9$ /л или содержание молодых форм гранулоцитов более 10%
СРБ	Более 5 мг/л
Ферритин в сыворотке	>500 мкг/л
Цитопения с вовлечением более 2 клеточных ростков	Hb <90 г/л, тромбоциты $<100 \times 10^9$ /л, нейтрофилы $<1 \times 10^9$ /л, лимфоциты $<1,0 \times 10^9$ /л
НК-клетки, ЦТЛ	Снижение или отсутствие активности
Цитокины ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-17, ФНО	Повышены

Глава 4. Адаптивный иммунный ответ



Активация клеточных и гуморальных реакций адаптивного иммунитета начинается с распознавания антигенных пептидов, представленных на поверхности антигенпрезентирующих клеток, Т-лимфоцитами.

Начиная данный раздел, следует отметить, что ключевую роль в активации клеточных и гуморальных реакций системы адаптивного иммунитета играет процесс, получивший название «презентация» (иногда «представление») антигенов (рис. 35).



- А) Активация «наивных» клеток, клональная экспансия, формирование эффекторов
 Б) Активация эффекторной клетки – продукция цитокинов, активация макрофагов (клеточный ответ)
 В) Активация эффекторной клетки – активация В-лимфоцитов, продукция антител (гуморальный ответ)

Рис. 35. Основные этапы развития специфического иммунного ответа

За реализацию всех процессов, связанных с презентацией антигенов, отвечают АПК — гетерогенная популяция лейкоцитов с выраженными иммуностимулирующими свойствами, обладающих способностью осуществлять «процессинг» антигена и предоставлять («презентировать») его иммунокомпетентным клеткам (в первую очередь различным популяциям CD4+ Т-хелперов и цитотоксическим CD8+ Т-лимфоцитам).

Процессинг антигенов — это частичный (ограниченный) протеолиз белковых антигенов (расщепление до 5–20 аминокислотных остатков), упаковка полученных фрагментов антигена на МНС I класса и МНС II класса, а также последующая экспрессия образующихся комплексов на поверхность АПК, т.е. презентация антигена в иммуногенной форме (той самой форме, которая может вызвать развитие специфического иммунного ответа с последующим формированием иммунологической памяти). Т-лимфоциты, клетки, которые запускают и контролируют реакции адаптивного иммунитета, могут распознавать своими Т-клеточными рецепторами только короткие антигенные пептиды в составе молекул МНС I и/или II класса.

Какие клетки отвечают за презентацию антигенов? Обычно выделяют «профессиональные» АПК — ДК, макрофаги и В-лимфоциты: на поверхности этих клеток молекулы МНС II класса присутствуют постоянно. Наряду с «профессиональными» АПК некоторые типы соматических клеток (кератиноциты, тироциты, эндотелиоциты) при различных воспалительных процессах в условиях активации цитокинами также приобретают способность участвовать в презентации антигенов. Антигенные пептиды в составе молекул МНС II класса распознают Т-хелперы — клетки, которые координируют развитие всех типов иммунного ответа и воспаления, продуцируя цитокины, регулирующие активность клеток врожденного и приобретенного иммунитета. Что же касается молекул МНС I класса, то они постоянно (конститутивно) представлены на поверхности всех ядросодержащих клеток организма, кроме клеток трофобласта. Под действием провоспалительных факторов (цитокины, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, маркеры повреждения собственных клеток и т.д.) уровень экспрессии молекул МНС I класса может существенно повышаться.

В ходе развития специфического иммунного ответа выделяют следующие этапы:

- 1) первичное проникновение патогена через барьерные ткани;
- 2) распознавание патогена при помощи паттерн-распознающих рецепторов (в первую очередь TLRs для внеклеточных патогенов, NLR и RLR для внутриклеточных), активация клеток и запуск различных механизмов эндоцитоза (поглощение патогена в различных АПК протекает с использованием разных механизмов эндоцитоза); более того, распознавание патогена или его фрагментов

при помощи PRR необходимо для индукции экспрессии костимуляционных молекул (см. ниже);

3) захват и интернализация при помощи эндоцитоза патогена или его фрагментов АПК, которые могут быть локализованы в барьерных тканях (например, ДК) или в лимфе, собранной из тканей в лимфатическом узле (В-лимфоциты);

4) процессинг и доставка антигенов в Т-зависимые зоны периферических лимфоидных органов активированными АПК (в этом случае АПК становятся зрелыми и начинают экспрессировать рецепторы «хоуминга» в лимфоидную ткань, в Т-зависимые зоны, где вероятность встречи с наивными Т-клетками и Т-клетками центральной памяти максимальна). Периферические лимфоидные органы являются организованными структурами лимфоидной ткани, в которой созданы условия для взаимодействия клеток иммунной системы и развития реакций адаптивного иммунного ответа;

5) презентация антигенов Т-лимфоцитам в Т-зависимых зонах периферических лимфоидных органов;

6) выбор направления и развития адаптивного ответа, связанного с получением Т-клеткой активационных сигналов (распознавание антигена, сигнал от костимулирующих молекул и сигнал от цитокинов);

7) клональная экспансия Т-лимфоцитов и формирование пула эффекторных клеток, способных мигрировать в очаг проникновения патогена, и долгоживущих клеток памяти.

В том случае если этапы 1–3 могут протекать как в периферических тканях (в случае ДК как АПК), так и в лимфоидной ткани (В-клетки как АПК), то последующие этапы (4–6) в норме протекают исключительно в периферических лимфоидных органах. Именно поэтому периферические органы иммунной системы расположены по регионарному принципу, что позволяет контролировать поступление антигенов из определенных частей тела и обеспечивать развитие иммунного ответа. Каждый лимфатический узел контролирует строго определенную часть тела, от которой к нему поступает лимфа. Селезенка является барьером для антигенов, поступивших в кровотоки. Кроме того, лимфоидная ткань и диффузные скопления лимфоидных клеток расположены в барьерных тканях — слизистых оболочках и коже.

Презентация эндогенных антигенов в составе МНС I запускает развитие противоопухолевого и противовирусного иммунного ответа.

Презентация антигенов, локализованных в цитоплазме клеток в составе МНС I класса, индуцирует развитие противовирусного и противоопухолевого иммунного ответа. Этот процесс протекает постоянно во всех ядродержащих клетках организма (кроме клеток трофобласта); ключевую роль в распознавании

клеток, несущих в своей цитоплазме «чужие» (инфицированные вирусами или некоторыми бактериями, живущими в цитоплазме без мембранной упаковки) или собственные «измененные» (переродившиеся опухолевые клетки) антигены играют цитотоксические Т-лимфоциты с фенотипом CD3+CD8+. Именно благодаря молекуле CD8 (которая способна к специфическому взаимодействию с МНС I) эти клетки получают подтверждающие сигналы о том, что они распознали антигены, локализованные в цитозоле, и могут запустить процессы, связанные с индукцией апоптоза в этой клетке. Презентация антигенов через молекулы МНС I класса традиционно разбивается на несколько стадий (рис. 36):

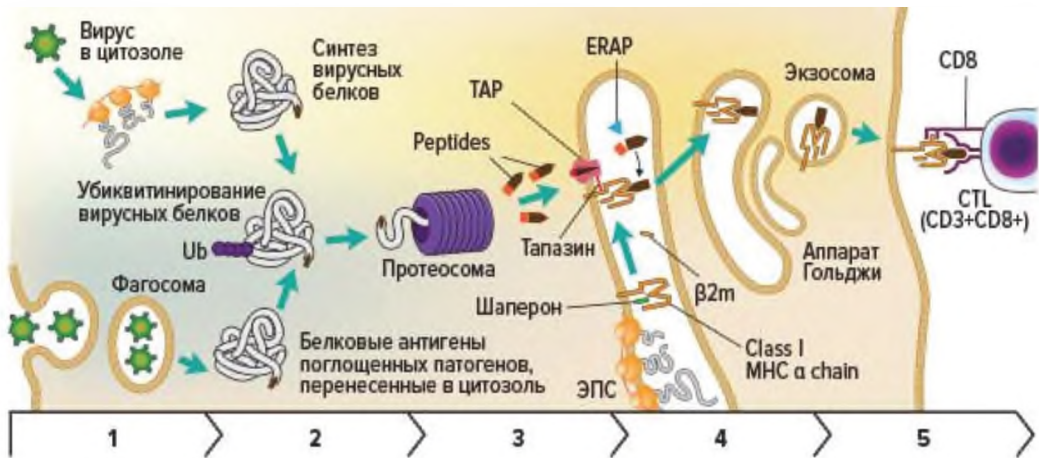


Рис. 36. Презентация антигенов, локализованных в цитоплазме клетки, при помощи МНС I класса — реализация противовирусного и противоопухолевого специфического иммунного ответа: 1 — синтез белков в цитоплазме клетки на свободных рибосомах; 2 — ограниченный протеолиз белков (обычно около 30%, а при активации клеток — до 70% от общего объема вновь синтезированных белков) в специальной белковой «мясорубке» — протеасоме (ее активность также зависит от провоспалительных сигналов извне клетки). 3. Все полученные фрагменты белков (их уже можно называть антигенами) специфическим образом маркируются и переносятся при помощи специализированных белков-транспортеров семейства TAP из цитозоля в полость ЭПС; 4 — загрузка пептида на МНС I; 5 — перемещение комплекса МНС I-пептид на наружную мембрану клетки для распознавания цитотоксическими Т-клетками (адаптировано из Cellular and Molecular Immunology by Drs. Abul K. Abbas, Andrew H. N. Lichtman, and Shiv Pillai 9th edition, 2017)

Многие патогены используют стратегии избегания или снижения эффективности иммунного ответа за счет нарушения презентации антигенов в составе МНС I. Так, способностью к снижению ферментативной активности протеасомы обладают белки вирусов EBV и CMV, что снижает эффективность процессинга вирусных белков. Некоторые белки HSV способны блокировать работу белков-

транспортеров семейства TAP, что снижает эффективность доставки процессированных антигенов в ЭПС. Аденовирусы и CMV подавляют синтез молекул МНС I в инфицированной клетке и/или нарушают их транспорт в ЭПС. Более того, CMV способствует удалению МНС I из ЭПС, тогда как CMV мыши может вызывать еще и продукцию собственных МНСI-подобных молекул вируса, способных связываться с ингибиторными рецепторами на поверхности НК-клеток и подавлять их активность.

Презентация экзогенных антигенов в составе МНС II класса необходима для запуска всех типов адаптивного иммунного ответа.

Презентация экзогенных антигенов в составе МНС II класса — необходимое условие развития специфического иммунного ответа против всех типов патогенов. Презентацию антигена осуществляют профессиональные АПК, а также некоторые другие активированные клетки (эндотелиальные, эпителиальные и др.), поглотившие при помощи различных типов эндоцитоза «чужие» (бактериальные, грибковые, вирусные и т.д.) антигены. Ключевую роль в распознавании антигенов в составе МНС II класса играют Т-хелперы с фенотипом CD3+CD4+. Именно благодаря экспрессии молекулы CD4 (которая способна к специфическому взаимодействию с МНС II) эти клетки получают подтверждающие сигналы о том, что они распознали экзогенные (захваченные из межклеточного пространства) антигены. Распознавание антигенов Т-хелперами запускает продукцию этими клетками цитокинов, которые способны активировать различные типы эффекторных клеток, что определяет дальнейшую стратегию борьбы с патогеном или тип адаптивного иммунного ответа.

В процессе презентации антигенов в составе молекул МНС II класса традиционно выделяют несколько стадий (рис. 37). Следует отметить, что, подобно вирусам, блокирующим презентацию антигенов в составе МНС I класса, многие внеклеточно-паразитирующие патогены — в первую очередь бактерии и грибы, а также гельминты — используют различные стратегии избегания или снижения эффективности презентации своих антигенов за счет нарушения данного процесса презентации в составе МНС II класса. Например, многие бактерии нарушают процессы созревания фаголизосом, что позволяет им избежать не только собственной гибели, но и процессинга собственных антигенов. Некоторые виды *Mycobacterium* и *Ehrlichia* блокируют созревание фагосом в самом начале, тогда как сальмонеллы позволяют фагосомам немного большее созревание, а, например, *Coxiella* высвобождается в цитоплазму уже из зрелой фаголизосомы. На аналогичной стадии фаголизосомы способны покидать некоторые виды *Listeria* и *Rickettsia*.

Итак, патогены применяют весьма эффективные стратегии избегания презентации собственных антигенов. Именно поэтому были разработаны многочисленные фармакологические подходы, целью которых являлось повышение эффективности распознавания антигенов клетками иммунной системы.

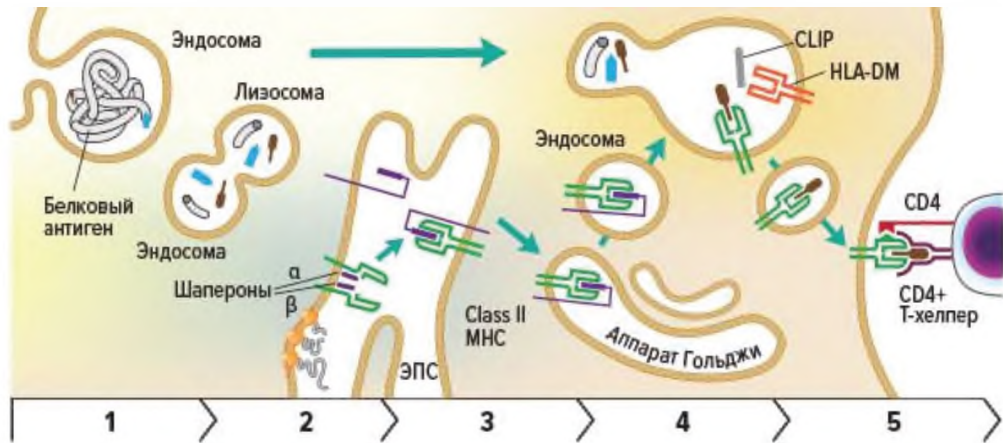


Рис. 37. Презентация внеклеточных антигенов при помощи МНС II

класса — реализация специфического иммунного ответа против

внеклеточных патогенов: 1 — эндоцитоз внеклеточного антигена АПК; 2 — ограниченный протеолиз поглощенного антигена в фаголизосоме/эндосоме; 3 — синтез молекул МНС II в ЭПС с последующим их транспортом в эндосому, содержащую процессированные антигены (сайт для связывания с антигеном на МНС II закрыт специальным белком-заглушкой, что позволяет предотвратить загрузку внутриклеточных антигенов, которые находятся в полости ЭПС); 4 — удаление белка-заглушки с МНС II и загрузка антигена на МНС II; 5 — транспорт образовавшегося комплекса МНС II-антиген на поверхность клетки для распознавания Т-хелперами (адаптирована из Cellular and Molecular Immunology by Drs. Abul K. Abbas, Andrew H. H. Lichtman, and Shiv Pillai 9th edition, 2017)

В онкологии применяются различные химиотерапевтические препараты (например, цисплатин или гемцитабин), одним из эффектов которых является увеличение экспрессии молекул МНС I класса на всех клетках организма, в том числе опухолевых. На разных стадиях клинических испытаний находятся препараты на основе ингибиторов тирозинкиназ, способные усиливать экспрессию молекул МНС I и II классов, а также оказывать влияние на плотность экспрессии костимулирующих молекул CD86 и CD40. Препараты, содержащие интерфероны I и II типов, также оказывают стимулирующее действие как на соматические клетки (за счет усиления экспрессии МНС I и белков семейства TAP), так и (в случае IFN γ) на профессиональные АПК (за счет усиления экспрессии МНС II и костимулирующих молекул). Столь же эффективны различные препараты, содержащие в своем составе агонисты TLR. Например, такой агонист TLR 2/4, как БЦЖ, способен повышать на АПК экспрессию МНС-II, костимулирующих CD80/CD86 и адгезионных ICAM молекул.

Молекулярные механизмы активации Т-лимфоцитов при распознавании антигенных пептидов, презентированных на поверхности АПК в составе МНС I и МНС II класса.

Формирование и структура иммунного синапса

Когда комплекс TCR распознает МНС-ассоциированные пептиды на АПК, в области физического контакта между Т-клеткой и АПК формируется макромолекулярная структура, образованная поверхностными и внутриклеточными сигнальными молекулами, которая называется иммунным синапсом, или надмолекулярным активационным кластером (SMAC) (от англ. supramolecular activation cluster). В самом центре SMAC находятся такие молекулы, как TCR в ассоциации с CD3 (все цепи, включая ζ), корецепторы CD4 или CD8 (в случае Т-хелпера или цитотоксического Т-лимфоцита соответственно), различного рода внутриклеточные сигнальные молекулы, главной из которых является протеинкиназа θ (PKC- θ), а также адапторные белки, отвечающие за передачу сигнала внутрь клетки. В этой области синапса, называемой также с-SMAC (центральная часть SMAC) (от англ. central SMAC), расстояние между плазматической мембраной Т-лимфоцита и мембраной АПК составляет около 15 нм. Адгезионные молекулы (LFA-1 со стороны Т-лимфоцита с ICAM-1 на поверхности АПК) формируют периферическую часть иммунного синапса и играют ведущую роль в стабилизации сайта взаимодействия между Т-клеткой и АПК. Эта область получила название периферической части SMAC, или р-SMAC (от англ. peripheral SMAC). В этой внешней части синапса мембраны контактирующих клеток разделяет расстояние в пределах 40 нм. Кроме того, по периферии со стороны Т-лимфоцита формируется дополнительное кольцо из молекул CD44 и CD45, получившее название d-SMAC (от англ. distal SMAC).

В покоящейся Т-клетке все эти сигнальные и адгезионные молекулы обычно располагаются диффузно в плоскости плазматической мембраны лимфоцита в составе так называемых «липидных рафтов» (от англ. lipid rafts) или плотов, то есть фрагментов мембраны, обогащенных гликолипидами. Только после активации TCR и получения костимулирующих сигналов липидные рафты за счет белков цитоскелета направленно мигрируют в зону контакта с АПК и сливаются, формируя иммунологический синапс.

Функции иммунного синапса

Иммунный синапс выполняет несколько важнейших функций, связанных с активацией Т-лимфоцита (рис. 38). Во-первых, стабилизация взаимодействия TCR с комплексом антигенный пептид–МНС (реп-МНС) обеспечивает время, необходимое для активации пролиферации Т-лимфоцита и синтеза ряда поверхностных и растворимых молекул. Более того, сродство или аффинность TCR к

антигену могут быть весьма низкими, но длительное взаимодействие гарантирует эффективное проведение сигнала и активацию лимфоцита.

Во-вторых, формирование синапса позволяет собрать вместе несколько комплексов МНС-антиген, чтобы активировать сразу несколько TCR, что повышает вероятность активации T-лимфоцита.

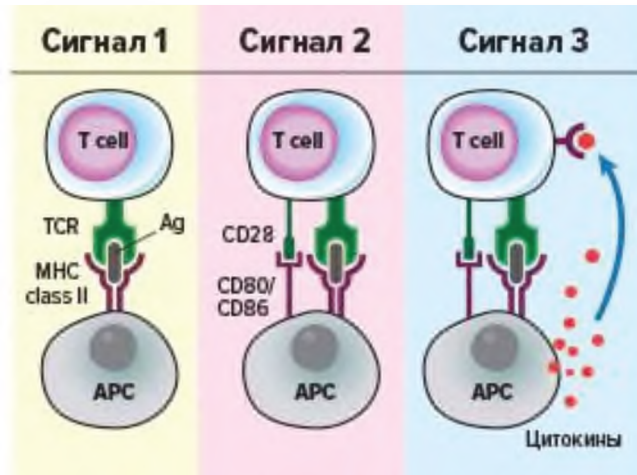


Рис. 38. Схематическое изображение трех основных сигналов, необходимых для активации T-лимфоцита и запуска антигензависимой стадии дифференцировки в периферических лимфоидных органах (адаптирована из Клиническая иммунология, 2020)

В-третьих, именно в пределах синапса происходит обмен цитокиновыми сигналами между АПК и T-лимфоцитом. Условная изолированность внутреннего пространства синапса позволяет локально повысить концентрацию этих цитокинов, что также обеспечивает эффективное проведение сигнала и активацию T-лимфоцита.

В-четвертых, иммунный синапс, особенно в своей центральной части с-SMAC, играет важную роль в эффективной передаче сигнала внутрь клетки. Следует помнить о том, что после фосфорилирования и активации сигнальных молекул последние быстро инактивируются. Это способствует прекращению активации T-клеток, а продолжительный контакт клеток — генерации новых активационных молекул.

Для активации T-лимфоцитов и запуска антигензависимой стадии дифференцировки в периферических лимфоидных органах необходимы три сигнала от АПК.

В процессе презентации антигена T-лимфоциты получают от АПК три сигнала, которые являются обязательным условием активации этих клеток и запуска реакций адаптивного иммунитета.

Сигнал 1 обеспечивает распознавание TCR антигена в ассоциации с молекулами МНС I класса (для цитотоксических Т-лимфоцитов) или МНС II класса (для Т-хелперов) класса. Этот сигнал определяет специфичность реакций адаптивного иммунитета. Другими словами, именно этот сигнал обеспечивает активацию и клональную экспансию только тех лимфоцитов, которые несут рецепторы, способные распознавать этот конкретный антиген.

Сигнал 2 является результатом взаимодействия между костимулирующими молекулами АПК и Т-лимфоцита. Костимулирующие молекулы CD80/CD86 появляются на поверхности АПК только в случае активации на ней рецепторов врожденного иммунитета, то есть исключительно в ответ на распознавание «чужого» (PAMPs), а не случайно презентруемого «своего» (рис. 70). Именно патогены являются индукторами экспрессии костимулирующих молекул на АПК (без патогена и/или его компонентов запуск иммунного ответа невозможен — это свойство применяется, например, при создании эффективных вакцин, где лиганды TLR и других паттерн-распознающих рецепторов являются одними из важнейших компонентов). Взаимодействие между CD80/CD86 и CD28 происходит только при презентации «чужого», а не «своего» антигена и необходимо для активации и клональной экспансии Т-лимфоцитов.

Сигнал 3 создают цитокины, секретируемые АПК или другими клетками микроокружения. Этот сигнал обеспечивает поляризацию наивных Т-лимфоцитов в один из типов Т-хелперов, что в конечном итоге определяет стратегию развития иммунного ответа и способ элиминации данного конкретного патогена. Механизмы, определяющие продукцию тех или иных комбинаций цитокинов, продуцируемых в момент презентации антигена, в настоящее время плохо изучены. Предполагают, что это в значительной степени зависит от природы патогена, а именно набора эволюционно консервативных структур конкретного патогена (PAMPs), которые распознает АПК своими паттерн-распознающими рецепторами. Не исключают также, что разные типы АПК способны рецептировать разные комбинации PAMPs, продуцировать разные наборы цитокинов и способствовать развитию разных типов иммунного ответа.

Роль костимуляторных сигналов в индукции реакций адаптивного иммунитета (рис. 39)

Взаимодействие CD80/CD86 со стороны АПК и CD28 со стороны Т-лимфоцита в момент презентации антигена приводит к:

- сигналам на выживание для Т-лимфоцита, а именно усилению экспрессии в Т-клетках антиапоптотических белков;
- синтезу и секреции IL-2 и увеличению экспрессии CD25 (α-цепь рецептора IL-2) на поверхности клетки; IL-2 является важнейшим аутокринным ростовым фактором для Т-клеток, без него Т-клетки не могут пролиферировать и формировать клон эффекторных клеток;

- пролиферации или клональной экспансии — наработке пула клеток, обладающих TCR заданной специфичности. Если исходно антиген распознает одна наивная Т-клетка с уникальным рецептором, то в ходе развития иммунного ответа формируется целый клон клеток, несущих рецептор такой же специфичности. Чем больше клон, тем быстрее, эффективнее и с минимальным повреждением организма происходит элиминация патогена;

- увеличению уровня экспрессии белков-циклинов, отвечающих за прохождение активированного Т-лимфоцита по фазам клеточного цикла, выход из фазы покоя и переход к митозу;

- дифференцировке в эффекторные клетки и клетки памяти. При этом эффекторы должны бороться с патогеном в очаге инфекции, тогда как клетки памяти отвечают на ускоренный ответ на повторное проникновение патогена. Именно формирование пула клеток памяти является важнейшей целью вакцинации.

Необходимо подчеркнуть, что сигнал 2 (сигнал костимуляции) служит важнейшим инструментом контроля и ограничения аутоагрессии. Только лимфоцит, распознающий чужеродный антиген, получает от АПК разрешение на выживание и клонирование. Потенциально опасные аутореактивные клоны лимфоцитов при распознавании аутоантигена не получают сигналов костимуляции от АПК, поэтому антиапоптотические белки в таких клетках не экспрессируются, и они погибают путем апоптоза. Отсутствие сигнала костимуляции позволяет также избежать синтеза аутореактивными лимфоцитами IL-2, формирования высокоаффинного рецептора для этого цитокина и клональной экспансии аутореактивных клеток. Срыв периферической толерантности лежит в основе аутоиммунных патологических состояний, поэтому костимулирующие молекулы являются перспективными мишенями для терапии этих заболеваний. Ведущая роль костимуляторных молекул CD80/CD86 и CD28 в поддержании периферической толерантности положена в основу разработки и эффективного применения некоторых современных биологических препаратов. За создание таких препаратов

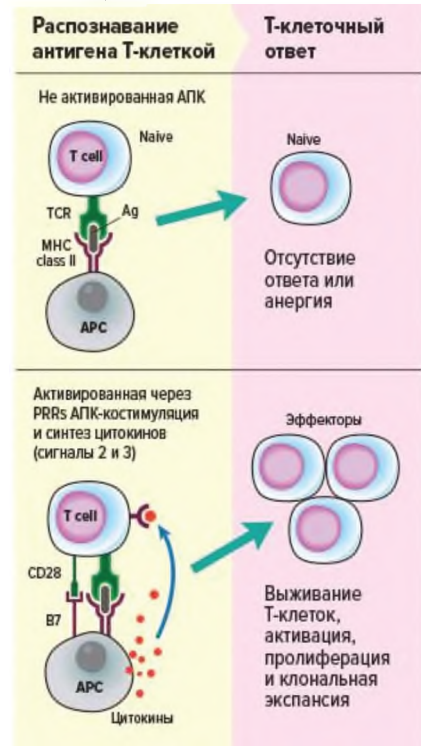


Рис. 39. Костимулирующие молекулы, роль в активации Т-лимфоцитов

Джеймсу Эллисону была присуждена Нобелевская премия по медицине и физиологии в 2018 году.

Что же касается АПК, то они тоже получают сигналы от Т-лимфоцитов — обмен сигналами носит взаимный характер. Так, после взаимодействия CD80/CD86 и CD28 на поверхности активированной Т-клетки экспрессируется CD40L. Данная молекула связывается с CD40 на поверхности АПК, что приводит к усилению экспрессии CD80/CD86 и продукции цитокинов, необходимых для выживания и дифференцировки Т-клетки. Таким образом, клетки стимулируют друг друга на выживание и проявление эффектов, необходимых для развития иммунного ответа.

Три типа воспалительного ответа против патогенов

Иммунный ответ начинается с развития неспецифического воспаления, и далее происходит формирование иммунокомпетентных клеток эффекторов адаптивного иммунитета, усиливающих это воспаление и придающих ему высокую специфичность, т.е. направленность на данный конкретный патоген. Практически любой патологический процесс инфекционной и неинфекционной природы сопровождается развитием воспаления и поэтому происходит с вовлечением иммунной системы. В настоящее время выделяют три основных типа врожденного и адаптивного клеточно-опосредованного эффекторного иммунитета, которые определяют как первый, второй и третий типы воспаления. (рис. 40).

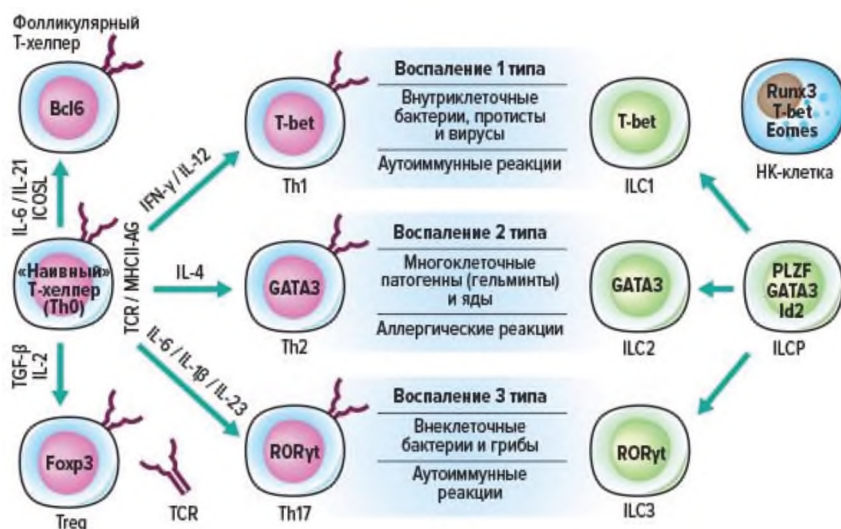


Рис. 40. Основные популяции «поляризованных» Т-хелперов и ILCs, принимающих участие в реализации воспалительных реакций трех основных типов

(адаптирована из Int. J. Mol. Sci. 2020, 21(21), 8011; <https://doi.org/10.3390/ijms21218011>).

Различные типы иммунных реакций обеспечивают характерную для каждого типа патогена максимально эффективную и минимально затратную защитную реакцию. В то же время те же самые три типа воспаления или их комбинации лежат в основе патогенеза различных иммуопосредованных расстройств, имеющих неинфекционную природу

Считается, что наша иммунная система уже на этапе реакций врожденного иммунитета может грубо различать три типа патогенов. Это внутриклеточно паразитирующие патогены (бактерии, простейшие, вирусы), многоклеточные паразиты (например, гельминты) и внеклеточно паразитирующие патогены (бактерии и грибы). Предполагают, что выбор стратегии иммунного ответа определяется типом патогена и его локализацией. Эту стратегию определяют цитокины, которые секретируют клетки, входящие в состав барьерных тканей нашего организма, а также специализированные — ДК (DCs). После распознавания PAMPs и/или DAMPs тканерезидентные клетки получают информацию о природе патогена и, продуцируя соответствующие комбинации цитокинов, «транслируют» эту информацию на ILCs. В дальнейшем именно цитокины, продуцируемые активированными DCs и ILCs, определяют направление поляризации наивных Т-хелперов при развитии определенного типа ответа в лимфоидной ткани. И, наконец, по завершении клональной экспансии и дифференцировки Т-хелперов в периферические ткани мигрируют зрелые Th-клетки, которые при распознавании патогена продуцируют эффекторные цитокины, способные активировать различные эффекторные клетки. Именно клетки-эффекторы врожденного и приобретенного иммунитета играют ведущую роль в уничтожении внедрившегося патогена.

Иммунные реакции, опосредованные клетками первого типа, наиболее эффективны в отношении внутриклеточно паразитирующих микроорганизмов, а также опухолевых клеток. Этот тип иммунных реакций также опосредует отторжение трансплантата и лежит в основе развития некоторых аутоиммунных процессов.

Реакции первого типа регулируют ILC1 и CD4+ Th1, экспрессирующие T-bet+IFN γ . В инициации реакций адаптивного иммунитета задействованы главным образом плазмацитоидные дендритные клетки (pDCs) и классические ДК 1 (cDCs1). Цитокины, регулирующие инициацию и реализацию реакций первого типа, — это IL-12, -18, -15, IFN I типа, TNF α и др. Ключевые клетки-эффекторы при данном типе иммунного ответа, которые непосредственно уничтожают патоген, — лимфоциты с цитотоксическими свойствами, а именно NK- и CD8+ Т-клетки, а также тканевые макрофаги. Традиционно выделяют три главные задачи или функции, которые реализуются при развитии воспаления первого типа:

- элиминация зараженной (вирусами) клетки (NK);
- элиминация патогена в фаголизосомах (M1-макрофаги);
- придание незараженным клеткам антивирусного статуса (IFN I и III типа).

Клетки, принимающие участие в индукции воспаления по первому типу

Дендритные клетки

В рамках воспаления по первому типу рDC, с фенотипом CD123+CD11c-, играют ведущую роль за счет продукции интерферонов I и III типов и IL-12, необходимого для поляризации Th1 и активации ILC1 (рис. 41). Важно отметить, что рDCs несут на своей поверхности молекулы МНС-II и костимулирующие молекулы CD40, CD80 и CD86, необходимые для представления антигена CD4+ Т-лимфоцитам. Однако антигенпрезентирующая функция рDCs не так эффективна, как у классических ДК (cDCs).

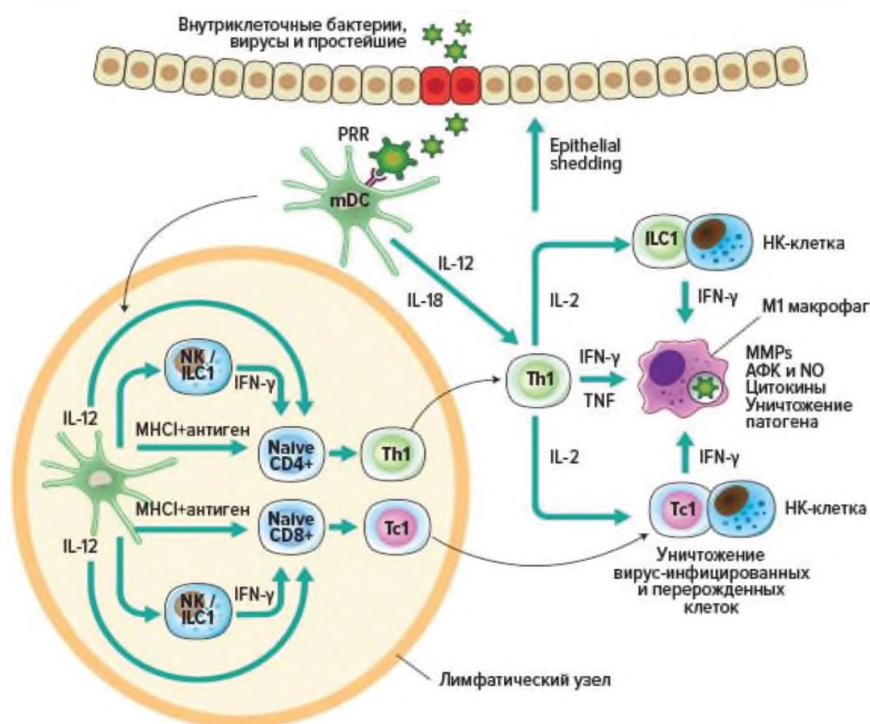


Рис. 41. Схематическое изображение развития воспаления по первому типу

Экспрессия молекул МНС I и МНС II вместе с костимулирующими молекулами (CD80, CD86 и CD40) позволяет рDCs осуществлять презентацию антигенов как CD8+ Т-лимфоцитам, так и CD4+ Т-хелперам. Тогда как секреция IFN I типа и IL-12 рDCs способна стимулировать пролиферацию, дифференцировку и созревание эффекторных CD8+ Т-лимфоцитов, а также дифференцировку и поляризацию наивных CD4+ Т клеток в сторону Th1. Более того, популяция рDCs — это один из основных источников интерферонов I типа (α , β) на ранних

этапах развития иммунного ответа. Эти клетки за счет экспрессии TLR-7 и TLR-9 в эндосомах способны распознавать вирусные нуклеиновые кислоты — одноцепочечную РНК (ssRNA)- и CpG-последовательности в составе ДНК. Особо внимания заслуживает тот факт, что активированные через TLRs pDCs вырабатывают в 100–1000 раз больше IFN I типа, чем обычные соматические клетки организма, что и определяет важнейшую роль этих клеток в формировании сигналов, необходимых для инициации противовирусного ответа.

ILC первого типа

ILC 1 не могут самостоятельно распознавать патогенные паттерны. Эти клетки активируются под влиянием цитокинов микроокружения, которые генерируют DCs и другие тканерезидентные клетки. В ответ на стимуляцию IL-12 и IL-18 ILC1 способны продуцировать IFN γ , TNF, GM-CSF и даже IL-2. Это, а также экспрессия соответствующих транскрипционного фактора Tbet позволяют считать эти клетки аналогами Th1 лимфоцитов системы приобретенного иммунитета. Наиболее известными и хорошо изученными представителями ILC 1 являются NK-клетки. В отличие от ILC1, NK-клетки, кроме T-bet+, дополнительно экспрессируют транскрипционный фактор Eomes. Фенотипически ILC1 можно описать как Lin – CD127+ лимфоциты.

Цитокины, принимающие участие в индукции воспаления по первому типу

IL-12 и его биологические эффекты

Основным источником цитокина являются моноциты/макрофаги и ДК, которые были активированы патогеном через паттерн-распознающие рецепторы различных типов. В некоторых случаях В-клетки, которые в данном случае могут рассматриваться как профессиональные АПК, тоже могут продуцировать IL-12. Основной функцией IL-12 является стимуляция продукции IFN γ NK-клетками и Т-лимфоцитами. Индуцированная под влиянием IL-12 продукция IFN γ усиливает высвобождение провоспалительного цитокина IL-18 и повышает экспрессию рецептора для IL-18, что способствует амплификации ответа. IL-12 совместно с IL-18 усиливает продукцию IFN γ и самого IL-12, а также стимулирует миграцию LC в периферические лимфоидные органы, что способствует усилению развития воспаления за счет повышения эффективности презентации антигенов в лимфоидной ткани и активации реакций адаптивного иммунитета. Ключевой функцией IL-12 является поляризация наивных Th0 в сторону Th1, а также подавление поляризации в сторону Th2. Это способствует усилению воспаления по первому типу, потому что цитокины первого и второго типов воспаления способны реципрокно подавлять активность друг друга. Непосредственно в очаге воспаления IL-12 усиливает цитолитическую активность эффекторных клеток — NK-клеток и антигенспецифических CD8+ Т-лимфоцитов.

IL-18 и его биологические эффекты

IL-18 относится к семейству IL-1 и, подобно некоторым членам этой группы провоспалительных цитокинов, синтезируется в виде неактивного предшественника. Для превращения IL-18 в активную форму с молекулярной массой 18 кДа необходим внутриклеточный процессинг, который осуществляет каспаза-1. Такой механизм позволяет клеткам накапливать IL-18 в неактивной форме и быстро секретировать для выполнения своих биологических функций только при наличии специфического стимула. Так, проформа IL-18 конститутивно экспрессируется в эндотелиальных клетках, а также клетках барьерных тканей — в местах наиболее вероятного проникновения патогена. Более того, в очаге воспаления предшественник IL-18 высвобождается из умирающих клеток и процессируется внеклеточно под действием протеаз нейтрофилов (например, протеиназы-3), что позволяет за короткое время достигать весьма высоких локальных концентраций данного цитокина. Такой же механизм синтеза и секреции характерен для некоторых других членов цитокинового семейства — IL-1 и IL-33.

IL-18 проявляет основные свойства провоспалительных цитокинов, способствуя увеличению экспрессии молекул клеточной адгезии, синтезу оксида азота и продукции других провоспалительных цитокинов и хемокинов. Синергично с IL-12, IL-18 вызывает поляризацию Th0 в Th1, что способствует амплификации воспаления по первому типу. Это связано с тем, что IL-18 способен стимулировать продукцию IFN γ либо совместно с IL-12, либо с IL-15. Самостоятельным действием на продукцию IFN γ IL-18 не обладает. Кроме того, IL-12 и/или IL-15 увеличивают экспрессию β -цепи рецептора для IL-18 по принципу обратной положительной связи. Еще одной важной особенностью IL-18 как иммунорегуляторного цитокина является его способность стимулировать продукцию IFN γ NK-клетками. IL-18 также напрямую повышает перфорин- и FasL-зависимую цитотоксичность NK-клеток и CD8 $^+$ Т-лимфоцитов, что особенно важно при защите от внутриклеточных патогенов. Макрофаги, активированные или «праймированные» M-CSF, экспрессируют мембранную форму IL-18, которая подвергается ферментативному отщеплению в очаге воспаления. Под действием IL-18 и IL-12 тканевые макрофаги могут усиливать продукцию IFN γ . Таким образом, IL-18 играет важнейшую роль в активации различных эффекторных клеток, вовлеченных в воспалительные реакции первого типа.

Эффекторные клетки адаптивного иммунитета воспалительных реакций первого типа

CD4 $^+$ Th1 клетки

В ходе развития адаптивного иммунного ответа после активации TCR в определенном цитокиновом микроокружении наивные CD4 $^+$ Т-клетки могут дифференцироваться или поляризоваться в Th1-клетки. Решающую роль в поляризации Th0- в Th1-клетки играет IL-12, который могут секретировать АПК в

ответ на распознавание определенных PAMPs. IL-12 активирует фактор транскрипции STAT4. В то же время IFN γ , продуцируемый NK-клетками, активирует другой фактор транскрипции — STAT1. Одновременная активация экспрессии в Th0-лимфоцитах транскрипционных факторов STAT1 и STAT4 способна индуцировать экспрессию главного Th1-поляризующего фактора T-bet. T-bet совместно с другими транскрипционными факторами (Hlx, Runx3, Ets-1 и Bhlhe40) запускает экспрессию гена, кодирующего IFN γ . T-bet, самостоятельно или в сочетании с Runx3, ингибирует экспрессию транскрипционных факторов GATA3 и ROR γ t, которые контролируют поляризацию Th0 в другие типы Th (Th2 и Th17). Недавно было установлено, что IL-23 и IL-27 также обладают способностью поляризовать Th0 в Th1. К поляризации в Th1 способны не только наивные CD4+ T-лимфоциты. Благодаря значительной пластичности поляризованных хелперов Th1 могут брать свое начало от других T-хелперных субпопуляций, включая Th17-, Treg- и Tfh-клетки. Th1 экспрессируют характерный набор хемокиновых рецепторов, которые регулируют их миграцию в очаг воспаления. Основными хемокиновыми рецепторами Th1-клеток являются CXCR3 и CCR5, что определяет способность этих клеток мигрировать по градиенту концентрации хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11 — лигандов CXCR3 и градиенту концентрации CCL3, CCL4 и CCL5 — лигандов CCR5. Под действием IFN γ кератиноциты и эпителиальные клетки продуцируют CXCL9, CXCL10 и CXCL11, что способствует дополнительному привлечению Th1-клеток в очаг проникновения патогена и усилению воспаления по первому типу.

CD8+ T-лимфоциты

Основной функцией CD8+ T-лимфоцитов является уничтожение зараженных или опухолевых клеток-мишеней. Эти клетки реализуют свой эффекторный потенциал при помощи трех основных механизмов. Первый механизм основан на продукции эффекторных цитокинов IFN γ и TNF при распознавании клеток-мишеней через TCR. Вторым механизмом является контактный цитолитиз, основанный на высвобождении из гранул перфорина и гранзимов, как это было описано ранее для НК-клеток. И, наконец, третий способ уничтожения клеток-мишеней — это запуск апоптоза за счет активации на их поверхности рецепторов, принадлежащих к семейству TNF-подобных белков (классическим примером является взаимодействие Fas/FasL). Подобно дифференцировке CD4+ Th1, IFN γ и IL-12 способствуют дифференцировке и созреванию цитотоксических CD8+ T-лимфоцитов. Транскрипционный фактор T-bet активирует в цитотоксических T-клетках для продукции IFN γ , а также является крайне необходимым для проявления их цитолитического потенциала. Более того, CD8+ T-лимфоциты (в первую очередь Tc1) экспрессируют на своей поверхности хемокиновые рецепторы CCR5 и CXCR3, свойственные и для Th1, что позволяет этим двум

популяциям Т-клеток направленно мигрировать в один и тот же очаг воспаления, локализованный в периферических тканях.

Ключевые эффекторные цитокины и их функции при реализации воспаления по первому типу

Биологические эффекты $IFN\gamma$

$IFN\gamma$ является ключевым цитокином, вызывающим активацию макрофагов. После стимуляции под влиянием $IFN\gamma$, а также при получении сигнала от CD40L происходит активация макрофагов, что выражается в усилении его микробицидных свойств продукции ROS и азота, повышении эффективности фагоцитоза, секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также поляризация этих клеток в сторону M1. Более того, под действием $IFN\gamma$ повышается эффективность презентации антигенов через MHC II и продукция IL-12, что способствует усилению клеточного ответа как в воспаленной ткани, так и в периферических лимфоидных органах. В лимфоидной ткани $IFN\gamma$ способствует поляризации наивных Th0 в сторону Th1, подавляя Th2 и Th17 программы дифференцировки. $IFN\gamma$, продуцируемый клетками Th1, важен для разрушения плотных контактов между кератиноцитами, что улучшает условия миграции лейкоцитов в очаг воспаления в коже, где эпителий образует достаточно прочный барьер на пути мигрирующих лейкоцитов. $IFN\gamma$, по крайней мере у мышей, играет важную роль в развитии гуморального ответа, способствуя переключению класса синтезируемых В-лимфоцитами антител с IgM на некоторые изотипы IgG, подавляя синтез и секрецию IgE.

Биологические эффекты TNF α

TNF α синтезируется иммунными клетками, в первую очередь моноцитами и макрофагами, а также некоторыми другими типами клеток. Первоначально он синтезируется как молекула с молекулярной массой 26 кДа, ассоциированная с клеточной поверхностью и заякоренная N-концевым гидрофобным доменом. Эта мембраносвязанная форма TNF α обладает сходными с растворимой молекулой биологической активностью. Специфический белок матричной металлопротеиназы, называемый TNF-превращающим ферментом, расщепляет форму 26 кДа до растворимой формы 17 кДа, которая благодаря самосборке формирует гомо-тример, что является важной особенностью для связывания и активации рецепторов для TNF. Практически все ядерные клетки экспрессируют рецепторы TNF (хотя их распределение зависит от типа клетки).

Защитные функции TNF α связаны с его ключевой ролью в иммунном ответе, а также в уничтожении определенных опухолей. TNF α является важнейшим белком острой фазы воспаления, который инициирует каскад цитокинов, увеличивает проницаемость сосудов и тем самым рекрутирует моноциты и нейтрофилы в очаг инфекции из кровотока. Биологические и метаболические эффекты TNF α *in vivo* зависят от количества и скорости, с которой TNF α продуцируется в ответ на специфический стимул. Высокие уровни TNF α приводят к

системным реакциям с повреждением тканей. TNF α способствует развитию лихорадки, высвобождению белков в острой фазе, активации эндотелия, повышению проницаемости сосудов, ДВС. Эти процессы лежат в основе развития ОРДС у взрослых, желудочно-кишечного некроза, острого некроза почечных канальцев, кровоизлияния в надпочечники. Под действием TNF α развивается гепатоспленомегалия, субэндокардиальное воспаление, увеличивается скорость метастазирования опухолей. TNF α индуцирует выброс катаболических гормонов гипоталамуса, усиливает катаболизм белков, липолиз, развитие инсулинорезистентности и анорексии. Считается, что эти реакции направлены на снижение потребления глюкозы клетками тканей и обеспечение необходимыми нутриентами клеток иммунной системы.

Воспаление по первому типу — эффекторная фаза ответа

Важнейшая физиологическая роль иммунного ответа первого типа — это защита от внутриклеточных патогенов, к числу которых относятся *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*. Многие внутриклеточные патогены могут выживать и размножаться внутри тканевых макрофагов периферических тканей, а также некоторых других клетках организма хозяина. Тканевые макрофаги являются важными эффекторными клетками врожденного иммунитета, способными поглощать и убивать многие бактериальных патогены. Поэтому многие внутриклеточно паразитирующие бактерии выработали разнообразные механизмы, которые позволяют им выживать в фаголизосомах и цитоплазме клеток. Активированные в ходе реакций врожденного иммунитета ILC1 и Th1-клетки, а также и CD8+ Т-лимфоциты секретируют IFN γ и TNF. Эти цитокины повышают эффекторные функции НК-клеток врожденного иммунитета, направленные на уничтожение вирус-инфицированных и собственных перерожденных клеток. Как показали недавние исследования, ILC1 являются основными продуцентами IFN γ и других цитокинов во время заражения *Toxoplasma gondii*, однако вклад отдельных ILC1 защиту от других внутриклеточных патогенных инфекций требует дальнейшего изучения. IFN γ и TNF значительно усиливают микробицидную активность макрофагов. Под действием IFN γ тканевые макрофаги приобретают провоспалительный M1-фенотип, наращивают активность лизосомальных протеолитических ферментов, продукцию микробицидных субстанций АФК и NO.

Во время внутриклеточной персистенции патогена некоторая часть микробных белков из фагосом и цитоплазмы процессируются и презентуются в составе молекул МНС I класса. Презентированные антигены могут быть распознаны CD8+ цитотоксическими Т-лимфоцитами и служат сигналом того. CD8+ Т-лимфоциты крайне важны для защиты от вирусов, так как за счет продукции IFN γ и TNF α и своего цитолитического потенциала они способны эффективно уничтожать вирус-инфицированные и собственные перерожденные клетки.

С другой стороны, чрезмерный воспалительный ответ первого типа с вовлечением Th1 реакций адаптивного иммунитета может лежать в основе патогена некоторых заболеваний неинфекционной природы. К их числу можно отнести аутоиммунные органоспецифические патологии — ревматоидный артрит, рассеянный склероз, тиреоидит Хашимото, инсулинзависимый сахарный диабет, аутоиммунный гастрит и другие хронические воспалительные заболевания.

Эффекторный иммунитет, опосредованный клетками второго типа

Иммунный ответ по второму типу, развитие которого регулируют цитокины Th2 и ILC2, характеризуется вовлечением в воспалительный процесс эозинофилов, тучных клеток, базофилов и альтернативно активированных макрофагов (ААМ). Этот тип воспаления сформировался в ходе эволюции для защиты от гельминтов, а также от яда змей, насекомых и клещей. Развитие воспалительного процесса по второму типу в ответ на безвредные антигены, поступающие извне, — пища и вдыхаемые аллергены — лежит в основе аллергических заболеваний. Распознавание эволюционно-консервативных структур этих патогенов паттернами клетками врожденного иммунитета и тканерезидентными клетками инициирует воспаление второго типа, но «адаптивные» Th2 усиливают этот тип ответа за счет продукции цитокинов второго типа (IL-4, -5, -9 и -13), что делает ответ более специфичным и направленным на элиминацию конкретных антигенов, а в случае наличия Th2 клеток иммунологической памяти — еще и более быстрым и эффективным (рис. 42).

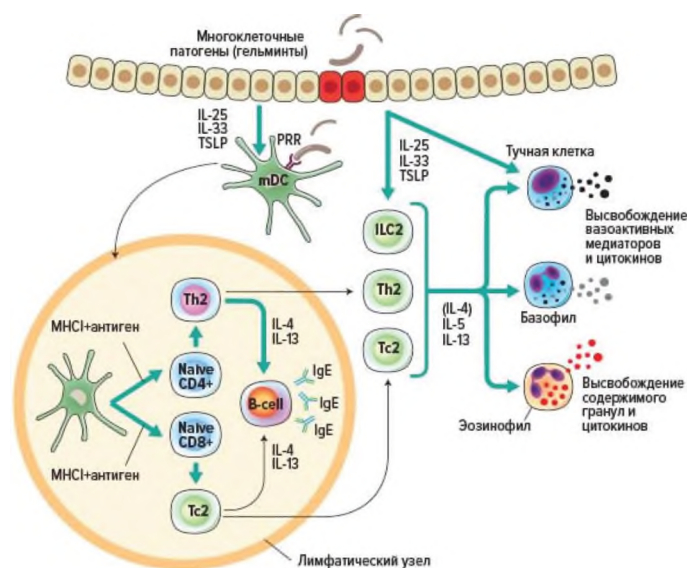


Рис. 42. Схематическое изображение развития воспаления по второму типу. Клетки, принимающие участие в индукции воспаления по второму типу

Дендритные клетки. Как уже отмечалось ранее, cDC2 обладают фенотипом CD1c+FcεR1+SIRPA+ и играют ведущую роль в инициации Th2 адаптивного ответа. Функции этих клеток пока еще детально не исследованы, но они рассматриваются в качестве одного из источников цитокинов для поляризации Th0 в сторону Th2, а также обеспечивают необходимые для активации Т-хелперов костимуляционные сигналы.

ILC второго типа. ILC2 присутствуют в очень небольшом количестве в тканях легких, коже и кишечнике, а также в мезентериальном жире. Они характеризуются высокой экспрессией фактора транскрипции GATA-3, а также IL-7R, CD25, рецепторов IL-33 и IL-25, ILC2 человека, помимо этих маркеров, также экспрессируют CRTH2 (от англ. chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells или CD294) и CD161. Активация ILC2 происходит под действием IL-25, IL-33 и TSLP, которые продуцируются эпителиальными клетками после повреждения ткани при аллергии или гельминтозах. В ответ на активацию ILC2 человека продуцируют полный набор цитокинов, характерных для Th2—IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13, а также некоторое количество провоспалительных IL-6, IL-8 и GM-CSF. ILC2 являются важнейшим источником IL-5, по крайней мере у мышей. ILC2 кишечника в ответ на поступление пищи, под действием вазоактивного кишечного пептида конститутивно экспрессируют IL-5 и IL-13.

Клинические наблюдения указывают на то, что уровень ILC, продуцирующих IL-13, увеличивается у взрослых с филяриозными инфекциями (например, *Loa loa*, *Wuchereria bancrofti* или *Onchocerca volvulus*). У пациентов, инфицированных *Schistosoma haematobium*, была обнаружена взаимосвязь между площадью фиброзного поражения тканей и уровнем ILC2. Однако было показано, что у детей в возрасте от 6 до 9 лет количество ILC2 положительно коррелирует с успешным разрешением шистосомоза. Лучше всего исследована роль ILC2 при аллергических реакциях, у пациентов с хроническим риносинуситом и бронхиальной астмой. Также ILC2 играют важную роль в процессах регенерации кожи.

Цитокины, участвующие в индукции воспаления по второму типу

Ключевую роль в запуске реакций данного типа играют активированные под влиянием PAMPs клетки барьерных тканей, которые в ответ на стимуляцию и/или повреждение секретируют **три ключевые сигнальные молекулы** — TSLP, IL-25 и IL-33.

TSLP был впервые охарактеризован как фактор роста лимфоцитов. Основным источником этого цитокина являются активированные эпителиальные клетки легких и кишечника, кератиноциты и фибробласты. Однако ДК, тучные клетки и, предположительно, другие иммунные клетки также могут продуцировать TSLP при стимуляции. К числу клеток-мишеней TSLP относят иммунные клетки (ДК, ILC2, Т- и В-клетки, НКТ и Treg-клетки, эозинофилы, нейтрофилы,

базофилы, моноциты, тучные клетки и макрофаги) и неиммунные клетки (тромбоциты и нейроны). TSLP обладает способностью усиливать активацию и функциональную активность CD11c+ cDC, вызывая усиление экспрессии МНС II, ко-стимулирующих молекул CD40 и CD80 и высвобождение хемокинов, привлекающих клетки Th2. В Т-лимфоцитах TSLP активирует транскрипционный фактор STAT5, что в сочетании с сигналом от TCR индуцирует пролиферацию клеток. TSLP участвует в патогенезе различных аллергических заболеваний (например, атопический дерматит, бронхиальная астма, эозинофильный эзофагит), хотя показана его роль и в развитии хронических воспалительных (например, хроническая обструктивная болезнь легких и целиакия) и аутоиммунных (например, псориаз, ревматоидный артрит) расстройств и некоторых видах рака.

IL-33 относится к «внутриядерным» цитокинам, которые высвобождаются после гибели клетки при повреждении тканей. Следует отметить, что IL-33 конститутивно обнаруживается в ядрах эндотелиальных клеток человека, эпителиальных клетках, кератиноцитах, фибробластах, гладкомышечных клетках и глиальных клетках. В живых клетках после синтеза белка цитозольный IL-33 перемещается в ядро, где связывается с хроматином. N-концевой домен IL-33 содержит последовательность ядерной локализации и хроматин-связывающий домен, что обеспечивает его ядерную транслокацию. Пассивное высвобождение IL-33 из некротических клеток позволяет рассматривать данный цитокин в качестве «алармина». Первоначально IL-33 был идентифицирован как индуктор дифференцировки Th2-клеток и продукции цитокинов второго типа — IL-4, IL-5 и IL-13. Однако мишенями этого цитокина также являются Th2, ILC2, Treg, НКТ-клетки, CD8+ Т-клетки, M2 макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, тучные клетки и НК-клетки. IL-33 стимулирует ILC2 для экспрессии цитокинов 2-го типа — IL-5 и IL-13, а также эпидермального фактора роста амфирегулина (AREG), чем обусловлено его регенеративное действие при повреждении тканей.

IL-25 относится к семейству цитокинов IL-17. IL-25 вырабатывается многими типами клеток. Эти клетки включают Т-клетки, ДК, макрофаги, тучные клетки, базофилы, эозинофилы, эпителиальные клетки и клетки Панета. IL-25 стимулирует эффекторные функции эозинофилов и, по-видимому, играет важную роль в Th2-опосредованной активации при глистных инвазиях. Уровень этого цитокина нарастает при обострении аллергических заболеваний дыхательных путей. Основными мишенями IL-25 являются клетки врожденного иммунитета — НКТ-клетки, моноциты и ILC2. IL-25 способствует поляризации наивных CD4+ Т-лимфоцитов в сторону Th2, а усиливает продукцию цитокинов эффекторными Th2 клетками и Th2 клетки памяти. Гиперпродукция IL-25 может способствовать нарушению регуляции Th2-ответа при астме, снижать эффективность защитного иммунитета против гельминтов, а также приводить к развитию некоторых аутоиммунных заболеваний.

Эффекторные клетки приобретенного иммунитета воспалительных реакций второго типа

CD4+ Th2 клетки

IL-2 и IL-4 являются двумя ключевыми цитокинами для поляризации Th2. Эта комбинация цитокинов индуцирует экспрессию фактора транскрипции GATA3, абсолютно необходимого для дифференцировки клеток Th2 и их функционирования как *in vitro*, так и *in vivo*. Более того, GATA3 не только играет важную роль в индукции и поддержании программы Th2 клеток, он также подавляет экспрессию других факторов транскрипции — T-bet и ROR γ t. Помимо GATA3, другие факторы транскрипции, включая c-Maf, STAT3 и Notch/CSL, также могут регулировать дифференцировку и функции Th2-клеток. Было обнаружено, что присутствие IL-4 в микроокружении при взаимодействии АПК с наивными Th0-клетками критически необходимо для дифференцировки Th2-клеток как у мышей, так и у человека, но источник этого цитокина до сих пор неизвестен. Предполагают, что базофилы могут действовать как Th2-индуцирующие АПК, но только для Т-клеток памяти. Потому что только зрелые ДК имеют достаточно высокий для активации наивных Т-клеток уровень костимуляторных сигналов. Каким бы ни был источник раннего IL-4, этот цитокин имеет решающее значение для поляризации Th0 в Th2. Th2 человека экспрессируют такой же набор хемокиновых рецепторов, что и ILC2s, — CCR3, CCR4 и CCR8 мигрируют в ответ на общие с ними хемоаттрактанты.

Ключевые эффекторные цитокины и их функции при реализации воспаления по второму типу

IL-4 и его биологические эффекты

IL-4 имеет решающее значение для поляризации Th0 в сторону Th2 (блокируя другие программы поляризации Th и в первую очередь — Th1), а также является важнейшим аутокринным фактором для дифференцировки и пролиферации Th2. Вместе с тем IL-4 может также стимулировать DCs и макрофаги к усилению синтеза ими IL-12, обеспечивая механизм отрицательной обратной связи для регуляции Th2 ответа и воспаления по второму типу в целом. IL-4 стимулирует рост и дифференцировку В-лимфоцитов, повышенную экспрессию МНС II и FcRII (CD23) и, самое важное, способствует переключению класса синтезируемых антител В-клеток на IgG4 и IgE, который необходим для эффективного противогельминтного иммунитета.

В очаге воспаления IL-4 совместно с IL-13 отвечает за поляризацию и поддержание функциональной активности M2 макрофагов с выраженными противовоспалительными свойствами и способностью запускать процессы репарации и регенерации поврежденных тканей. IL-4 ингибирует секрецию провоспалительных хемокинов и цитокинов, снижает способность производить ROS и активные

формы азота, а также блокирует IFN γ -индуцированную экспрессию молекул клеточной адгезии активированными макрофагами.

IL-4 является важнейшим фактором роста тучных клеток и контролирует IgE-опосредованную дегрануляцию тучных клеток. Продукция IgE позволяет клеткам, несущим рецепторы для IgE, проявлять свои эффекторные свойства. IL-4, IL-5 и IL-13 за счет активации эндотелия сосудов микроциркуляторного русла и секреции хемокинов отвечают за привлечение лейкоцитов в очаг воспаления. IL-4 стимулирует перистальтику кишечника.

IL-5 и его биологические эффекты

IL-5 играет ключевую роль во всех аспектах функционирования эозинофилов, включая их активацию, терминальную дифференцировку, пролиферацию, и выживании эозинофилов как на ранних стадиях развития, так и в очаге воспаления. Эозинофилы обладают высокой экспрессией рецептора для данного цитокина, а также являются одним из важнейших его источников. IL-5 также подавляет апоптоз активированных эозинофилов. Уровень IL-5 увеличивается при астме, аллергии и воспалении. IL-5 является важнейшей терапевтической мишенью для заболеваний, связанных с эозинофилами.

IL-13 и его биологические эффекты

IL-13 выполняет множество различных функций как местного, так и системного характера. К местным эффектам данного цитокина можно отнести усиление продукции фибробластами коллагена, что является неотъемлемой частью как репаративных процессов, так и фиброобразования тканей. IL-13 стимулирует пролиферацию гладкомышечных клеток и активирует эндотелий сосудов и эпителий слизистых. IL-13 играет важную роль в усилении функциональной активности СТМС и эозинофилов, подавляя провоспалительные свойства тканевых макрофагов, их способности поляризации в M2. На системном уровне IL-13 усиливает перистальтику кишечника и секрецию слизи способствуя механическому удалению многоклеточных паразитов. IL-13 индуцирует переключение класса синтезируемых В-клеткой антител с IgM на IgE. В целом функции IL-13 очень тесно схожи с таковыми IL-4, что указывает на синергизм в биологических эффектах этих двух цитокинов.

Воспаление по второму типу — эффекторная фаза ответа

Длительное время развитие реакций воспаления по второму типу рассматривали как процессы, направленные исключительно на уничтожение гельминтов. Сейчас же эти представления существенно расширились, т.к. было установлено, что развитие второго типа воспаления происходит в ответ на ядовитые ксенобиотики, яды различных эктопаразитов (включая клещей и комаров), гематофагальной жидкости и ряда других факторов, проникающих в организм из окружающей среды, вызывающих развитие аллергических реакций. Ранее аллергический ответ считался неадекватным проявлением реакций иммунитета, т.к. считалось, что аллергия возникает в ответ на безвредные антигены окружающей

среды. Самая последняя свежая и новая точка зрения состоит в том, что аллергены на самом деле не являются безобидными. Эта гипотеза согласуется с недавней демонстрацией того, что фосфолипаза А₂, основной аллерген пчелиного яда, вызывает некроз клеток и посредством ферментативного расщепления мембранных фосфолипидов и высвобождения IL-33 инициирует развитие воспаления второго типа.

Эффекторный иммунитет, опосредованный клетками третьего типа

Клеточный иммунный ответ по третьему типу, который регулируют цитокины, продуцируемые Th17 и ILC17, характеризуется притоком из периферической крови в воспаленную ткань нейтрофилов, а также активацией клеток барьерных тканей, с увеличением продукции слизи и антимикробных защитных факторов. Иммунитет третьего типа направлен на элиминацию внеклеточных бактерий и грибов, ключевую роль в его индукции играют ROR γ t⁺ лимфоциты, продуцирующие только IL-17 или IL-17 в комбинации с IL-22. Ключевую роль в запуске реакций данного типа играют активированные PAMPs клетки эпителия и иммунные клетки, которые локализованы в барьерных тканях. Распознавание патогенных паттернов внеклеточных бактерий и грибов индуцирует секрецию этими клетками IL-1 β и IL-23, а также IL-6. cDC2 тоже специализируются на распознавании консервативных структур этих патогенов и продуцируют IL-1 β и IL-23. Эти цитокины запускают продукцию эффекторных цитокинов ILC3 в периферических тканях и обеспечивают поляризацию Th0 в Th17 во вторичных лимфоидных органах. IL-17A, IL-17F и IL-22 активируют как иммунные, так и неиммунные клетки, запускают секрецию матриксных металлопептидаз (ММП), оксида азота (NO), цитокинов, антимикробных пептидов, привлекают и активируют нейтрофилы за счет продукции CXCL8 (IL-8). Продуцируемый ILC3 IL-22 способствует усилению барьерных функций эпителия слизистых. Этот тип иммунного ответа играет важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний (рис. 43).

Клетки, участвующие в индукции воспаления по третьему типу

Дендритные клетки. Следует отметить, что наши представления о роли различных типов DCs в развитии ответа по третьему типу весьма фрагментарны и базируются в основном на наблюдениях за модельными животными, которые указывают на ведущую роль активированных внеклеточными патогенами cDC2.

Так, функции CD103+CD11b⁺ cDC2 тесно связаны с активацией врожденных лимфоидных клеток группы 3 (ILC3), формированием антигенспецифического IgA за счет формирования Tfh и поляризацией наивных Th0 в сторону Th17. Хотя механизмы, лежащие в основе повышенной способности cDC2 формировать Th17, до конца не изучены, было показано, что CD11b+CD103⁺ cDC2 являются основным источником IL-6 и IL-23 после стимуляции паттерн-распознающих рецепторов.

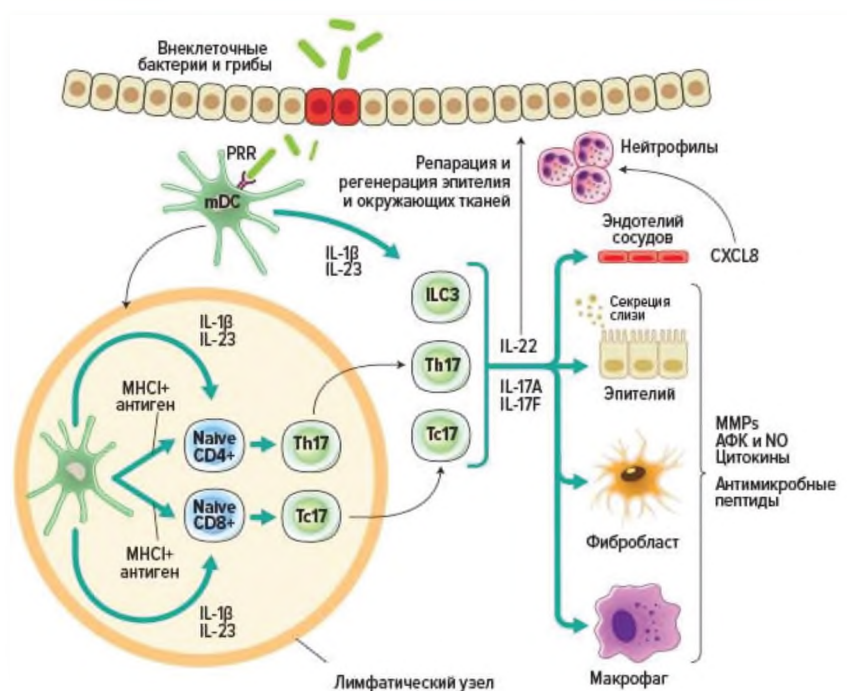


Рис. 43. Схематическое изображение развития воспаления по третьему типу

ILC третьего типа. ILC третьей группы, или ILC3 характеризуются экспрессией фактора транскрипции $ROR\gamma t$, который играет ключевую роль в регуляции экспрессии эффекторных молекул этих клеток, а также важен для их развития и эффективного функционирования при активации. Кроме того, они несут на своей поверхности $IL-7R$, способны к синтезу и секреции $IL-17$ и $IL-22$. $ROR\gamma t^+$ ILC3, появляющиеся во время эмбриогенеза, важны для пренатального формирования периферических лимфоидных органов — лимфатических узлов и пейеровых бляшек. $ROR\gamma t^+$ ILC3 присутствуют в небольшом количестве и после рождения у людей и мышей на поверхности слизистых оболочек. ILC3 человека характеризуются экспрессией $ROR\gamma t$, $IL-7R$, $LT\alpha 1\beta 2$ и $IL-22$ (и в меньшей степени — $IL-17$). Было показано, что в дополнение к упомянутым цитокинам ILC3 человека, выделенные из миндалин, экспрессируют $IL-26$, $GM-CSF$, TNF , $CCL20$ и $IL-2$. Продукция цитокинов ILC3 мыши и человека может быть вызвана при стимуляции $IL-1\beta$ и $IL-23$.

Цитокины, принимающие участие в индукции воспаления по третьему типу

$IL-1\beta$ синтезируется в виде проформы (цитоплазмы в неактивном состоянии). Для его активации необходима сборка инфламмосомы (мультипротеиновой

платформы), ключевым этапом которой является мультимеризация адаптера ASC (или PYCARD), после чего идут рекрутирование каспазы-1, димеризация каспазы-1 = активация и аутопротеолиз. После этого возможен протеолиз pro-IL-1 или pro-IL-18 с последующей секрецией этих цитокинов. Известно по крайней мере семь различных рецепторов инфламмасом, а именно NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6, NLRP12 и AIM2. Все используют ASC для запуска образования каспазы-1. Таким образом, для активации IL-1 β необходим сложный процесс сборки инфламмасы, который запускается под действием различных сигналов, например появления высоких концентраций АТФ, выходящих из окружающих поврежденных клеток. Все это необходимо для более точной настройки системы и предотвращения спонтанной активации воспаления по третьему типу.

Биологические эффекты IL-1 β связаны с его способностью активировать клетки различного происхождения на продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов. За счет активации клеток эндотелия сосудов происходит привлечение в очаг воспаления из кровотока лейкоцитов с последующей их активацией, усилением фагоцитарной активности. На системном уровне этот цитокин отвечает за регуляцию температуры тела, работы желез внутренней секреции, а также усиление продукции белков острой фазы воспаления гепатоцитами печени. К системным эффектам также можно отнести и стимуляцию гемопоэза в красном костном мозге.

IL-23 относится к провоспалительным цитокинам, принадлежит к семейству IL-12 вместе с IL-12, IL-27, IL-35 и IL-39. IL-23 преимущественно секретируется активированными макрофагами и ДК, расположенными в тканях, таких как кожа, слизистая оболочка кишечника, суставы и легкие. IL-23 способствует продукции IL-17, IL-22, GM-CSF и TNF α целевыми популяциями клеток-мишеней. Эти цитокины способствуют привлечению в очаг инфекции нейтрофилов и макрофагов, что сопровождается развитием очагов хронического воспаления и может приводить к повреждению тканей. IL-23 играет ключевую роль в поляризации адаптивного иммунного ответа, индуцируя дифференцировку наивных клеток Т-клеток (Th0) в Т-хелперы 17-го типа (Th17). IL-23 выполняет важнейшую защитную функцию при бактериальных и грибковых инфекциях. Одновременно гиперпродукция этого цитокина связана с развитием хронического воспаления и аутоиммунных реакций, включая псориаз, анкилозирующий спондилоартрит, воспалительные заболевания кишечника, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, рассеянный склероз и т.д.

IL-6 является плеiotропным цитокином, проявление биологической активности которого связано с регуляцией процессов дифференцировки, выживаемости, гибели при помощи апоптоза и пролиферации клеток различного происхождения. IL-6 функционирует как аутокринный, паракринный и гормоноподобный регулятор разнообразных локальных и системных процессов. Так, к эффектам IL-6 относятся регуляция острофазового ответа (синтез белков острой фазы воспаления клетками печени), дифференцировка иммунокомпетентных клеток,

участвующих в воспалительном ответе, поляризация Th0 в Th17 и фолликулярных Th, переключение классов синтезируемых антител В-клетками, стимуляция миелопоэза, активация остеокластов и ремоделирование костной ткани.

Эффекторные клетки приобретенного иммунитета воспалительных реакций третьего типа

CD4+ Th17 клетки

Th17 играют ведущую роль в развитии антигенспецифического ответа по 3-му типу, направленного на защиту от внеклеточных бактерий и грибов, и участвуют в развитии многих аутоиммунных заболеваний, включая рассеянный склероз. Несколько независимых исследований, посвященных анализу роли IL-23 и IL-12 в развитии аутоиммунных патологий и вышедших в 2003 году, послужили основой для выделения Th17-клеток в отдельный тип уже в 2005 году.

Компоненты бактериальной клеточной стенки и клеточной стенки грибов могут активировать АПК для выработки провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и IL-23, которые в свою очередь направляют наивные CD4+ Т-клетки к дифференцировке в сторону Th17. Интересно, что для дифференцировки и поляризации Th0 в Th17 требуется больше молекул-регуляторов, чем для поляризации в другие типы хелперов. Цитокины IL-6 и IL-23 активируют STAT3, который необходим для запуска экспрессии главного транскрипционного фактора Th17, поляризующего ROR γ t. Передача сигналов от TCR также может индуцировать экспрессию ROR γ t опосредованно, через активацию NFAT/NF- κ B/AP-1. В свою очередь ROR γ t, наряду с другими факторами транскрипции (IRF4, BATF и Runx1), способствует активации экспрессии генов, специфичных для Th17-клеток. TGF- β в сочетании с IL-6 и IL-21 участвует в дифференцировке Th17-клеток в условиях *in vitro*, хотя в литературе сообщалось о возможности TGF- β -независимого пути дифференцировки Th17-клеток. Th17 секретируют эффекторные цитокины — IL-17A, IL-17F и IL-22, которые индуцируют секрецию MMP, оксида азота (NO), цитокинов и антимикробных пептидов в разных типах иммунных и неиммунных клеток. Действие всех этих факторов направлено на элиминацию внеклеточных патогенов. CXCL8 и G-CSF, продуцируемые Th17, привлекают в участки воспаления нейтрофилы, которые уничтожают патогены при помощи фагоцитоза и продукции широкого спектра микробицидных субстанций. Th17 человека также синтезируют IL-26, который в том числе могут продуцировать и Th1-клетки. Функции этого цитокина изучены слабо, однако известно, что его сывороточная концентрация значительно увеличивается при воспалении кишечника и в синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом.

Ключевые эффекторные цитокины и их функции при реализации воспаления потретьему типу

Основная роль Т-хелперов 17 и ILC3 состоит в регуляции клеточных реакций за счет продукции IL-17 и IL-22.

IL-17 и его биологические эффекты

В настоящее время описано шесть членов семейства IL-17 — IL-17A-IL-17F, однако наиболее хорошо изученными являются IL-17A и IL-17F, так как их гиперпродукция связана с развитием хронических воспалительных заболеваний. IL-17A и IL-17F связываются как дисульфидно-связанные гомо- или гетеродимеры с рецепторным комплексом, образованным субъединицами IL-17RA и IL-17RC на поверхности многочисленных клеток-мишеней. Так, IL-17RA экспрессируется на многих неиммунных клетках, таких как эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки и фибробласты, а также на иммунных клетках, включая нейтрофилы и Т-клетки.

Под действием IL-17 происходит активация тканевых DCs и макрофагов, что сопровождается продукцией провоспалительных медиаторов широкого профиля действий. Еще одной мишенью данного цитокина являются клетки эндотелия сосудов, которые под действием IL-17 также продуцируют широчайший спектр провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также повышают экспрессию молекул клеточной адгезии, обеспечивая приток лейкоцитов в очаг воспаления. IL-17 активирует фибробласты соединительной ткани, индуцируя продукцию этими клетками провоспалительных цитокинов и хемокинов, матриксных металлопротеиназ [(MMPs), от англ. matrix metalloproteinases], способных разрушать основные типы белков внеклеточного матрикса. Отдельно следует упомянуть о местных эффектах IL-17 на слизистых оболочках. IL-17 усиливает продукцию клетками эпителия, фибробластами соединительной ткани и кератиноцитами антимикробных пептидов, цитокинов и хемокинов, привлекающих тучные клетки, нейтрофилы, воспалительные макрофаги Th17 и ILC3. Опосредованная IL-17 продукция IL-6 и G-CSF дополнительно активирует нейтрофилы и другие миелоидные клетки. Также необходимо подчеркнуть, что важнейшими мишенями IL-17 при формировании очагов аутоиммунного воспаления являются хондроциты, остеобласты и остеокласты, которые активируются и продуцируют цитокины и хемокины, способствующие амплификации воспаления.

IL-22 и его биологические эффекты, системные эффекты

IL-22 синтезируется и секретируется в разных типах тканей, а его рецептор экспрессируется на стромальных и эпителиальных клетках. IL-22 принадлежит к семейству цитокинов IL-10, и активные мономеры IL-22 связываются с рецепторным комплексом IL-22 (IL-22R), образованным субъединицами IL-22R1 и IL-10R2. Большая часть функций данного цитокина тесно связана с регуляцией активности клеток, которые входят в состав барьерных тканей. Так, IL-22 способствует регенерации эпителиальных тканей при повреждении, индуцируя пролиферацию и ингибируя апоптоз эпителиальных клеток. IL-22 играет важную роль в стимуляции выживания и пролиферации эпителиальных клеток во время острого повреждения ткани, но чрезмерная продукция IL-22 может привести к гиперпролиферации кератиноцитов, выработке провоспалительных сигналов и последующему привлечению активированных эффекторных клеток из кровотока

в воспаленные ткани. Известно, что IL-22 имеет решающее значение для иммунитета против *Citrobacter rodentium* и вызывает экспрессию генов, регулирующих пролиферацию, заживление ран и апоптоз эпителиальных клеток кишечника, а также стимулирует продукцию ими муцинов и антимикробных пептидов. IL-22 усиливает продукцию антимикробных пептидов и TNF α тканевыми макрофагами.

При воспалительных реакциях, протекающих в кожных покровах, IL-22 оказывает плеiotропное действие на кератиноциты, индуцируя пролиферацию, миграцию, ремоделирование тканей, секрецию антимикробных пептидов, цитокинов и хемокинов. Этот цитокин способствует выработке привлекающих нейтрофилы хемокинов и экспрессии металлопротеиназ внеклеточного матрикса, которые необходимы для ремоделирования тканей во время восстановления эпителия.

GM-CSF и его биологические эффекты, нейтрофилы

Несмотря на то что GM-CSF первоначально был открыт как ростовой фактор (от англ. granulocyte-macrophage colony stimulating factor), этот цитокин играет второстепенную роль в миелопоэзе и становится основным медиатором воспаления тканей. GM-CSF секретируется в виде мономерного цитокина, который связывается с рецептором GM-CSF — гетеродимером, образованным определенной субъединицей α - и β -, общей с рецепторами IL-3 и IL-5. Связывание этого цитокина с рецептором способствует активации Jak2 и последующей активации сигнальных путей STAT5, фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK). Основными клетками-мишенями для GM-CSF являются ДК, моноциты, макрофаги, гранулоциты, нейтрофилы, а также микроглия и астроциты. Он опосредует взаимодействие ILC3 и макрофагов и усиливает поляризацию ответа по третьему типу. GM-CSF усиливает воспаление, фагоцитоз и хемотаксис лейкоцитов, а также играет важную роль в повреждении тканей и демиелинизации.

CCL20 и его биологические эффекты

Хемокин CCL20 экспрессируется кератиноцитами и некоторыми другими клетками барьерных тканей. Его продукция повышается под действием TNF α и IL-17A, а также IL-22. Синовиальные клетки также экспрессируют CCL20, и его экспрессия на этих клетках увеличивается под действием TNF α , IL-17A и IL-1 β , но подавляется IFN γ или IL-4/IL-13. CCL20 играет ведущую роль в привлечении в очаг повреждения тканей Th17 и ДК, что способствует амплификации ответа.

Воспаление по третьему типу — эффекторная фаза ответа

Основная роль реакций иммунитета третьего типа состоит в защите от внеклеточных бактерий и грибов. IL-17, главный цитокин при данном типе воспаления, привлекает нейтрофилы и тканевые макрофаги в ткани и стимулирует продукцию этими клетками антимикробных факторов. Одной из важных функций IL-17 является усиление барьерных функций эпителиев за счет продукции слизи

и антимикробных пептидов эпителиальными клетками. В экспериментальных моделях инфекции на животных IL-17-дефицитные мыши были больше восприимчивы к бактериям и грибам, включая *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. В настоящее время накоплены многочисленные доказательства защитной активности иммунитета типа 17 против внеклеточных бактерий и грибов. Пациенты с мутациями STAT3 (гипер-IgE синдром) очень чувствительны к стафилококковым и грибковым инфекциям вследствие нарушения развития клеток Th17. Дефицит рецептора IL-17 приводит к частым грибковым инфекциям рода *Candida*. Ауtosомно-рецессивная мутация гена, кодирующего адапторную молекулу CARD9, проводящую сигнал от рецептора IL-17, повышает восприимчивость к инфекции грибов рода *Candida*. У пациентов с хроническим кожно-слизистым кандидозом были описаны различные мутации, стимулирующие функции транскрипционного фактора STAT1, ответственного за развитие IL-17-продуцирующих клеток. При хронических кожно-слизистых кандидозах разной этиологии у пациентов обнаруживаются нейтрализующие антитела к IL-17. Также известно, что пациенты с мутациями в гене RORC, кодирующем ROR γ t, страдают хроническим кандидозом, что согласуется с отсутствием у этих пациентов клеток Th17. Реакции адаптивного иммунитета по типу Th17 играют ключевую роль в развитии ряда аутоиммунных заболеваний, среди которых ревматоидный артрит, рассеянный склероз, инсулинозависимый сахарный диабет, увеит, псориаз и синдром воспаленного кишечника (болезнь Крона).

Таким образом, при инфекции развивается иммунный ответ к возбудителю, при аллергии развивается иммунный ответ к аллергену, в ходе онкологического процесса формируется иммунный ответ к опухолевым антигенам и, наконец, аутоиммунные заболевания характеризуются развитием иммунного ответа к структурам собственного организма — аутоантигенам. И, как всякая функция, которая может нанести вред организму в случае ее избыточности, иммунные реакции должны находиться под жестким контролем. Этот контроль осуществляется за счет нейроэндокринной регуляции и внутрисистемной регуляции гуморально-клеточными факторами иммунитета.

Развитие специфического гуморального ответа

Следует отметить, что при развитии специфического гуморального ответа ключевую роль играет взаимодействие между активированным антигеном В-лимфоцитом и антигенспецифическим фолликулярных Т-хелпером. Считается, что контакты этих клеток возможны в периферических лимфоидных органах различной локализации и имеют место на границе Т- и В-зависимых зон лимфоидной ткани. Однако еще до специфического взаимодействия этих клеток должны произойти два ключевых события, которые тесно связаны с процессами распознавания и презентации антигенов:

1) антиген должен быть доставлен в лимфоидную ткань ДК из периферических тканей в Т-зависимые зоны для презентации и активации Tfh (при первичном ответе Tfh формируются впервые за счет поляризирующих цитокинов, а при вторичном ответе ключевую роль в повторном распознавании антигена играют Tfh памяти);

2) антиген должен быть доставлен в лимфоидную ткань с током лимфы и распознан В-клеткой в В-зависимой зоне лимфоидной ткани. Более того, в дальнейшем антиген должен быть поглощен при помощи рецепторно-опосредованного эндоцитоза, процессирован и презентируется активированным В-лимфоцитом, который в данном случае выполняет роль АПК.

Следует отметить, что В-клетки, выполняя функции АПК, распознают так называемые конформационные антигены, то есть антигены нативные или непроецессированные, способные обладать высокой молекулярной массой в силу того, что являются частью крупных молекул или даже целых вирусов и бактерий. В ходе дальнейших процессов, связанных с процессингом и презентацией, эти крупные конформационные антигены разделяются на небольшие фрагменты (отдельные эпитопы), которые можно будет загрузить на молекулы МНС II класса. Суть этого процесса сводится к тому, что исходно один антиген, поглощенный и «разрезанный» на отдельные фрагменты В-клеткой, может быть распознан несколькими Tfh, обладающими различной специфичностью уже к отдельным эпитопам исходно большой молекулы — этот механизм, по-видимому, увеличивает вероятность встречи В- и Т-клеток в пределах лимфоидной ткани. Более того, подобно АПК в периферических тканях, В-клетка также нуждается в сигнале от паттерн-распознающих рецепторов врожденного иммунитета (например, от CD21 — рецептора для фрагментов С3 компонента каскада комплемента). Получение этого подтверждающего сигнала о том, что был распознан именно чужеродный антиген, является очередной защитой от потенциальной аутореактивности. И, наконец, получая эти сигналы от рецепторов врожденного иммунитета, В-лимфоцит начинает экспрессировать молекулы миграции в Т-зависимые зоны (в первую очередь CCR7).

Таким образом, в Т-зависимой зоне имеют место активация и клональная экспансия антигенспецифических Tfh, которые начинают двигаться в сторону В-зависимых зон, тогда как из В-зависимых зон им навстречу устремляются активированные антигеном В-лимфоциты. Считается, что встреча этих клеток происходит как раз на границе Т- и В-зависимых зон периферических лимфоидных органов, где В-клетка презентует антиген Tfh. В случае распознавания антигена в ассоциации с МНС II класс TCR Tfh запускаются процесс формирования иммунного синапса и обмен сигналами между клетками. Именно в это время В-лимфоцит перестает выполнять функции АПК, и в нем активируются

программы, свойственные лимфоцитам, главной из которых является клональная экспансия антигенспецифического лимфоцита.

1. Ключевую роль в данном процессе играют взаимодействие CD40L-CD40 и продукция цитокинов фолликулярным Th, про что было рассказано ранее.

2. В ходе клональной экспансии и серии последовательных циклом митоза формирование части В-клеток может происходить вне В-клеточного фолликула (формирование короткоживущих плазматических клеток, которые секретируют антитела той же специфичности, что и исходный В-лимфоцит).

3. Однако часть активированных В-клеток возвращается в В-зависимые зоны, что приводит к формированию В-клеточных фолликулов сложной морфологической структуры и клеточного состава.

Именно с формированием В-клеточного фолликула связано появление В-клеток памяти и плазматических клеток, способных к синтезу и секреции высокоаффинных антител классов, отличных от IgM. Ключевую роль в формировании фолликула принимают фолликулярные Th, а также специализированный тип ДК, получивший название фолликулярных ДК:

- фолликулярные Th обеспечивают В-клетки необходимыми цитокинами и контактными сигнальными молекулами, необходимыми для пролиферации, активации процесса соматических гипермутаций, а также переключения класса синтезируемых антител;

- фолликулярные ДК, в отличие от всех остальных типов ДК, способны сорбировать и сохранять на своей поверхности антигены в том виде, в котором они поступили в лимфатический узел с током лимфы, то есть это хранилище тех самых неизменных или нативных конформационных антигенов; этот запас антигенов необходим для селекции В-клеток, после того как они изменили состав своих антигенраспознающих рецепторов после соматических гипермутаций.

Итак, в сформированном В-клеточном фолликуле протекают следующие процессы:

- клональная экспансия (пролиферация В-клеток под действием цитокинов Tfh — все это происходит в темной зоне фолликула, которая прилежит к границе между В- и Т-зависимыми областями);

- соматические гипермутации — фермент AID (от англ. activation-induced deaminase) замещает случайным образом С на U в пределах участков CDR, где вероятность точечных мутаций крайне высока. В дальнейшем U может заменяться на Т при репликации ДНК, тем самым в свою очередь С тоже может заменяться на Т;

- увеличение аффинности В-клеточного рецептора за счет селекции вновь образовавшихся клонов В-клеток после гипермутаций — только В-клетки, которые сформировали случайным образом высоко-аффинный В-клеточный

рецептор, могут «отнять» антиген у фолликулярной ДК, чтобы его процессировать и презентировать Tfh для получения сигнала на выживание. По большому счету в данном случае работает принцип естественного отбора: сигнал на выживание получает клетка, способная антиген связать (без этого не будет «помощи» от фолликулярного Th), а так как количество антигена сильно лимитировано, то связывание будет только с самыми высокоаффинными рецепторами, а остальные В-лимфоциты сигналов на выживание не получают и будут элиминированы при помощи апоптоза (эти процессы протекают в светлой зоне фолликула, содержание клеток в которой снижается на порядки по сравнению с темной зоной именно вследствие процессов селекции);

– переключение класса синтезируемых антител с IgM на IgG, IgA или IgE за счет цитокинов микроокружения и Tfh. Каждый класс антител обладает своими специфическими свойствами. Так, IgG: 1) опсонизация внеклеточных патогенов для повышения эффективности фагоцитоза макрофагами и нейтрофилами; 2) активация каскада комплемента по классическому пути — борьба с внеклеточными патогенами, локализованными в межклеточном пространстве; 3) антителозависимая клеточная цитотоксичность НК-клеток по отношению к вирусинфицированным и опухолевым клеткам; 4) возможность переноса через плаценту — формирование гуморальной защиты новорожденных. Антитела класса IgA обеспечивают мукозальный иммунитет, защиту слизистых оболочек, состав микрофлоры кишечника. Антитела класса IgE — регуляция активности тучных клеток, базофилов и эозинофилов, борьба с многоклеточными патогенами и грибами.

Таким образом, в результате взаимодействия В-лимфоцита и фолликулярного Th формируются несколько типов В-клеток, которые принципиально различаются по своим функциональным свойствам.

Взаимодействие между активированным антигеном В-лимфоцитом и антигенспецифическим фолликулярным Т-хелпером играет ключевую роль в развитии специфического гуморального ответа.

Считается, что взаимодействие В-лимфоцитов с Tfh-клетками происходит на границе Т- и В-зависимых зон лимфоидной ткани в периферических лимфоидных органах различной локализации. Однако еще до специфического взаимодействия этих клеток должны произойти два ключевых события, которые тесно связаны с процессами распознавания и презентации антигенов (рис. 44).

Антиген должен быть доставлен в лимфоидную ткань ДК из периферических тканей в Т-зависимые зоны для презентации и активации Tfh (при первичном ответе Tfh формируются впервые за счет поляризующих цитокинов, а при вторичном ответе ключевую роль в повторном распознавании антигена играют Tfh памяти). Одновременно растворимый антиген должен быть доставлен в

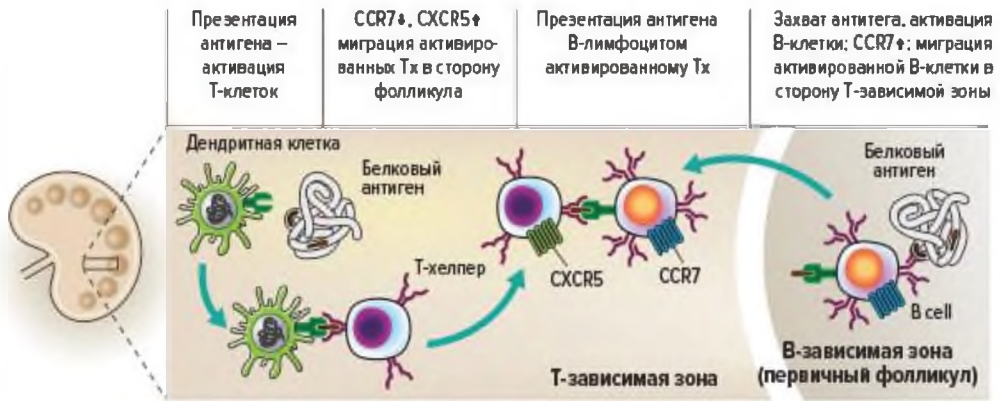


Рис. 44. Фолликулярные Т-хелперы. Формирование фолликулярных Т-хелперов и миграция в В-зависимые зоны периферических лимфоидных органов

(адаптирована из Cellular and Molecular Immunology by Drs. Abul K. Abbas, Andrew H. N. Lichtman, and Shiv Pillai 9th edition, 2017)

лимфоидную ткань с током лимфы и распознан В-клеткой в В-зависимой зоне лимфоидной ткани. В дальнейшем антиген должен быть поглощен при помощи рецепторно-опосредованного эндоцитоза, процессирован и презентируван активированным В-лимфоцитом, который в данном случае выполняет роль АПК. В отличие от других профессиональных АПК, В-лимфоцит специфически распознает захватывает антиген с помощью В-клеточного рецептора. Следует отметить, что В-клетки распознают своим В-клеточным рецептором нативные или непроцессированные антигены. Это могут быть части крупных молекул с высокой молекулярной массой или даже части целых вирусов и бактерий (рис. 45).

В ходе дальнейшего процессинга эти крупные конформационные антигены разделяются на небольшие фрагменты (отдельные эпитопы), которые в фаголизосомах встраиваются в молекулы МНС II класса. Суть этого процесса сводится к тому, что исходно один антиген, поглощенный и «разрезанный» на отдельные пептидные фрагменты В-клеткой, может быть распознан несколькими Т_{fh}, обладающими различной специфичностью уже к отдельным эпитопам исходно большой молекулы: этот механизм, по-видимому, увеличивает вероятность встречи В- и Т-клеток в пределах лимфоидной ткани. Более того, подобно другим АПК, В-клетка также нуждается в сигнале от паттерн-распознающих рецепторов врожденного иммунитета. Примером такого сигнала может служить взаимодействие CD21 — рецептора на В-лимфоцитах с фрагментами С3 компонента каскада комплемента. Получение этого сигнала подтверждает, что В-клеткой был распознан именно чужеродный антиген, и является защитой от

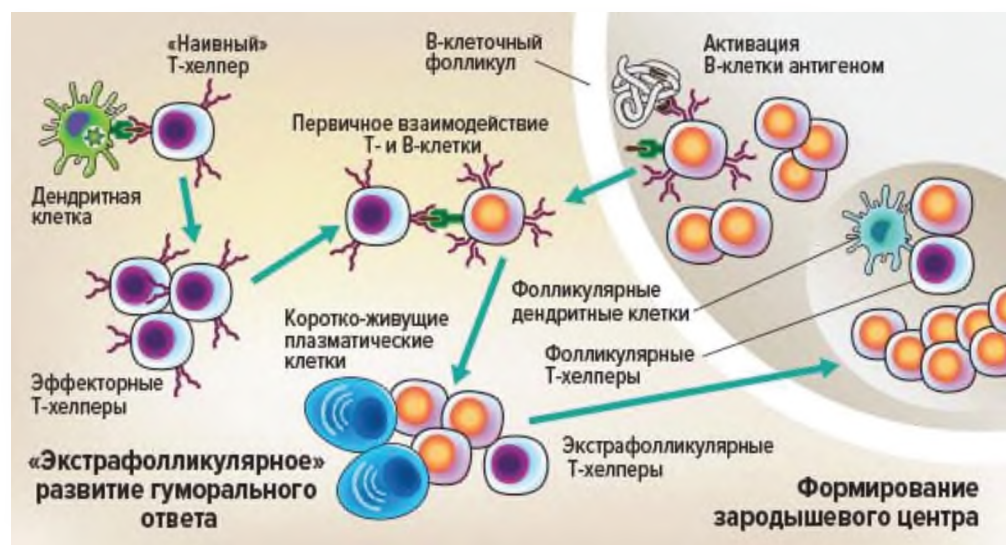


Рис. 45. Взаимодействие фолликулярного Т-хелпера и В-лимфоцита на границе Т- и В-зависимых зон

(адаптирована из Cellular and Molecular Immunology by Drs. Abul K. Abbas, Andrew H. N. Lichtman, and Shiv Pillai 9th edition, 2017)

потенциальной аутореактивности. Сигналы от рецепторов врожденного иммунитета индуцируют экспрессию В-лимфоцитом молекул миграции в Т-зависимые зоны (в первую очередь CCR7).

Фолликулярные Th обеспечивают В-клетки цитокинами и контактными сигнальными молекулами, необходимыми для пролиферации, активации процесса соматических гипермутаций, а также переключения класса синтезируемых антител. Фолликулярные ДК, в отличие от всех остальных типов ДК, имеют негемопоэтическое происхождение. Они способны сорбировать и длительное время экспонировать на своей поверхности антигены в том виде, в котором они поступили в лимфатический узел с током лимфы. То есть они являются «хранилищем» неизменных или нативных конформационных антигенов. Это «хранилище» антигенов необходимо для отбора высокоаффинных клонов В-клеток после соматических гипермутаций В-клеточных антигенраспознающих рецепторов.

Итак, в сформированном В-клеточном фолликуле, в темной зоне, под действием цитокинов Tfh происходит клональная экспансия или пролиферация В-клеток. Пролиферация В-клеток сопровождается соматическими гипермутациями, точечными заменами нуклеотидов в участках, кодирующих антигенраспознающие сайты В-клеточного рецептора. При этом фермент AID (от англ. activation-induced deaminase) случайным образом замещает С на U в пределах

CDR участков антигенраспознающих рецепторов. В дальнейшем при репликации ДНК U может заменяться на T, в свою очередь C тоже может заменяться на T. Только В-клетки, которые случайным образом сформировали высокоаффинный В-клеточный рецептор, могут «отнять» антиген у фолликулярной ДК, процессировать его и презентировать Tfh (рис. 46).

Активация В-клеток антигеном и Th.

Точечные мутации носят «случайный» характер, поэтому необходима дополнительная селекция полученных клонов В-лимфоцитов.

1. При соматических гипермутациях изменяется аффинность В-клеточного рецептора.

2. В-клетки с высоко аффинным В-клеточным рецептором способны распознавать антиген на фолликулярных ДК, связывать его и презентировать фолликулярным Th.

3. Только В-клетки с высоко аффинным В-клеточным рецептором способны выживать, благодаря сигналам от фолликулярных Th; остальные В-клетки – элиминируют

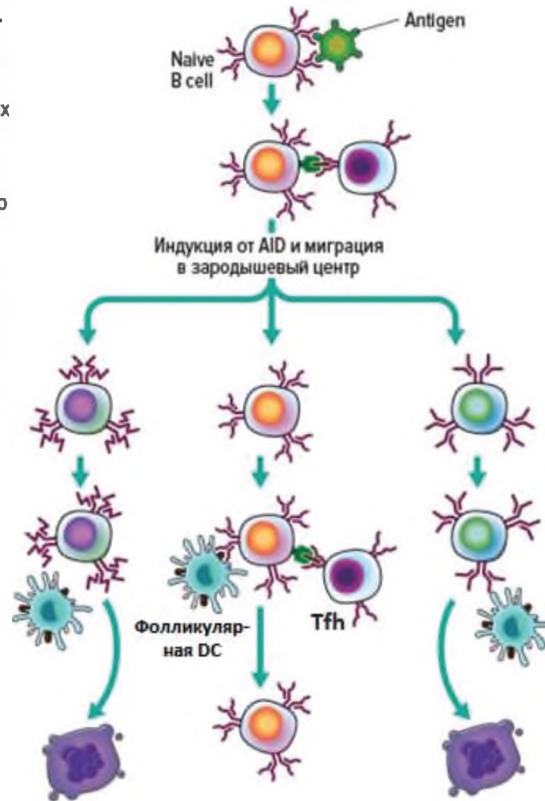


Рис. 46. Активация В-клеток

(адаптирована из Cellular and Molecular Immunology by Drs. Abul K. Abbas, Andrew H. N. Lichtman, and Shiv Pillai 9th edition, 2017)

Поэтому только В-клетки, несущие высокоаффинный В-клеточный рецептор, получают сигнал на выживание от Tfh. Таким образом, фолликулярные ДК и Tfh осуществляют селекцию или отбор из образовавшихся после гипермутаций клонов, несущих высокоаффинный рецептор. Этот процесс напоминает естественный отбор, в ходе которого сначала формируется разнообразие В-лимфоцитов с немного отличающимися рецепторами, а потом из них отбираются лучшие, с высокоаффинным рецептором. Сигнал на выживание получает В-клетка, способная связать антиген, и так как количество антигена сильно

лимитировано, то связывание будет происходить только с самыми высокоаффинными рецепторами. Остальные В-лимфоциты сигналов на выживание не получают и будут погибать путем апоптоза. Описанные процессы селекции протекают в светлой зоне фолликула, где содержание клеток снижается на порядки по сравнению с этим процессом в темной зоне (рис. 47).

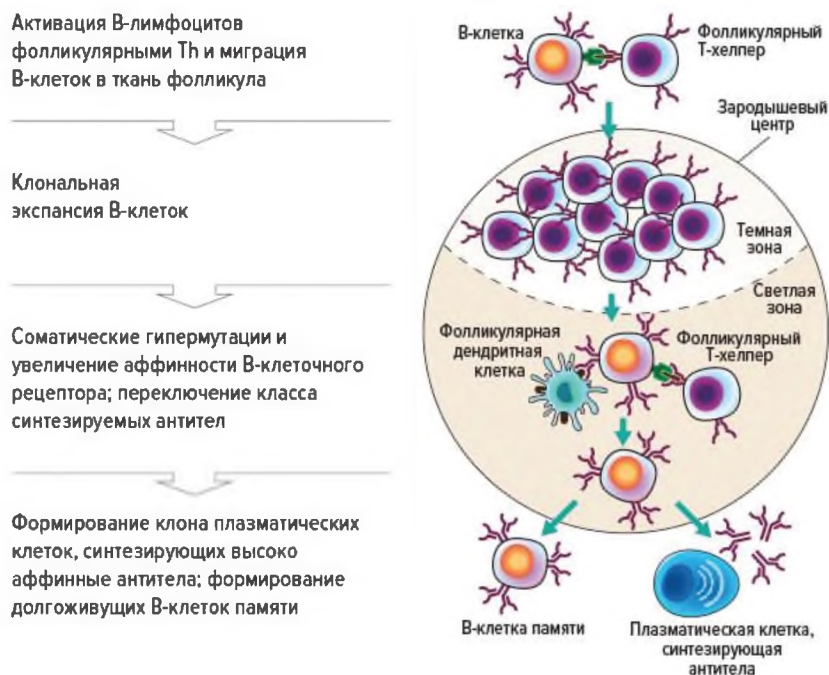


Рис. 47. Процесс развития В-клеточного специфического ответа

(адаптирована из Cellular and Molecular Immunology by Drs. Abul K. Abbas, Andrew H. N. Lichtman, and Shiv Pillai 9th edition, 2017)

Гуморальный иммунный ответ в большей или меньшей степени развивается при любом типе иммунного ответа в ответ на проникновение любого патогена. Однако разные типы иммунного ответа отличаются продукцией классов синтезируемых антител. Переключение класса синтезируемых антител с IgM на IgG, IgA или IgE в В-лимфоцитах происходит под действием Tfh и цитокинового микроокружения, характерного для каждого типа иммунного ответа. Каждый класс антител обладает своими специфическими свойствами. Так, IgG способны к опсонизации внеклеточных патогенов для повышения эффективности фагоцитоза макрофагами и нейтрофилами. Эти антитела могут активировать каскад комплемента по классическому пути, что способствует борьбе с внеклеточными патогенами. IgG опосредуют антителозависимую клеточную цитотоксичность НК-клеток, направленную на элиминацию вирус-инфицированных и опухолевых клеток. Возможность переноса IgG через плаценту способствует

формированию гуморальной защиты новорожденных. Антитела класса IgA обеспечивают мукозальный иммунитет, защиту слизистых оболочек, участвуют в формировании и поддержании состава микрофлоры кишечника. Антитела класса IgE регулируют активность тучных клеток, базофилов и эозинофилов для борьбы с многоклеточными патогенами и грибами (рис. 48).

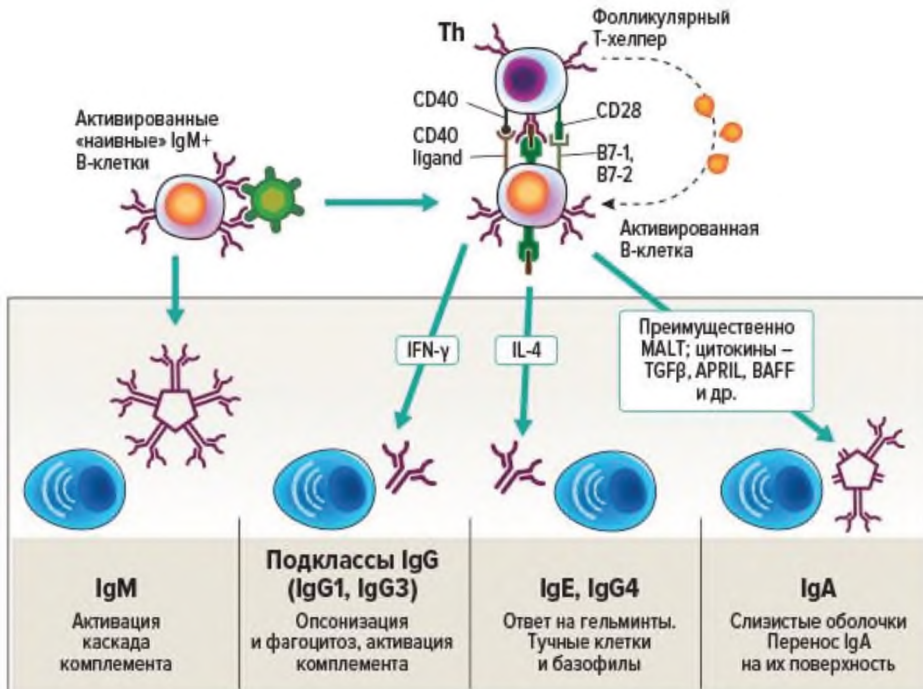


Рис. 48. Переключение класса синтезируемых антител В-лимфоцитом
(адаптирована из Cellular and Molecular Immunology by Drs. Abul K. Abbas, Andrew H. N. Lichtman, and Shiv Pillai 9th edition, 2017)

В результате взаимодействия В-лимфоцита и фолликулярного Th формируется популяция зрелых В-клеток. Выделяют следующие популяции зрелых В-лимфоцитов, различающиеся по свойствам и функциям.

1. **В-клетки памяти отвечают за формирование долговременной иммунологической памяти.** Они способны пролиферировать и быстро, в течение 3–5 дней, дифференцироваться в плазматические клетки; при повторном контакте с антигеном в результате соматических гипермутаций способны к увеличению аффинности и переключению класса синтезируемых антител; локализуются в периферических лимфоидных органах, способны к рециркуляции, живут годами.

2. **Долгоживущие плазматические клетки:** конститутивно (постоянно) синтезируют антитела только одного класса и только одной специфичности;

быстро активируются и увеличивают уровень продукции антигенспецифических антител при повторном контакте с антигеном; преимущественно располагаются в пределах красного костного мозга; неспособны к пролиферации и клональной экспансии.

3. Короткоживущие плазматические клетки: время жизни — 10–20 дней; продукция антител только одного класса и только одной специфичности; локализуются преимущественно в периферических лимфоидных органах и соединительной ткани, подстилающей барьерные ткани организма; неспособны к пролиферации, переключению класса синтезируемых антител и запуску процесса соматических гипермутаций.

Плазматические клетки (как коротко-, так и долгоживущие) продуцируют антитела, выполняющие широкий спектр функций, связанных с «наведением» атаки клеточных и гуморальных факторов на патоген. В целом все многообразие функций антител можно свести к четырем основным функциям, как это было описано выше (см. стр. 66).

Глава 5. ОБЩАЯ СТРУКТУРА МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТКИ



В каждой клетке протекают сотни химических реакций, совокупность которых представляет обмен веществ (метаболизм). Однако в организме человека обмен веществ протекает не хаотично; он интегрирован и тонко настроен. Все превращения органических веществ, процессы синтеза и распада взаимосвязаны, координированы и регулируются механизмами, придающими химическим процессам нужное направление. В организме человека вообще не существует самостоятельного обмена белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот. Все превращения объединены в целостный процесс метаболизма, подчиняющийся диалектическим закономерностям взаимозависимости и взаимообусловленности, допускающий также взаимопревращения между отдельными классами органических веществ. Подобные взаимопревращения диктуются физиологическими потребностями клетки и организма в целом, а также целесообразностью замены одних классов органических веществ другими в условиях блокирования какого-либо процесса при адаптационных процессах и патологии.

Принципиально метаболизм включает в себя три взаимосвязанных между собой процесса:

- распад органических веществ (углеводы, жиры, белки) с аккумуляцией энергии — энергетическое звено;
- синтез мономеров и макромолекул (с затратой энергии), в том числе гормонов, ферментов, кофакторов и пр., — пластическое звено;
- процесс обезвреживания и выведения токсичных продуктов, полученных в результате обмена веществ (продуктов метаболизма), в том числе свободных радикалов, — звено утилизации.

Основные метаболические пути являются общими для большинства клеток и организмов. Эти пути, в результате которых осуществляются синтез, распад и взаимопревращение наиболее важных метаболитов (химических соединений, участвующих в обмене веществ), а также накопление химической энергии, приводятся ниже в упрощенном виде (рис. 49).

Полученные питательных веществ (белки, углеводы, нуклеиновые кислоты и липиды) не могут утилизироваться непосредственно, они сначала разрушаются, т.е. катаболизируются до более мелких фрагментов с высвобождением

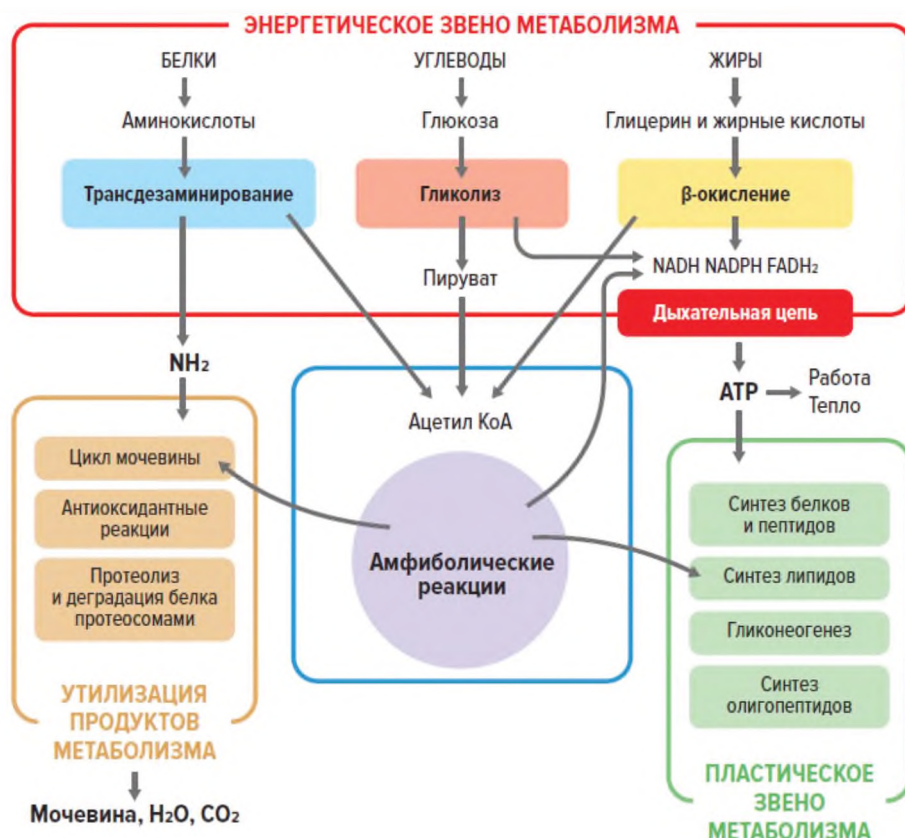


Рис. 49. Обобщенная схема внутриклеточного метаболизма

свободной энергии (катаболизм). Возникающие метаболиты в дальнейшем могут использоваться для синтеза более сложных молекул (анаболизм). Катаболические и анаболические процессы взаимосвязаны между собой и формируют систему промежуточного метаболизма (рис. 50).

Из многочисленных метаболитов наиболее важны пируват и ацетил-КоА. Эти соединения служат связующими элементами между метаболизмом белков, углеводов и липидов. К метаболическому пулу принадлежат также промежуточные метаболиты лимонного цикла. Этот циклический путь (цикл трикарбоновых кислот, цикл Кребса) играет как катаболическую, так и анаболическую роль, т.е. является амфиболическим. К конечным продуктам разрушения органических веществ у животных относятся диоксид углерода (CO_2), вода (H_2O) и аммиак (NH_3). Аммиак превращается в мочевины и в такой форме выводится из организма.

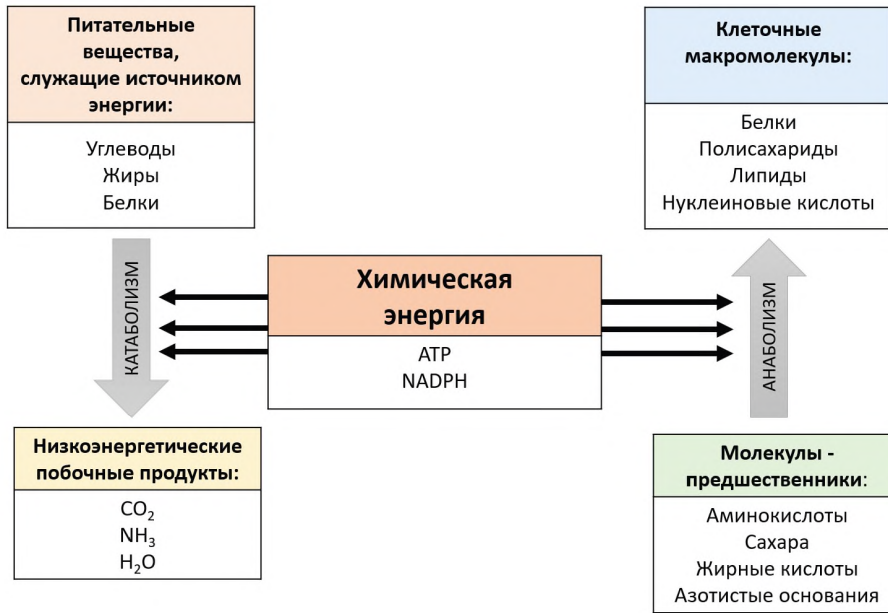


Рис. 50. Структура системы промежуточного метаболизма

Энергетическое звено метаболизма

Источником энергии, используемым организмом для выполнения всех видов работ, служит энергия химической связи. Высвобождение энергии осуществляется в результате окислительно-восстановительного распада простых метаболитов: глюкозы, аминокислот, глицерина, жирных кислот, которые получаются при превращении сложных веществ в пищеварительном тракте.

На I этапе полисахариды расщепляются до моносахаридов (обычно гексоз). Жиры распадаются на глицерин и высшие жирные кислоты, а белки — на составляющие их свободные аминокислоты. Эти процессы в основном являются гидролитическими, и освобождающаяся в небольшом количестве энергия используется в качестве тепла (рис. 51).

На II этапе мономерные молекулы (гексозы, глицерин, жирные кислоты и аминокислоты) подвергаются дальнейшему распаду, в процессе которого образуются богатые энергией фосфатные соединения и ацетил-КоА.

В частности, при гликолизе гексозы расщепляются до пировиноградной кислоты и далее до ацетил-КоА. Этот процесс сопровождается образованием ограниченного числа богатых энергией фосфатных связей путем субстратного фосфорилирования. Высшие жирные кислоты на этом этапе распадаются до ацетил-КоА, в то время как глицерин окисляется по гликолитическому пути до пировиноградной кислоты и далее до ацетил-КоА.

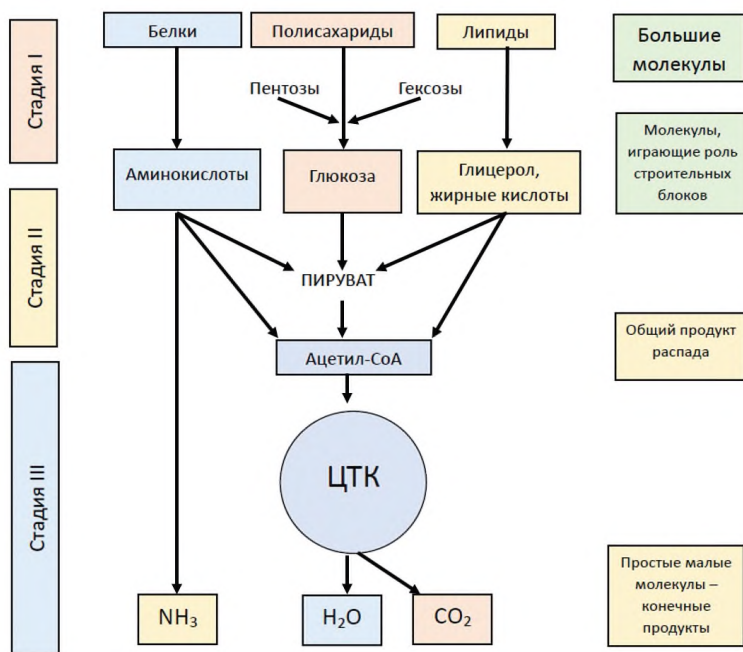


Рис. 51. Этапы катаболического превращения крупных молекул
ЦТК — цикл трикарбоновых веществ

Использование аминокислот как источника энергии (при дефиците углеводов) осуществляется по-разному. Одни аминокислоты непосредственно превращаются в метаболиты цикла Кребса (глутамат, аспартат), другие — опосредованно через глутамат (пролин, гистидин, аргинин), третьи — в пируват и далее в ацетил-КоА (аланин, серин, глицин, цистеин), некоторые из них, в частности лейцин, изолейцин, расщепляются до ацетил-КоА, а из фенилаланина и тирозина, помимо ацетил-КоА, образуется оксалоацетат (через фумаровую кислоту).

Таким образом, на II этапе происходит образование ацетил-КоА, являющегося, по существу, единым (общим) промежуточным продуктом катаболизма основных пищевых веществ в клетках.

На III этапе ацетил-КоА подвергается окислению («сгоранию») в цикле трикарбоновых кислот, которое сопровождается образованием восстановленных форм никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и ФАДН₂.

По существу, первые три этапа можно определить как процесс катаболического превращения крупных молекул.

На IV этапе электроны переносятся от восстановленных нуклеотидов на кислород (через дыхательную цепь). Это сопровождается образованием конечного продукта — молекул воды. Транспорт электронов сопряжен с синтезом АТФ в процессе окислительного фосфорилирования.

Окислительное фосфорилирование — самый эффективный способ синтеза АТФ, в результате которого компоненты дыхательной цепи катализируют перенос электронов от восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) (или восстановленного убихинона) на молекулярный кислород. При этом образуется энергия для синтеза АТФ. Это постоянно действующий и наиболее эффективный путь энергообразования в клетках всех типов, так как в нем наряду с глюкозой могут быть использованы не только жирные кислоты, но и кетоновые тела. Подчеркнем, что при снижении парциального давления кислорода до 90 мм. рт.ст. скорость аэробного гликолиза и окислительного фосфорилирования существенно снижаются. Клиническим эквивалентом этого снижения являются слабость, разбитость, плохое самочувствие.

Помимо основного источника энергии, описанного выше, существуют альтернативные источники получения энергии.

Анаэробный гликолиз — при отсутствии или недостатке в клетке кислорода пировиноградная кислота подвергается восстановлению до молочной кислоты (боли в мышцах, возникающие через некоторое время после непривычной интенсивной физической нагрузки, связаны именно с накоплением в них молочной кислоты). Образование молочной кислоты не является конечным продуктом обмена веществ. Под действием лактатдегидрогеназы молочная кислота окисляется снова в пируват. Кроме того, током крови молочная кислота переносится в печень, где превращается в глюкозу, которая через кровь разносится по всему организму (цикл Кори) (рис. 52).

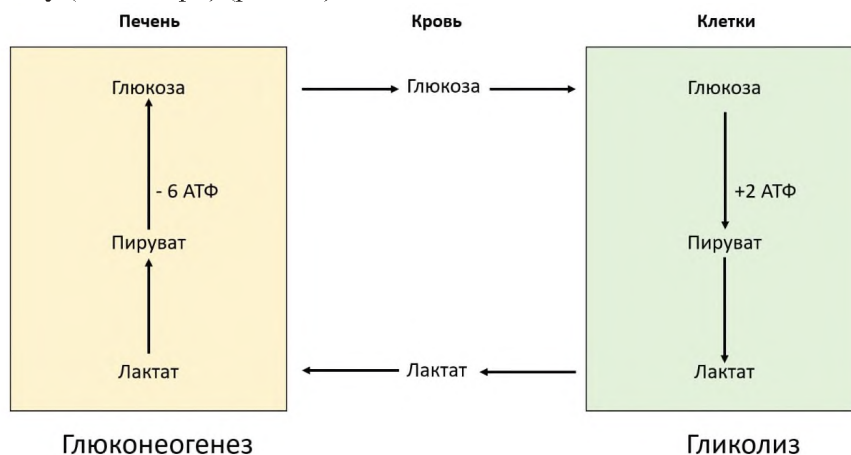


Рис. 52. Цикл Кори

Без существенных последствий для организма анаэробный гликолиз может покрывать кратковременные энергетические нагрузки, даже субмаксимальные. Однако при заболеваниях анаэробный гликолиз не обеспечивает в полной мере потребности клеток в энергии. При этом накапливается молочная кислота, в

результате чего возникает недостаточность функциональных систем, в том числе не связанных напрямую с пораженной системой или органом.

Субстратное фосфорилирование — образование АТФ в ходе метаболического цикла (переход сукцинат-КоА в сукцинат в цикле Кребса и образование пирувата при гликолизе) (рис. 53). Эти реакции способны на некоторое время поддержать жизнедеятельность организма в отсутствие окислительного фосфорилирования.



Рис. 53. Пример реакции субстратного фосфорилирования: образование пирувата в гликолизе

Пентозофосфатный путь окисления глюкозы (или «пентозный шунт») необходим для ресинтеза жирных кислот и предшественников нуклеотидов. При этом образуются НАДФН и продукты, способные включаться в гликолиз и далее в цикл трикарбоновых кислот (рис. 54).

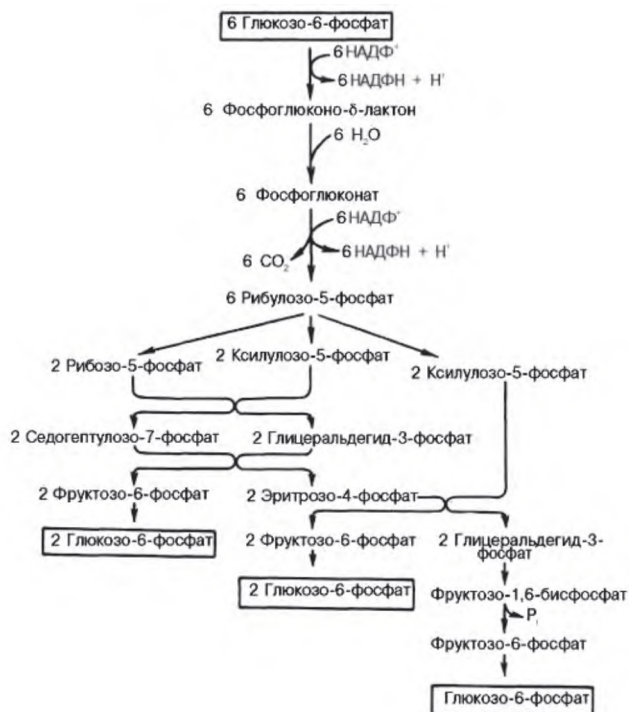


Рис. 54. Пентозофосфатный цикл.

Цифрами показано число молекул, вступивших или образовавшихся в реакции.

Гидролиз креатинфосфата — быстрый и кратковременный путь получения энергии за счет гидролиза креатинфосфата (рис. 55).

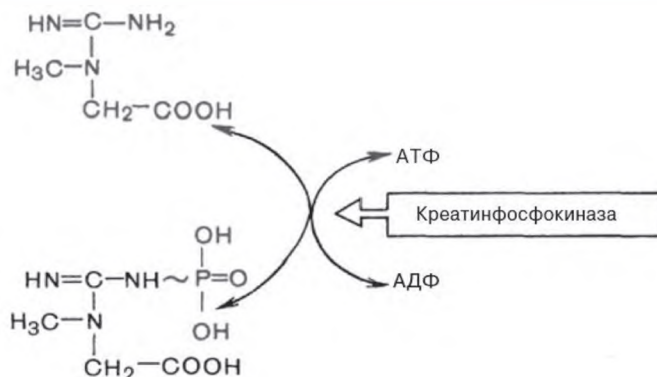


Рис. 55. Ферментативная реакция с участием креатинфосфокиназы

Образование инозинмонофосфата в результате конверсии аденозиндифосфата (АДФ) в АТФ и аденозинмонофосфат (АМФ) (рис. 56).

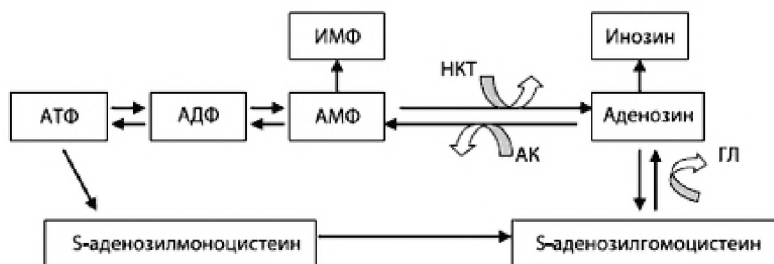


Рис. 56. Основные пути внутриклеточной биотрансформации аденозина:
 ИМФ — инозинмонофосфат, АТФ — аденозинтрифосфат, АДФ — аденозиндифосфат, АМФ — аденозинмонофосфат, НКТ — 5-нуклеотидаза, АК — аденозинкиназа, ГЛ — гидролаза

β-Окисление жирных кислот происходит в митохондриях, при низкой концентрации пирувата и высоком содержании НАД⁺ (рис. 57).

Таким образом, основным источником энергии является цикл Кребса, сопряженный с окислительным фосфорилированием. Главным и быстромобилизуемым исходным субстратом служит глюкоза. Ее метаболизм покрывает основной обмен и обеспечивает жизнедеятельность организма. Главным регуляторным механизмом цикла трикарбоновых кислот и отчасти — окислительного фосфорилирования является кругооборот окислительно-восстановительных эквивалентов, которые обозначают отношением НАДН/НАД⁺.

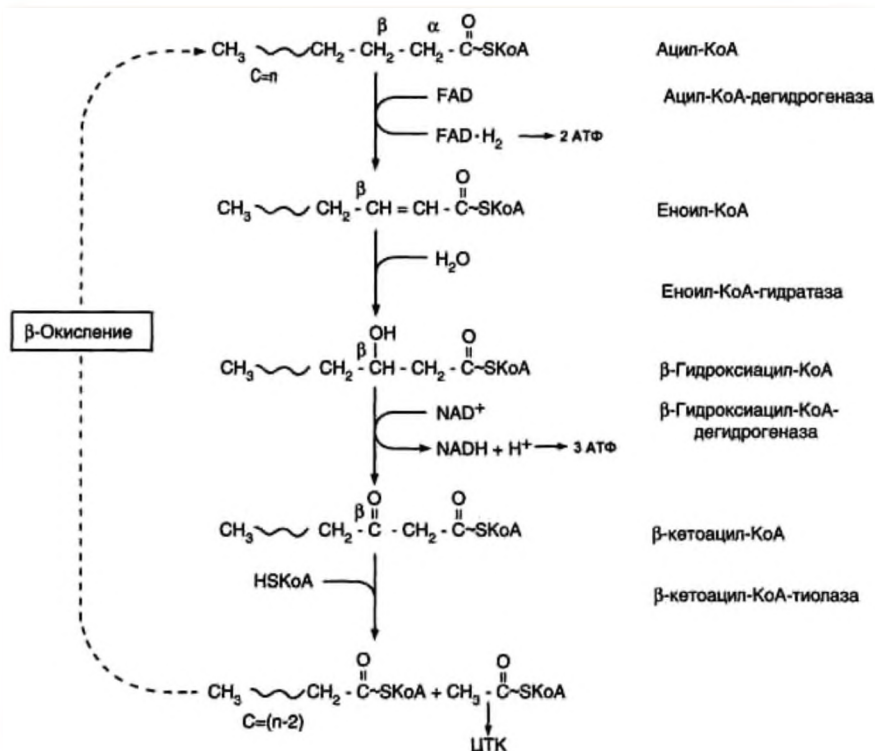


Рис. 57. β-Окисление жирных кислот

[по: Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998].

Пластическое звено метаболизма

Синтез мономеров и макромолекул, в том числе гормонов, ферментов, кофакторов, является основным фактором жизнедеятельности клетки. Без этого невозможно представить нормальную жизнедеятельность организма.

Наиболее сложным и важным является процесс синтеза белка. От этого зависит приспособление к физиологическим потребностям при изменении внутренних и внешних условий, т.е. синтез белка регулируется внешними и внутренними факторами и условиями, которые диктуют клетке, какой набор белка и его количество необходимо синтезировать для выполнения физиологических функций.

Любая живая клетка способна синтезировать белки, особенно в период роста и развития клеток (фаза клеточного цикла G1). В это время активно синтезируются белки для построения клеточных органоидов, мембран, синтезируются ферменты. Биосинтез белков идет интенсивно и в зрелых клетках, этим и определяется их функциональная активность: в клетках пищеварительных желез, синтезирующих белки-ферменты (пепсин, трипсин), в клетках желез внутренней

секреции, синтезирующих белки-гормоны (инсулин, соматотропин), плазматические клетки синтезируют иммуноглобулины, Т-лимфоциты — цитокины и т.д.

Биосинтез белка — сложнейший многостадийный процесс синтеза полипептидной цепи в клетках живых организмов. Упрощенно биосинтез белка можно разделить на стадии транскрипции и трансляции.

Транскрипция — процесс считывания генетического кода с молекулы ДНК. В ДНК содержится и хранится информация о составе первичных структур разных белков. Отрезок ДНК, содержащий информацию о структуре одного белка, называют геном. Молекула ДНК представляет собрание множества генов. При этом на одной из цепочек ДНК синтезируется одноцепочечная молекула информационной или матричной РНК (мРНК). Каждой аминокислоте соответствует участок цепи ДНК из трех рядом стоящих нуклеотидов (кодон). Основную роль в транскрипции играет фермент РНК-полимераза.

Готовая мРНК, кодирующая аминокислотную последовательность будущей белковой цепи, образует затем сложный комплекс со специальной клеточной органеллой — рибосомой. На рибосомах идет второй этап биосинтеза белка — трансляция.

Трансляция заключается в синтезе полипептидной цепи в соответствии с информацией, закодированной в мРНК. Аминокислотная последовательность выстраивается при помощи транспортных РНК (тРНК). Каждой аминокислоте соответствует своя тРНК, имеющая соответствующий антикодон, подходящий к кодону мРНК. Во время трансляции рибосома движется вдоль мРНК, по мере этого наращивается полипептидная цепь. Энергией биосинтеза белка обеспечивается за счет АТФ.

В дальнейшем при помощи вспомогательных белков-шаперонов складывается биологически активная конформация пептидной цепи (свертывание). При посттрансляционном созревании у многих белков удаляются части пептидной цепи или присоединяются дополнительные группы, например олигосахариды или липиды. Эти процессы происходят в эндоплазматическом ретикулуме и в аппарате Гольджи. Затем готовая белковая молекула транспортируется в нужное место клетки.

Значительно проще синтезируются углеводы и липиды. Это не что иное, как цикл простых биохимических реакций, катализируемых ферментами. Исходными субстратами служат вещества, поступившие в клетку или полученные при метаболизме.

В условиях дефицита углеводов необходимая концентрация глюкозы в крови может поддерживаться за счет ее синтеза (глюконеогенез). Синтез глюкозы протекает, как и при гликолизе, но в обратном направлении. Исходными соединениями для глюконеогенеза являются некоторые аминокислоты, лактат, а также глицерин, т.е. те вещества, которые способны превратиться в пируват или

любой другой метаболит глюконеогенеза (аспартат — в оксалоацетат, глицерин — в триозофосфат и т.д.). При различных физиологических состояниях для глюконеогенеза используются различные первичные вещества. В условиях голодания (недостаток углеводов, получаемых с пищей) используется тканевый белок, который распадается до аминокислот. При интенсивной физической работе используется лактат, образующийся в эритроцитах и мышечной ткани при недостатке O_2 . При распаде жиров получается глицерин. В организме человека за счет глюконеогенеза образуются несколько сотен граммов глюкозы в сутки.

Синтез высших жирных кислот может протекать в клетках различных органов и тканей, однако основная масса соединений этого класса синтезируется в печени и в жировой ткани, а важнейшим субстратом, продукты метаболизма которого используются для синтеза липидов, является глюкоза. С наибольшей интенсивностью этот синтез идет в период абсорбции глюкозы в желудочно-кишечном тракте, когда концентрация глюкозы в крови повышена.

Биосинтез липидов основан на синтезе жирных кислот из ацетил-КоА (образуется из глюкозы в результате окисления пирувата) с дальнейшим превращением их в жиры, воск, фосфолипиды и некоторые другие более специализированные биологически активные вещества. Для синтеза из ацетил-КоА в пальмитиновую кислоту, помимо ферментов (ацетил-СоА-карбоксилаза, пальмитилсинтетаза), требуется карнитин, осуществляющий перенос ацетил-КоА из митохондрий в цитоплазму, ацилпереносящий белок, на котором происходит сборка ацильных остатков, и биотин — кофермент ацетил-СоА-карбоксилазы. Под действием ферментов — элонгаз (удлинение цепи) и десатураз (введение двойных связей) — протекает превращение пальмитиновой кислоты в стеариновую и олеиновую.

Необходимо отметить, что ряд полиненасыщенных жирных кислот не синтезируются в организме, хотя они необходимы для нормального функционирования, поэтому линолевая и линоленовая кислоты являются незаменимыми (эссенциальными) и должны поступать в достаточном количестве с пищей. Арахидоновая кислота может синтезироваться в клетках животных из линоленовых кислот, однако в условиях недостаточного поступления линоленовой кислоты с пищей арахидоновая кислота также становится незаменимой жирной кислотой.

Вообще, все высшие жирные кислоты, всосавшиеся в клетки кишечника, используются в энтероцитах для ресинтеза различных липидов. При поступлении в энтероциты моноацилглицеринов они через фосфатидную кислоту могут быть превращены в триацилглицерины. При поступлении в энтероциты лизофосфолипидов они превращаются в фосфолипиды.

Эндогенный синтез других липидов осуществляется в цитозоле клетки. Так, для синтеза триглицеридов и фосфолипидов необходимы фосфодигидроксиацетон — промежуточный продукт расщепления глюкозы — или высшие

жирные кислоты и глицерин, поступающие в клетки из крови (рис. 58). Все необходимые организму глицерофосфолипиды могут синтезироваться в его клетках, причем в клетках могут функционировать несколько альтернативных метаболических путей биосинтеза глицерофосфолипидов.

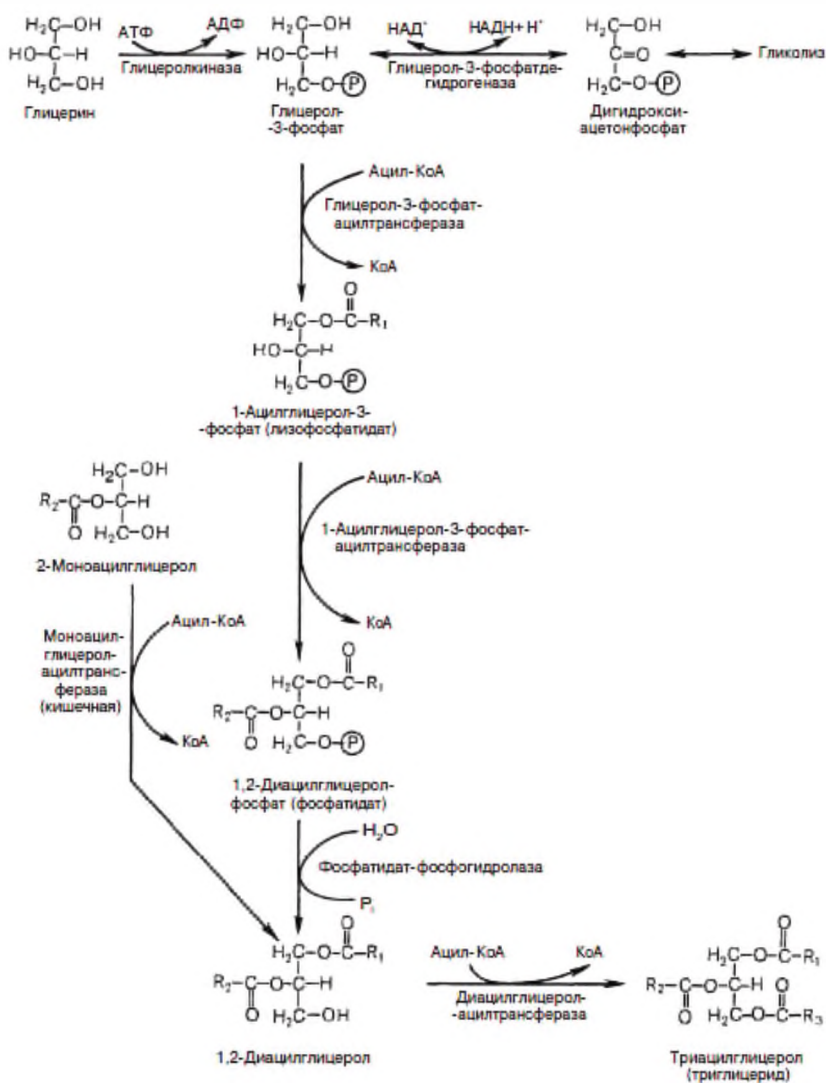


Рис. 58. Биосинтез триглицеридов

[по: Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998].

Сфинголипиды, подобно глицерофосфолипидам, не являются незаменимыми компонентами пищи и могут синтезироваться из других соединений. Для их синтеза нужны в первую очередь сфингозин, активированные жирные

кислоты в виде ацил-КоА-производных, активированный холин или активированные мономеры углеводной природы в виде их уридин-5'-дифосфат (УДФ)-производных для синтеза цереброзидов или ганглиозидов.

Важное значение принадлежит и синтезу холестерина. Общее содержание холестерина в организме составляет около 140 г. Основная масса этого соединения включена в состав мембран всех клеток. Холестерин является предшественником в синтезе других стероидов: желчных кислот, стероидных гормонов, витамина D3. Существует два пути поступления холестерина — экзогенный и эндогенный. Суточная потребность человека в холестерине составляет около 1 г. Причем вся потребность в этом соединении может быть удовлетворена за счет его эндогенного синтеза. В то же время экзогенный, т.е. пищевой, холестерин также эффективно усваивается организмом.

Холестерин синтезируется в клетках из двух углеродных группировок ацетил-КоА (рис. 59). Процесс синтеза холестерина включает в себя порядка 35 последовательных реакций.

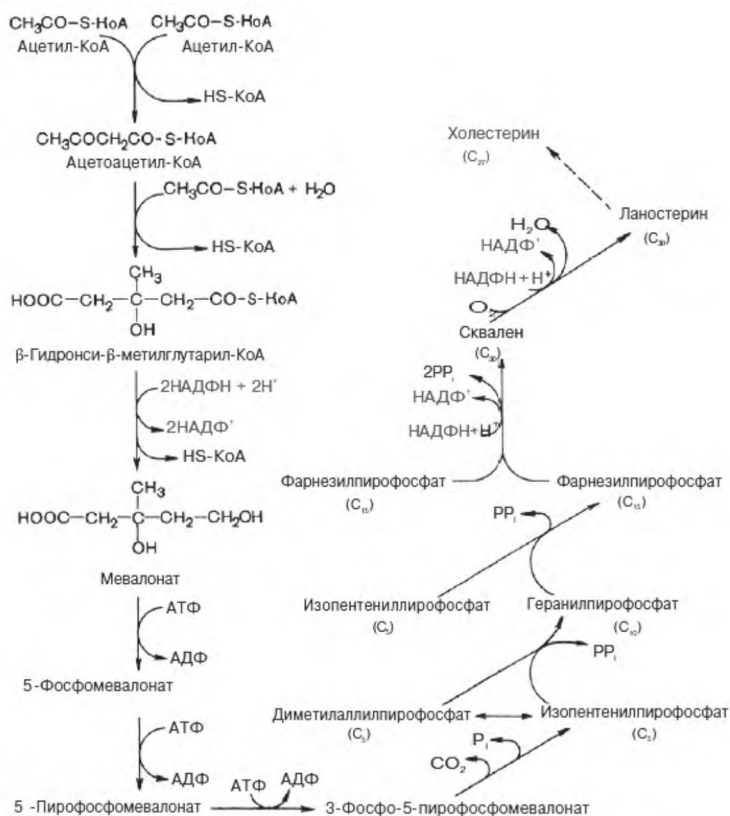


Рис. 59. Общая схема синтеза холестерина

[по: Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998].

Следует отметить, что некоторые промежуточные продукты этого метаболического пути используются для синтеза других соединений. Так, фарнезилпирофосфат используется в клетках для синтеза коэнзима Q, необходимого для работы главной дыхательной цепи митохондрий, или долихола, принимающего участие в синтезе гетероолигосахаридных компонентов гликопротеидов.

Все эти реакции требуют энергетических затрат. Энергия для синтеза доставляется реакцией расщепления АТФ, поэтому каждое звено биосинтеза всегда сопряжено с распадом АТФ.

Утилизация продуктов метаболизма

В процессе жизнедеятельности человека ежедневно разрушается и образуется большое количество органических веществ, прежде всего белков. Это постоянное разрушение и синтез позволяют клеткам быстро приводить в соответствие метаболические потребности с внешними воздействиями. Внутриклеточное разрушение белков происходит частично в лизосомах, частично в протеасомах (в них разрушаются неправильно свернутые или денатурированные белки).

Лизосомы — это органеллы диаметром 0,2–2,0 мкм, окруженные простой мембраной. Обычно на клетку приходится несколько сотен лизосом. Функция лизосом заключается в ферментативной деградации попавших в них макромолекул и клеточных компонентов — органелл. Лизосомы также осуществляют деградацию макромолекул и частиц, захваченных клетками путем эндо- и фагоцитоза. Деградация достигается за счет присутствия в лизосомах различных расщепляющих ферментов — гидролаз с оптимумом действия в кислой области. Главный фермент лизосом — кислая фосфатаза. При рН, близких к нейтральным, характерным для цитоплазмы, эти ферменты обладают низкой активностью. Очевидно, это служит механизмом защиты клеток от самопереваривания в том случае, если лизосомальный фермент случайно попадет в цитоплазму.

При нарушении процессов деградации накапливаются лизосомы с разрушаемыми негидролизованавшимися фрагментами органелл и макромолекул (остаточные тела), что может привести к необратимому повреждению клеток и как результат — к нарушению функций соответствующих органов.

Другая хорошо регулируемая система деградации белков локализована в цитоплазме. Она состоит из больших белковых комплексов, протеасом в виде бочковидной структуры. Это большие мультিকаталитические комплексы с молекулярной массой около 2 млн, называемые 26S-протеасомами (т.е. протеиназами, являющимися крупными частицами — «сомами») (рис. 60).

С торцов протеасомы запираются сложно устроенными, контролирующими доступ структурами. Белки, которым предстоит разрушение в протеасоме (например, содержащие ошибки транскрипции или состарившиеся молекулы), метятся путем ковалентного связывания с небольшим белком убиквитином.

Меченые убиквитином (убиквитинированные) молекулы попадают в протеосомы, где происходит их деградация. Убиквитин не разрушается и после активации используется вновь.

В ходе деградации белков, если полученные аминокислоты повторно не используются для биосинтеза, они расщепляются до конечного продукта — аммиака. Аммиак является конечным продуктом метаболизма белков, аминокислот и других азотистых соединений, т.е. конечным продуктом

распада белка. Он высокотоксичен для организма человека, является клеточным ядом, поэтому быстро инактивируется и выводится из организма. В организме человека это осуществляется прежде всего за счет образования мочевины, которое происходит преимущественно в печени. Накапливающийся в тканях аммиак, соединяясь с глутаматом (в основном) и с аспарагиновой кислотой, образует нетоксичные комплексы для транспортировки — глутамин и аланин.

В печени за счет ферментов — трансаминаз происходит высвобождение аммиака из глутамина и аланина. В дальнейшем аммиак синтезируется в нетоксичную мочевину. Мочевина образуется в результате циклической последовательности реакций с участием гидрокарбоната, N-ацетилглутамата, орнитина, аспартата и фумарата (орнитиновый цикл) (рис. 61).

Биосинтез мочевины требует больших затрат энергии. При необходимости небольшая молекула мочевины может проходить через мембраны. По этой причине, а также из-за ее хорошей растворимости в воде мочевина легко переносится кровью и выводится с мочой. Часть аммиака выводится непосредственно почками, где он высвобождается из глутамина за счет гидролиза амидной группы и диффундирует через клеточные мембраны в просвет канальца (в мочу), где соединяется с протонами, образуя соответствующую кислоту. В этой форме он уже не может реабсорбироваться мембранами клеток почечных трубочек и поэтому экскретируется в составе мочи.

Другими повреждающими факторами для клетки, которые возникают в процессе нормального обмена веществ, являются свободные радикалы. Они отличаются от обычных молекул тем, что у них на внешней электронной оболочке имеется неспаренный (одионочный) электрон за счет добавления или удаления электрона из электронной пары. Это обычно происходит в ходе реакций одноэлектронного окисления или восстановления при участии свободнорадикальных форм кислорода. Обычно реакции свободнорадикального окисления протекают

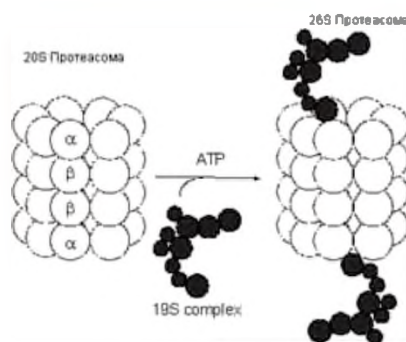


Рис. 60. Структура и сборка 26S-протеасомы

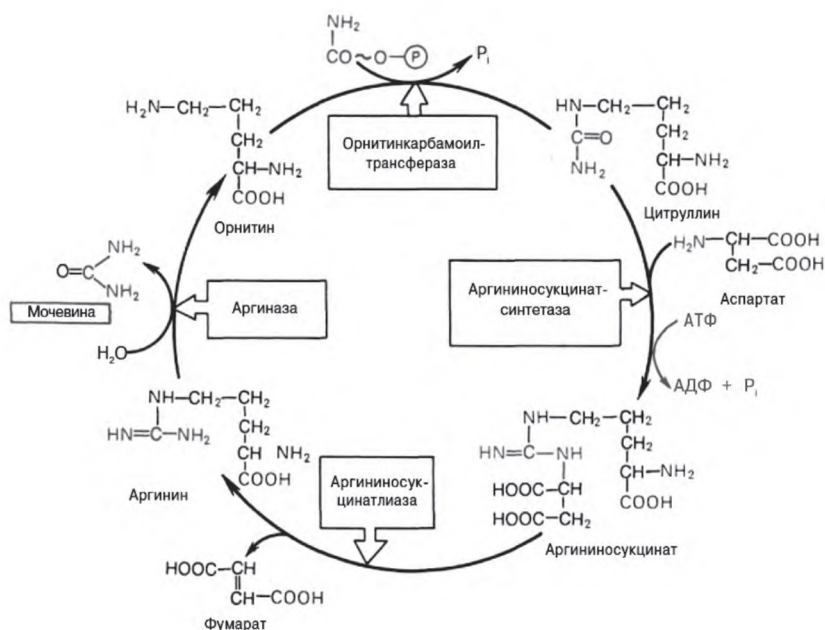


Рис. 61. Орнитиновый цикл синтеза мочевины

[по: Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998].

в активном центре соответствующих ферментов, а промежуточные продукты не появляются во внешней среде. Свободные радикалы — жизненно важные и необходимые для клетки соединения. Их образование осуществляется при участии определенных ферментных систем. Многие из них несут очень важные физиологические функции. Так, семихиноны, коэнзим Q и флавопротеины используются в качестве окислительно-восстановительных систем, служащих посредниками в передаче электрона. Гидроксидрадикал необходим для синтеза ряда биологических регуляторов (например, простагландинов). Радикалы NO участвуют в регуляции сокращения стенок кровеносных сосудов, а пероксинитрит стимулирует запрограммированную клеточную гибель (апоптоз). Свободные радикалы участвуют в формировании клеточного иммунитета. Образование гидроперекисей жирнокислотных цепей повреждает бислой и способствует высвобождению жирных кислот из состава мембранных липидов. Полиненасыщенная арахидоновая кислота является обычной мишенью для свободнорадикальной атаки. Этот процесс может стимулировать ферментативные превращения ее по одному из двух путей — липоксигеназному или циклооксигеназному. В результате в клетке образуются важные биологические регуляторы: простагландины, лейкотриены, тромбоксаны.

Однако при изменении условий функционирования дыхательной цепи, при воздействиях ионизирующего излучения, ультрафиолетового облучения,

попавших в организм посторонних соединений, ксенобиотиков, при взаимодействии кислорода с ионами металлов и т.д. в организме образуются весьма активные молекулярные соединения: перекись водорода, гипохлорит и гидроперекиси липидов. Они являются сильными окислителями, способными модифицировать белки, нуклеиновые кислоты, индуцировать ПОЛ и в результате цепных реакций приводить к множественным нарушениям мембран и к гибели клеток. Именно эти процессы приводят к развитию патологических состояний и лежат в основе канцерогенеза, атеросклероза, хронических воспалений и нервных дегенеративных болезней.

Для защиты от повреждающего действия радикалов в организме функционируют антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидазы) и низкомолекулярные антиоксиданты (витамин С, глутатион, мочевиная кислота и др.). Кроме этого, антиоксидантными свойствами обладают полифенолы (например, аналоги некоторых компонентов красного вина). Это своеобразные ловушки, или перехватчики свободных радикалов.

Роль ферментов в системе внутриклеточного обмена

Все внутриклеточные реакции органических веществ, процессы анаболизма и катаболизма тесно интегрированы в систему метаболизма. Регуляторные особенности метаболической системы проявляются в ее способности координировано изменять значения субстратных потоков и концентрацию интермедиатов в изменяющихся условиях так, чтобы в клетке поддерживалось стационарное состояние ключевых метаболитов и основных физиологических характеристик.

К наиболее информативным показателям внутриклеточного метаболизма относятся оксидоредуктазы. Это связано с тем, что основными переносчиками электронов в клетке являются пиридиновые нуклеотиды, а отсюда — активное участие оксидоредуктаз в биоэнергетических процессах. Кроме того, оксидоредуктазы, участвуя в направленной координации сопряженных метаболических потоков, в значительной степени обуславливают адаптивные изменения внутриклеточного обмена веществ.

К классу оксидоредуктаз относят ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Подклассы оксидоредуктаз определяются типами соединений, которые выступают в качестве доноров электронов. Так, оксидоредуктазы катализируют окисление гидроксигрупп (подкласс 1), карбонильных групп (подкласс 2) и т.д. В рамках подклассов оксидоредуктаз выделяют подподклассы, которые характеризуются типами соединений, определяемых в качестве акцепторов электронов. Например, к подподклассу 1 относят ферменты, катализирующие реакции окисления-восстановления с участием никотинамиддинуклеотида (НАД) или близкого аналога, у которого 2'-гидроксигруппа аденинлатного фрагмента фосфорилирована — никотинамиддинуклеотидфосфат (НАДФ) (рис. 62). Данный подподкласс оксидоредуктаз называется дегидрогеназами.

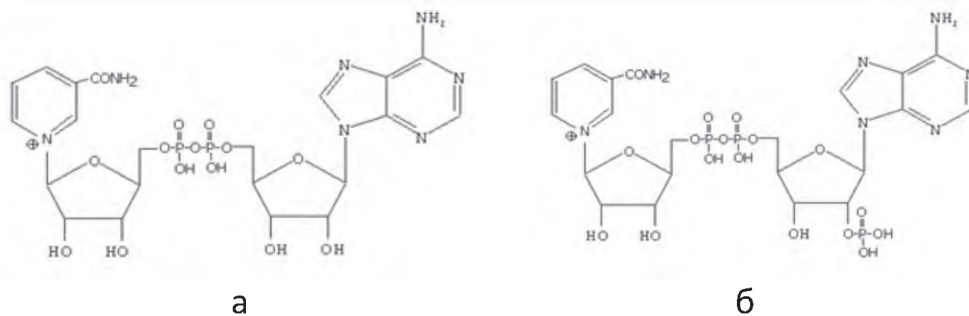


Рис. 62. Структура никотинамиддинуклеотида (а) и никотинамиддинуклеотидфосфата (б)

Восстановленные дегидрогеназами никотинамидные коферменты отличаются от окисленных форм по производной никотиновой кислоты (рис. 63).

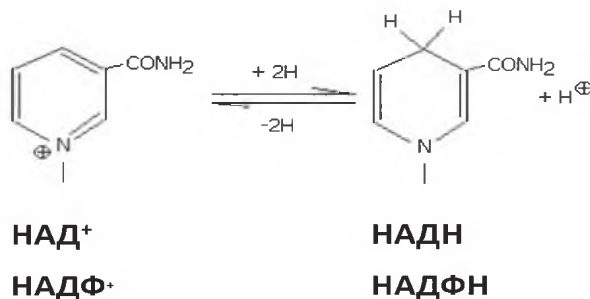


Рис. 63. Восстановление никотинамиддинуклеотида и никотинамиддинуклеотидфосфата

Дегидрогеназами также называют ферменты, которые в своих реакциях используют флавиновые кофакторы: флавинадениндинуклеотид (ФАД) и флавиномононуклеотид (ФМН) (рис. 64). При этом некоторыми авторами выделяется следующая закономерность: если биологически значимо окисление органического субстрата, то в реакции чаще всего участвует НАД^+ , если же реакция этого подподкласса имеет значение для восстановления какого-либо органического соединения, то чаще всего восстановитель — НАДФН .

Биохимические реакции в клетке организованы в систему метаболических процессов. Причем метаболические процессы представляют собой как циклы, в которых процесс начинается с участием интермедиата, регенерируемого в последней реакции цикла, так и цепи, не приводящие к образованию какого-либо исходного компонента.

Интеграция путей и циклов в систему метаболизма определяется:

1) наличием общих промежуточных интермедиатов в большей части метаболических путей;

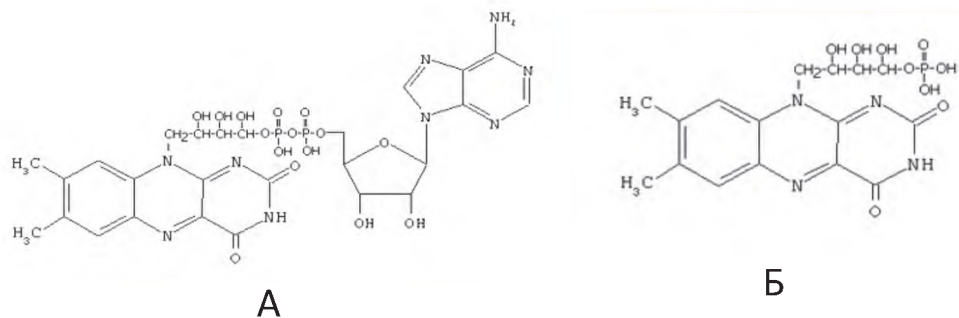


Рис. 64. Структура флавинадениндинуклеотида (А) и флавинмоноклеотида (Б)

- 2) возможностью взаимопревращений через общие метаболиты;
- 3) использованием общих коферментов и необходимостью их постоянной циркуляции;
- 4) наличием общего пути катаболизма и единой системы освобождения и использования энергии (дыхательная цепь);
- 5) наличием сходных механизмов регуляции.

В клетках контроль за этапами метаболизма осуществляется путем разделения метаболических процессов по отдельным компартментам. На рисунке (рис. 65) представлена схема компартментализации внутриклеточных метаболических процессов, наиболее общие закономерности которой можно представить следующим образом:

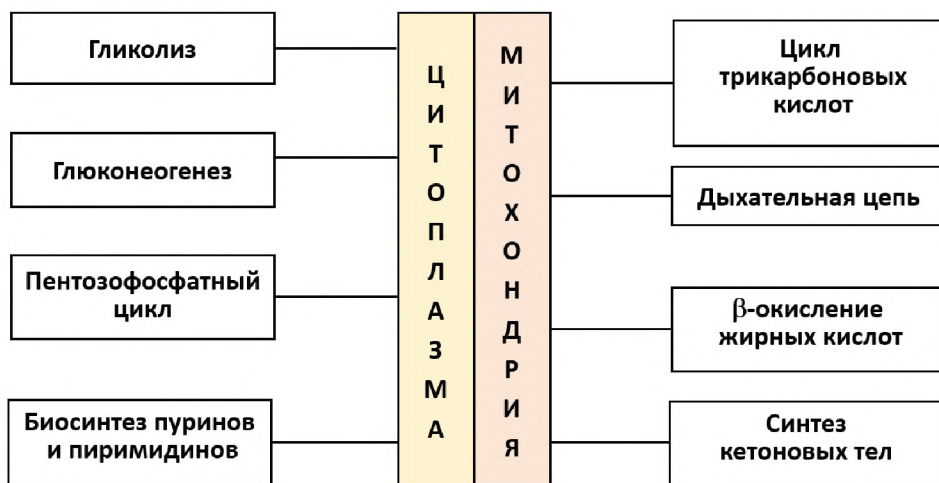


Рис. 65. Компартментализация основных внутриклеточных процессов

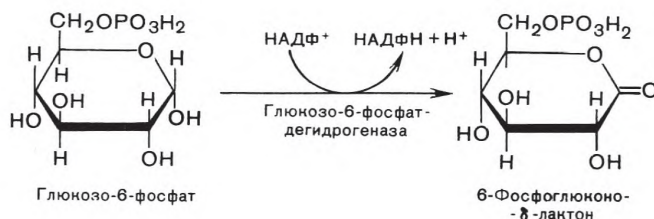
Метаболические взаимопревращения и биологический синтез преимущественно осуществляются в цитоплазме. НАДФН, необходимый для реакций восстановления, образуется также в цитоплазме в пентозофосфатном цикле.

Окислительные реакции, связанные с дыханием, протекают в митохондриях. В качестве коферментов обычно используются НАД⁺ и флавопротеины.

Кроме того, в настоящее время констатируется, что ферменты, функционально объединенные в едином метаболическом пути, способны образовывать упорядоченные мультиферментные ансамбли, называемые метаболонами. Характерными чертами метаболонов являются их тесная ассоциация с субклеточными структурами, а также высокая степень лабильности, что препятствует их обнаружению и выделению. Биохимическая значимость метаболона определяется в повышении общей скорости метаболического процесса в связи с уменьшением времени диффузии метаболических интермедиатов к активным центрам ферментов, в компартиментализации процесса, препятствующей нежелательному вовлечению субстратов в другие метаболические пути или циклы, а также в возможности управления метаболическим процессом как единым целым.

Однако ключевую роль в регуляции интенсивности субстратных потоков по метаболическим путям и циклам определяют именно ферменты. В связи с этим мы рассмотрим химизм ферментативных реакций и метаболическое значение ряда оксидоредуктаз, активность которых исследуется нами в лимфоцитах крови.

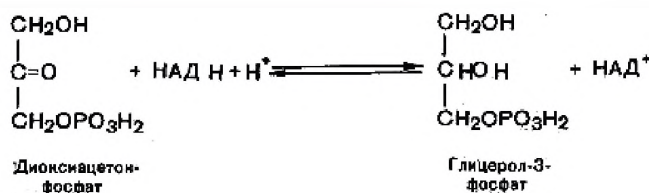
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа [(Г6ФДГ), КФ 1.1.1.49] осуществляет дегидрирование глюкозо-6-фосфата и кофермента НАДФ. Образовавшийся в ходе данной реакции 6-фосфоглюконо-δ-лактон является нестабильным и гидролизуется либо спонтанно, либо с помощью фермента 6-фосфоглюконолактоназы с образованием 6-фосфоглюконата.



Г6ФДГ катализирует инициализирующую и ключевую реакцию пентозофосфатного цикла. В норме доля пентозофосфатного цикла в количественном превращении глюкозы обычно невелика и варьирует в зависимости от типа ткани и функционального состояния клеток. У человека активность пентозофосфатного цикла относительно высока в печени, надпочечниках, эмбриональной ткани, активированных иммунокомпетентных клетках и молочной железе в период лактации. Пентозофосфатный цикл имеет важное значение для системы внутриклеточного метаболизма. Он поставляет восстановленные НАДФН для

реакций биосинтеза жирных кислот, холестерина и др. За счет пентозофосфатного цикла приблизительно на 50% покрывается потребность клеток в НАДФН. Кроме того, продуктами пентозофосфатного цикла являются также различные пентозофосфаты, которые необходимы для реакций синтеза нуклеиновых кислот и ряда коферментов.

Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа [(ГЗФДГ), КФ 1.1.1.8] — НАД-зависимая оксидоредуктаза, осуществляющая обратимое окисление глицеро-3-фосфата в диоксиацетонфосфат.



Фермент занимает центральное положение в реакциях липидного обмена. В реакциях синтеза липидов ГЗФДГ осуществляет образование глицеро-3-фосфата из диоксиацетонфосфата, в то время как последний генерируется в реакциях гликолиза и глюконеогенеза. В то же время образовавшийся в реакциях липидного катаболизма глицерол-3-фосфат переводится на реакции анаэробного окисления глюкозы с помощью ГЗФДГ. На примере некоторых тканей доказана возможность образования комплекса ГЗФДГ с альдолазой. Причем установлено, что альдолаза связывается только с активным димером дегидрогеназы, увеличивая при этом активность фермента.

Синтезированный в цитоплазме НАДН не способен сам проникать через митохондриальную мембрану. Однако электроны НАДН способны включаться в дыхательную цепь с помощью α -глицерофосфатного водородного шунта (рис. 66). Цитоплазматический НАДН сначала реагирует с диоксиацетонфосфатом, образуя глицерол-3-фосфат. Реакция катализируется НАД-зависимой цитоплазматической ГЗФДГ. Образовавшийся глицерол-3-фосфат легко проникает через митохондриальную мембрану. Внутри митохондрии другая (митохондриальная ФАД-зависимая) ГЗФДГ

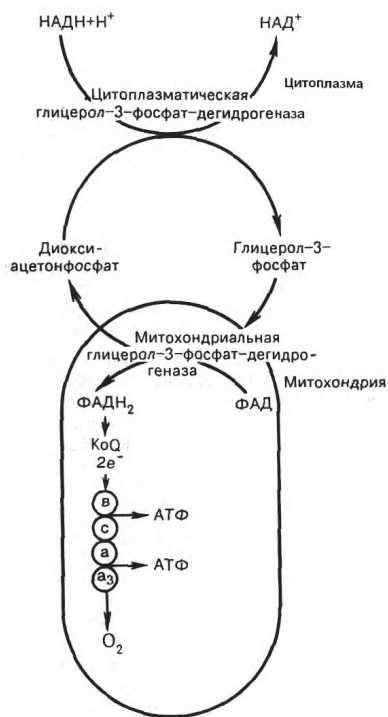


Рис. 66. Механизм α -глицерофосфатного водородного шунта

окисляет глицеро-3-фосфат до диоксиацетонфосфата. ФАДН₂ вводит приобретенные им электроны на уровне коэнзима Q в систему дыхательной цепи, а диоксиацетонфосфат выходит из митохондрий в цитоплазму, где снова взаимодействует с НАД-зависимой ГЗФДГ. Наибольшая значимость системы α-глицеро фосфатного шунта выявляется в метаболизме скелетных мышц и клетках мозга.

Лактатдегидрогеназа [ЛДГ), КФ 1.1.1.27] — фермент гликолитического цикла, обратимо катализирующий окисление лактата в пировиноградную кислоту с участием в качестве кофермента НАД. В варьирующих количествах ЛДГ содержится во всех органах и тканях организма; наибольшая ее активность отмечается в гладкой и поперечнополосатой мускулатуре, печени, почках и форменных элементах крови. Установлено существование 5 изоферментов ЛДГ, различающихся по сочетанию составляющих ее полипептидных цепей; для разделения изоферментов обычно пользуются электрофорезом на ацетатцеллюлозных пленках. Каждый изофермент представляет собой тетрамер, состоящий из субъединиц двух типов. За их синтез отвечают разные гены, уровень активности которых различен в разных тканях. Именно за счет изоферментного спектра и осуществляется контроль за интенсивностью субстратного потока по гликолизу. В тканях с аэробным метаболизмом преобладают изоферменты ЛДГ, которые чувствительны к пирувату. Данные изоферменты ЛДГ ингибируются даже небольшим количеством пирувата, что препятствует образованию лактата и приводит к более полному окислению пирувата через образование ацетил-КоА в цикле трикарбоновых кислот. В тканях с преимущественно анаэробным дыханием выявляется изоферментный спектр ЛДГ, который не ингибируется пируватом (во всяком случае, в низких концентрациях).



ЛДГ занимает ключевое положение в регуляции цитоплазматического уровня НАДН/НАД. В случае избытка НАДН в цитоплазме ЛДГ восстанавливает пируват до лактата, который затем удаляется из клетки (анаэробная реакция ЛДГ). В то же время при активации аэробных процессов ЛДГ может окислять лактат до пирувата с образованием НАДН (аэробная реакция ЛДГ). В этом случае пируват, образовавшийся при окислении лактата, в основном через пируватдегидрогеназный комплекс поступает на реакции цикла трикарбоновых кислот (митохондриальный компартмент).

Малатдегидрогеназа [(МДГ), КФ 1.1.1.37] — фермент, катализирующий обратимое окисление малата в оксалоацетат. Фермент локализуется как в митохондриях (цикл трикарбоновых кислот), так и в цитоплазме. В митохондриях уровень соотношения НАДН/НАД относительно велик, в результате чего внутримитохондриальным оксалоацетат легко восстанавливается в малат, который легко выходит из митохондрий. В цитоплазме уровень отношения НАДН/НАД мал, что приводит к окислению малата при участии цитоплазматической НАД-зависимой МДГ.



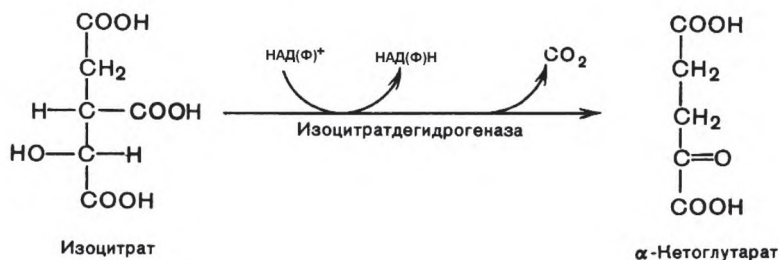
МДГ принимает участие в реакциях азотного обмена. Одним из ключевых интермедиатов азотного обмена является аспартат, который синтезируется в результате трех сопряженных реакций. В ходе первой реакции фумарат под действием фумаразы присоединяет воду и превращается в малат. Во второй реакции малат под действием МДГ окисляется до оксалоацетата, который в третьей реакции — трансаминирования с глутаматом — преобразуется в аспартат. Кроме того, МДГ принимает самое активное участие в работе малат-аспартатного водородного шунта митохондрий (рис. 67).



Рис. 67. Схема малат-аспартатного водородного шунта митохондрий

Данная система функционирует благодаря наличию МДГ и аспаратами-нотрансферазы как в цитоплазме, так и в митохондриях. Водородный шунт работает следующим образом. Сначала водород от синтезированного в цитоплазме НАДН переносится на цитоплазматический оксалоацетат. В результате образуется малат, который с помощью системы, транспортирующей дикарбоновые кислоты, проходит через внутреннюю мембрану митохондрий в матрикс. В матриксе митохондрий с помощью МДГ малат окисляется в оксалоацетат, а матриксный НАД⁺ восстанавливается до НАДН, который может передавать свои электроны в дыхательную цепь, локализованную на внутренней мембране митохондрий. В свою очередь, образовавшийся оксалоацетат в присутствии глутамата и аспаратами-нотрансферазы вступает в реакцию трансаминирования. Образовавшиеся в результате данной реакции α -кетоглутарат и аспарат с помощью специальных транспортных систем способны проходить через мембрану митохондрий.

В митохондриях существуют два типа изоцитратдегидрогеназ. **НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа** [(НАДИЦДГ), КФ 1.1.1.41] выявляется только в митохондриальном компартменте, в то время как **НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа** [(НАДФИЦДГ), КФ 1.1.1.42] выявляется как в митохондриях, так и в цитоплазме. НАДИЦДГ осуществляет третью реакцию в цикле трикарбоновых кислот, которая, по-видимому, является лимитирующей. В ходе изоцитратдегидрогеназной реакции также осуществляется декарбоксилирование изолимонной кислоты.



Специфическим активатором НАДИЦДГ является АДФ, ингибиторами фермента — АТФ и НАДН. Кроме того, изоцитратдегидрогеназе для осуществления ферментативной активности необходимы ионы магния и марганца.

Одним из наиболее важных ферментов цикла трикарбоновых кислот является **сукцинатдегидрогеназа** [(СДГ), КФ 1.3.99.1], активность которой оказывает существенное влияние на интенсивность субстратного потока по лимонному циклу. СДГ катализирует шестую реакцию цикла Кребса, в которой сукцинат дегидрируется в фумаровую кислоту. Кофактором СДГ является ФАД, ковалентно связанный с молекулой фермента. При этом сама СДГ прочно связана с

внутренней мембраной митохондрий. Восстановленный ФАДН₂ передает электроны непосредственно на дыхательную цепь через КоQ. Установлено, что аллостерическим ингибитором СДГ является оксалоацетат.



Глутаматдегидрогеназа осуществляет окислительное дезаминирование L-глутаминовой кислоты. В качестве кофермента глутаматдегидрогеназа использует НАД [(НАДГДГ), КФ 1.4.1.2] или НАДФ [(НАДФГДГ), КФ 1.4.1.4]. Реакция включает анаэробную фазу дегидрирования глутаминовой кислоты с образованием промежуточного продукта — иминоглутаровой кислоты, после чего осуществляется спонтанный гидролиз с образованием аммиака и α-кетоглутаровой кислоты (рис. 68).

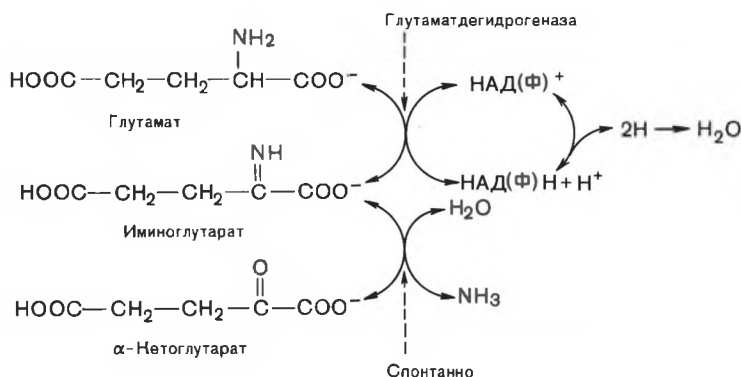


Рис. 68. Ферментативная реакция глутаматдегидрогеназы

Ферментативные реакции глутаматдегидрогеназ являются обратимыми, соответственно, аммиак в присутствии НАД(Ф)Н и α-кетоглутаровой кислоты может участвовать в синтезе глутамата. Глутаматдегидрогеназа представляет собой один из наиболее изученных ферментов азотистого метаболизма. Глутаматдегидрогеназа является олигомерным ферментом с молекулярной массой 312000, который состоит из 6 субъединиц. Фермент проявляет свою активность только в мультимерной форме. При диссоциации глутаматдегидрогеназы на субъединицы, которая происходит в присутствии НАДН, ГТФ и ряда стероидных гормонов, фермент теряет способность осуществлять окислительное

дезаминирование глутаминовой кислоты, но приобретает способность осуществлять дезаминирование ряда других аминокислот. Подобная особенность характеризует аллостерический механизм регуляции глутаматдегидрогеназы и определяет данный фермент как регуляторный в системе аминокислотного обмена.

Таким образом, НАД(Ф)- и ФАД-зависимые дегидрогеназы находятся на ключевых позициях внутриклеточного метаболизма. Представленные дегидрогеназы локализируются в различных компартментах клетки и вовлечены в функционирование разных метаболонов. Их активность определяет как ряд основных пластических процессов (синтез аминокислот, нуклеотидов, липидов и т.д.), так и аэробные и анаэробные дыхательные реакции.

Глава 6. МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ



Иммунология как наука значительно продвинулась за последние 30 лет. Заметные достижения включают открытие совершенно новых систем иммунных рецепторов (в первую очередь рецепторов распознавания образов – PRR), описание многих цитокинов и типов иммунных клеток, а также более глубокое понимание развития и молекулярной регуляции функциональной активности клеток иммунной системы. Разрабатываются все более информативные инструменты, которые облегчают изучение иммунной системы при различных состояниях, в том числе на моделях инфекции, аутоиммунитета и аутовоспаления. Появились новые инструменты (включая низкомолекулярные агонисты или антагонисты) и подходы (в частности, методы измерения активности метаболических процессов) для изучения иммунной системы, что позволяет развивать новые направления исследований, которые характеризуют самые начальные механизмы развития иммунного ответа. В самом центре иммунометаболического направления лежат исследования, включающие в себя сложные и специфические метаболические изменения, которые напрямую связаны с теми аспектами иммунитета и защиты организма, которые позволяют установить механизмы молекулярной регуляции событий, происходящих в иммунных клетках в норме и при болезни (Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012; O'Neill L.A. et al., 2016). На сегодняшний день уже имеется широкий спектр низкомолекулярных соединений, которые через регуляцию метаболических процессов клеток иммунной системы способны регулировать направленность иммунного ответа (табл. 30).

Активность внутриклеточных метаболических путей регулируется за счет сигналов, которые клетки иммунной системы получают из внешней среды, а также за счет тех, которые формируются во внутренней системе клеток. В результате восприятия этих сигналов формируются метаболические механизмы, которые регулируют выработку ключевых интермедиатов, влияющих на рост и выживание клеток. В рамках развития иммунного ответа специфические (исходя из направленности иммунной реакции) изменения в метаболических путях будут определять эффективность функциональной активности клеток иммунной системы, включая миграцию, дифференцировку, пролиферацию, фагоцитоз/киллинг, продукцию различных наборов цитокинов и т.д. На рис. 69 показано, как регуляторные и функциональные молекулы, такие как интерлейкин-4 (IL-4) или PRR, могут способствовать формированию активности субстратных потоков по различным метаболическим путям в клетках, включая те процессы, которые регулируются уровнями поступления кислорода (O'Neill L.A. et al., 2016).

Таблица 30

Некоторые низкомолекулярные соединения, влияющие на активность метаболических процессов в клетках иммунной системы

Наименование	Мишень	Результат воздействия
2-Дезоксиглюкоза	Гексокиназа	Ингибирование гликолиза
3-бромпируват	Гексокиназа	
Ритонавир	Транспортер глюкозы 1	
Дихлорацетат	Киназа пируватдегидрогеназы	
α -Циано-4-гидроксициннат	Транспортеры монокарбоксилатов	
Диарилсульфонамид	Пируваткиназа M2	Ингибирование HIF1 α
Этомоксир	Карнитинпальмитоил-трансфераза I	Ингибирование окисления жирных кислот
5-Аминоимдазол-4-карбоксамид рибонуклеотид	АМФ-киназа	Активация окисления жирных кислот
Метформин	АМФ-киназа	Активация окисления жирных кислот; ингибирование Комплекса I; снижение синтеза митохондриальных АФК
Церуленин	Синтаза жирных кислот	Ингибирование синтеза жирных кислот
Ротенон	Комплекс I	Ингибирование дыхательной цепи
Бис-2-(5-фенилацетамидо-1,3,4-тиадиазол-2-ил)этилсульфид	Глутаминаза	Ингибирование глутаминолиза
Олигомицин	АТФ-синтаза	Ингибирование дыхательной цепи
Жирная кислота таллового масла	Ацетил-КоА-карбоксилаза	Ингибирование синтеза жирных кислот
UK5099	Транспортер пирувата	Ингибирование субстратного потока по ЦКТ

UK5099 (PF-1005023) является мощным ингибитором митохондриального переносчика пирувата, ингибируя транспорт пирувата через плазматическую мембрану.

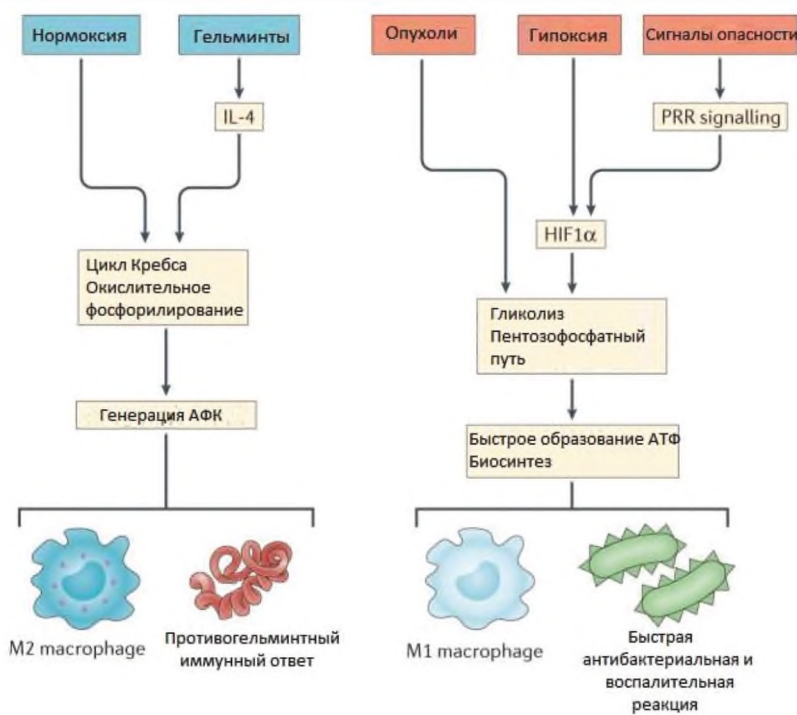


Рис. 69. Пример метаболического перепрограммирования макрофагов

[по: O'Neill L.A. et al., 2016].

Уровень кислорода и снабжение необходимыми субстратами являются ключевыми факторами для функционирования метаболических процессов. Нормоксия поддерживает активность ЦКТ и окислительного фосфорилирования, тогда как гипоксия приводит к активации синтеза индуцируемого гипоксией фактора 1α (HIF1α) и экспрессии гликолитических ферментов. Иммунные стимулы также могут вызывать метаболическое перепрограммирование в клетках. Например, стимуляция клеток IL-4 может стимулировать окислительное фосфорилирование, тогда как активация клеток через PRR, такие как TLR4, индуцирует экспрессию HIF1α, активирующую гликолиз. Гликолиз также преобладает в опухолях при нормоксии в форме аэробного гликолиза, что дает опухолям преимущество роста в тканях, насыщенных кислородом.

Все клетки иммунной системы независимо от реализуемых функций используют несколько различных метаболических путей для создания достаточных уровней запасов энергии, поддерживающих производство многочисленных промежуточных продуктов биосинтеза (интермедиатов), обеспечивающих клеточный рост, пролиферацию и функциональную активность. Эти метаболические пути, хотя и различаются с точки зрения их конечных продуктов, тесно связаны между собой вследствие общих входов субстрата и зависимости от продуктов одного процесса для питания альтернативных путей в качестве ключевых синтетических предшественников (Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012; O'Neill L.A. et al., 2016). Одним из примеров сложного взаимодействия метаболических путей является процесс синтеза жирных кислот, значимость которого

определяется созданием и восстановлением клеточных мембран и других ключевых структур на основе липидов, необходимых при клеточной пролиферации. Доказано, что активность синтеза жирных кислот зависит от наличия промежуточных продуктов гликолитического пути и ЦТК.

Исходя из взаимосвязанного характера внутриклеточных метаболических путей, можно выделить шесть ключевых метаболических процессов, которые играют наиболее важную роль в образовании ключевых интермедиатов, способствующих выживанию, росту клеток и реализации ими своей функциональной активности: гликолиз, ЦТК, пентозофосфатный цикл, реакции окисления жирных кислот, процесс синтеза жирных кислот и реакции аминокислотного обмена (Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012; Stathopoulou C. et al., 2019). Эти метаболические процессы имеют уникальное значение для клеточного метаболизма в целом и регулируются сложным комплексом сигнальных молекул для взаимосвязи их активности с клеточными потребностями (рис. 70).

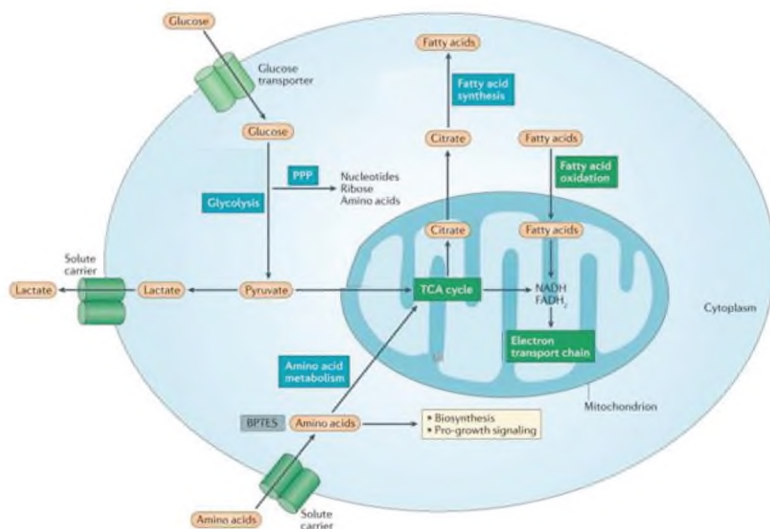


Рис. 70. Взаимосвязь основных метаболических процессов в клетках иммунной системы [по: O'Neill L.A. et al., 2016].

Гликолиз превращает глюкозу в пируват, который затем может либо превращаться в лактат и уходить из клетки, либо может войти в ЦТК, в котором он будет генерировать НАДН и ФАДН₂ для дыхательной цепи переноса электронов, что и приводит к производству АТФ. Гликолиз также обеспечивает субстратом пентозофосфатный путь, продуктом которого является рибоза для синтеза нуклеотидов, аминокислот и НАДФН. НАДФН используется для синтеза жирных кислот, в котором используется цитрат, выведенный из ЦТК. Жирные кислоты также могут окисляться с образованием НАДН и ФАДН₂, которые снова стимулируют выработку АТФ в дыхательной цепи митохондрий. И, наконец, метаболизм аминокислот может стимулировать субстратами ЦТК, а также важен для роста клеток и биосинтеза белка. Пути, требующие наличия кислорода, обозначены зелеными прямоугольниками; пути, не зависящие от кислорода, обозначены синими прямоугольниками.

Значение гликолиза для клеток иммунной системы

Как уже было отмечено выше, изменения в активности метаболических процессах напрямую влияют на функциональную активность клеток иммунной системы (Куртасова Л.М. с соавт., 2002, 2006; Савченко А.А. с соавт., 1996, 2020; O'Neill L.A. et al., 2016). Доказано, что гликолиз участвует в регуляции ряда иммунных процессов (рис. 71).

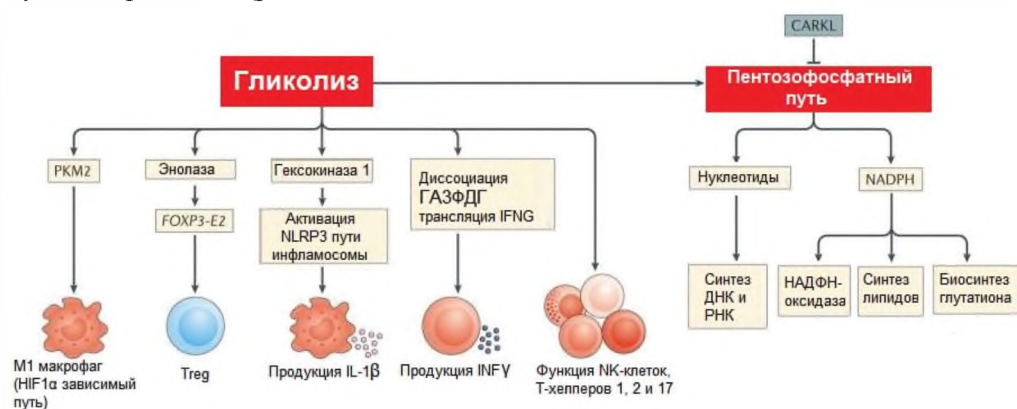


Рис. 71. Значение гликолиза и пентозофосфатного цикла для клеток иммунной системы [по: O'Neill L.A. et al., 2016].

Гликолиз активируется в M1 макрофагах в ответ на активацию NIF1α. NIF1α не только способствует гликолизу, но также индуцирует экспрессию генов, кодирующих воспалительные цитокины, особенно IL-1β. Гексокиназа 1 напрямую взаимодействует с инфламмасомой NLRP3 и активирует ее, что приводит к активации каспазы 1 и процессингу про-IL-1β. В Т-клетках глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАЗФДГ) связывается с мРНК, кодирующей IFNγ, и подавляет его трансляцию. Переключение на гликолиз, которое происходит в ответ на активацию Т-клеток, приводит к диссоциации ГАЗФДГ, что делает возможной трансляцию IFNγ. Гликолиз также имеет решающее значение для функционирования NK-клеток, Т-хелперов 1, 2 и 17 типов и периферически индуцированных регуляторных Т-клеток (Treg). Пентозофосфатный путь ответвляется от гликолиза и генерирует рибозу для синтеза нуклеотидов ДНК и РНК, а также НАДФН и биосинтеза глутатиона, способствуя формированию антиоксидантного потенциала. В Treg человека гликолитический фермент эналаза способствует их супрессивным функциям, регулируя экспрессию вариантов сплайсинга FOXP3, содержащих экзон 2 (FOXP3-E2). CARKL – белок, подобный углеводной киназы; PKM2 – изофермент пируваткиназы M2.

Ранние исследования показали, что как активированные макрофаги, так и Т-лимфоциты активно поглощают глюкозу (Alonso D., Nungester W.J., 1956; Newsholme P. et al., 1986). Кроме того, было показано, что 2-дезоксиглюкоза ингибирует активацию макрофагов *in vitro* и подавляет воспалительные реакции в ряде экспериментальных моделях *in vivo* (Hamilton J.A. et al., 1986; Michl J. et al., 1976). Уже эти и другие исследования указывали на то, что гликолиз имеет решающее значение для функционирования клеток иммунной системы. Первоначально это было несколько неожиданно, поскольку гликолиз не является самым

эффективным способ получения АТФ. В процессе анаэробного гликолиза генерируется 2 молекулы АТФ из 1 молекулы глюкозы, тогда как окислительное фосфорилирование является более эффективным, генерируя 36 молекул АТФ из одной молекулы глюкозы (Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012). Однако также было установлено, что гликолиз можно быстро активировать посредством индукции синтеза ферментов. Напротив, усиление окислительного фосфорилирования требует митохондриального биогенеза, который является более сложным и, вероятно, более медленным процессом.

Таким образом, клетки, которым необходимо быстро производить АТФ, переключаются именно на гликолиз. При этом очень важным (по сравнению с энергетической значимостью) также является способность гликолиза обеспечивать формирование промежуточных продуктов биосинтеза для поддержки пролиферативной активности клеток. Активирующие сигналы, такие как факторы роста, сильно способствуют повышенному поглощению глюкозы и, соответственно, активации гликолиза, который поставяет АТФ, поддерживает субстратами ЦТК и предоставляет промежуточные продукты для пентозофосфатного цикла, реакций гликозилирования и синтеза ключевых компонентов метаболизма, включая серин, глицин, аланин и ацетил-КоА для синтеза липидов.

Установлено, что интенсивность субстратного потока по гликолизу значительно увеличивается в активированных макрофагах, НК-клетках, эффекторных Т-лимфоцитах и в В-клетках (Donnelly R.P. et al., 2014; Doughty C.A. et al., 2006; Krawczyk S.M. et al., 2010; Michalek R.D. et al., 2011). Все субпопуляции эффекторных Т-клеток показали увеличение интенсивности гликолиза после активации и, в первую очередь, это были Th1- и Th2-клетки, Th17-лимфоциты и активированные цитотоксические Т-клетки (Gubser P.M. et al., 2013; Michalek R.D. et al., 2011; Shi L.Z. et al., 2011). Предполагается, что повышенная активность пути mTOR, коррелирующая с усилением интенсивности гликолиза связана с начальной генерацией периферически индуцированных Tregs, но может отрицательно влиять на их долговременное выживание и стабильное функционирование (Wei J. et al., 2016). Таким образом, повышенный уровень гликолиз можно считать характерным метаболическим изменением в большинстве клеток иммунной системы, подвергающихся быстрой активации, например, в ответ на стимуляцию PRR, цитокиновых рецепторов или антигенных рецепторов. Активированный гликолиз позволяет клеткам генерировать достаточное количество АТФ и промежуточных продуктов биосинтеза для выполнения своих конкретных эффекторных функций. Для макрофагов это включает фагоцитоз и продукцию воспалительных цитокинов, для ДК – презентацию антигена, для Т-лимфоцитов – реализую цитотоксической активности и продукцию эффекторных цитокинов.

Имеются данные о сигнальных путях, запускающих гликолиз во время активации клеток иммунной системы. Например, липополисахариды стимулируют

синтез HIF1 α и ряда факторов транскрипции, которые имеют решающее значение для индукции гликолитических ферментов (Shi L.Z. et al., 2011). Этот механизм также связан с активацией NF- κ B за счет изоформы uPFK2 фосфофруктокиназы-2, которая является регулирующим ферментом гликолиза. Липополисахариды могут также быстро индуцировать интенсивность гликолиза в дендритных клетках посредством активации TANK-связывающей киназы 1и/или ингибитора NF- κ B киназы ϵ и гексокиназы 2 HIF1 α -независимым образом (O'Neill L.A. et al., 2016).

Ключевым механизмом усиленного гликолиза в LPS-активированных макрофагах является индукция изофермента пируваткиназы M2 (PKM2). PKM2 представляет собой фермент, генерирующий пируват и АТФ из фосфоенолпирувата и АДФ во время гликолиза и регулируется при низкой интенсивности гликолитического потока, что позволяет направить промежуточные продукты гликолиза на пути биосинтеза (O'Neill L.A. et al., 2016). PKM2 также выполняет отдельную функцию, не связанную с его ролью в гликолизе. Данный фермент перемещается в ядро, где взаимодействует с HIF1 α и способствует экспрессии HIF1 α -зависимых генов, включая те, которые кодируют вышеупомянутые гликолитические ферменты, а также провоспалительные факторы, такие как IL-1 β (Wang Y. et al., 2023). Также представляет интерес наблюдение, что небольшая молекула, переводящая PKM2 в тетрамерное состояние (в котором фермент не может проникнуть в ядро и становится более активным в гликолизе, чем димерная PKM2), перепрограммирует макрофаги, чтобы они стали более M2-подобными по профилю экспрессии ряда рецепторов и функции (Palsson-McDermott E.M. et al., 2015). Это указывает на то, что ингибирование HIF1 α (что произойдет в этой ситуации, поскольку PKM2 больше не является ядерной) изменит фенотип макрофага с провоспалительного фенотипа M1 на фенотип M2. Провоспалительная роль PKM2 в воспалительных моноцитах и макрофагах также была продемонстрирована при атеросклеротической болезни коронарных артерий человека, что дополнительно подчеркивает вклад этого гликолитического фермента в воспаление (Shirai T. et al., 2016).

Сходная роль гликолиза в репрограммировании клеток иммунной системы была обнаружена в Th17-клетках, в которых ингибирование гликолиза с помощью 2-деоксиглюкозы превращало Th17-клетки в Tregs (Shi L.Z. et al., 2011). Напротив, гиперактивация передачи сигналов через mTOR приводит к усилению гликолиза в периферических Tregs, но может нарушать их выживание и клональную приверженность (Wei J. et al., 2016). Данное наблюдение подчеркивает связь между метаболизмом и фенотипом клеток иммунной системы, при этом гликолиз и индукция HIF1 α вызывают формирование более провоспалительного фенотипа клеток. При этом показано, что окислительное фосфорилирование было связано с более противовоспалительным клеточным фенотипом, хотя и

установлено, что в Tregs также активирован гликолиз (De Rosa V. et al., 2015). В данной работе продемонстрировано, что гликолитический фермент енолаза фактически способствует сплайсингу Foxp3 и, соответственно, генерации Tregs.

Другим интересным аспектом индукции гликолиза в активированных клетках иммунной системы является роль гликолитического фермента ГАЗФДГ. Установлено, что в Th1-клетках ГАЗФДГ связывается с мРНК, которая кодирует IFN γ , репрессируя его трансляцию (Chang C.H. et al., 2013). Однако после активации субстратного потока по анаэробному гликолизу ГАЗФДГ диссоциирует от мРНК IFN γ , позволяя ей транслироваться. Более того, ГАЗФДГ теперь может реализовывать каталитическую активность в гликолизе, чтобы способствовать дальнейшей продукции АТФ. Это открытие подчеркивает еще один аспект того, почему иммунометаболизм так важен для иммунитета – гликолитический фермент ГАЗФДГ контролирует выработку критического цитокина.

В макрофагах и некоторых других клетках иммунной системы гликолитический фермент, гексокиназа 1, проявляет активность как регулятор NLRP3 (цитозольный белок, Nod-подобный рецептор семейства NALP, содержащий пириновый домен) (Ortega M.A. et al., 2023). Воспаление NLRP3 является важным регулятором каспазы 1, которая генерирует IL-1 β и IL-18 и индуцирует тип гибели клеток, называемый пироптозом. Представлены доказательства того, что гексокиназа взаимодействует с NLRP3 на внешней митохондриальной мембране, обеспечивая активацию NLRP3 (Ortega M.A. et al., 2023).

Таким образом, помимо своей роли в синтезе АТФ, гликолиз также способен формировать широкий пул промежуточных продуктов для биосинтеза макромолекул. Наиболее важным примером является глюкозо-6-фосфат, который входит в пентозофосфатный путь, который будет рассматриваться далее.

Значение пентозофосфатного цикла для клеток иммунной системы

Как обсуждалось выше, пентозофосфатный цикл имеет два важных результата, а именно: производство нуклеотидов (которое происходит во время пролиферации клеток) и синтез НАДФН. НАДФН выполняет несколько функций в клетках иммунной системы. Он используется НАДФН-оксидазой для образования активных форм кислорода (АФК) во время респираторного взрыва, но в качестве противовеса он также применяется для образования глутатиона и некоторых других антиоксидантов. Во время инфекции макрофаги и нейтрофилы нуждаются в обеих этих НАДФН-зависимых функциях – быстром производстве АФК для элиминации инфекционного агента с последующей индукцией антиоксидантов для предотвращения чрезмерного повреждения окружающих тканей. ДК также используют НАДФН и синтез липидов для поддержки формирования и восстановления эндоплазматического ретикула, который необходим для активации ДК и секреции цитокинов (Thwe P.M. et al., 2019).

Показано, что пентозофосфатный цикл активирован в липополисахарид-стимулированных макрофагах (Tannahill G.M. et al., 2013). При этом ключевой контрольной точкой метаболизма активированных макрофагов является фермент, подобный углевод-киназе, белок (carbohydrate kinase-like protein –

CARKL), который представляет собой седогептулокиназу. Этот фермент ограничивает поток через пентозофосфатный цикл и сильно экспрессируется в макрофагах M2 (Haschemi A. et al., 2012). Если активность CARKL снижена, макрофаги становятся M1-подобными, что указывает на важность пентозофосфатного цикла для функции макрофагов M1 (рис. 72). Почему генерация нуклеотидов пентозофосфатным путем повышена в макрофагах M1, остается загадкой, поскольку эти клетки демонстрируют низкую

пролиферативную способность. Можно предположить, что нуклеотиды генерируются для производства различных видов РНК (например, микроРНК и длинноцепочечных некодирующих РНК, важных для регуляции клеточных функций).

Поляризация макрофагов

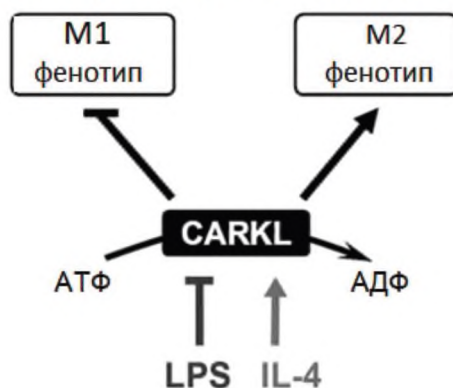


Рис. 72. CARKL-зависимый механизм поляризации M1 и M2 макрофагов [по: Haschemi A. et al., 2012].

Значение цикла Кребса для клеток иммунной системы

Особенности субстратного потока по ЦТК (цикл Кребса) и активность окислительного фосфорилирования широко изучались в клетках иммунной системы. Оба данных процесса полностью функциональны в большинстве субпопуляций Т-лимфоцитов, хотя, как было указано выше, в эффекторных Т-клетках наблюдается сдвиг биоэнергетики в сторону гликолиза. При этом активность ЦТК более выражена в CD8⁺Т-клетках-памяти (O'Sullivan D. et al., 2014).

Особо следует отметить исследования, касающиеся состояния ЦТК в различных подтипах макрофагов (рис. 73). В M2 макрофагах реализуется интактный тип ЦТК, который связан с окислительным фосфорилированием (Jha A.K. et al., 2015). Это позволяет генерировать промежуточные соединения типа уридин 5'-дифосфо-N-ацетилглюкозамина, которые необходимы для гликозилирования M2-ассоциированных рецепторов, таких как, например, маннозный рецептор. Однако в M1 макрофагах ситуация несколько иная. Было показано, что в этих

клетках ЦТК прерывается в двух местах – после цитрата (из-за снижения экспрессии изоцитрат лиаза) и после сукцината. Цитрат, который накапливается в М1 макрофагах, экспортируется из митохондрий через переносчик цитрата. Затем он используется для производства жирных кислот, которые, в свою очередь, участвуют в системе биогенеза мембран. Этот нарушенный ЦТК также наблюдается в активированных ДК и особенно важен для выполнения ими своих функций, так как эти клетки нуждаются в существенной продукции мембран для поддержки презентации антигена (Everts B. et al., 2014).

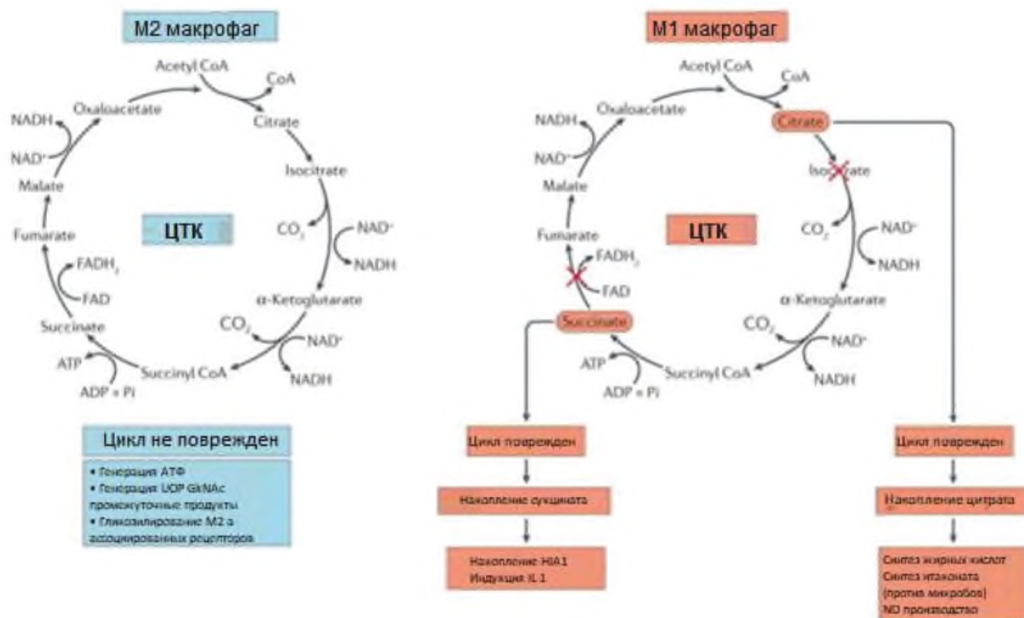


Рис. 73. Особенности ЦТК в М1 и М2 макрофагах

[по: O'Neill L.A. et al., 2016].

В М2 макрофагах (то есть макрофагах, активированных IL-4) ЦТК не поврежден и участвует в окислительном фосфорилировании, обеспечивая образование АТФ. В М1 макрофагах (то есть клетках, активированных липополисахаридом и IFN γ) ЦТК нарушен в двух местах – после цитрата и после сукцината. Цитрат используется для получения жирных кислот для биогенеза мембран, а также для производства простагландинов. Он также принимает участие в синтезе итаконовой кислоты через ферментный иммунный ген 1 (IRG1). Итаконовая кислота обладает прямым антимикробным действием в отношении *Mycobacterium tuberculosis* и *Salmonella sp.*

Избыток цитрата также может стимулировать метаболические процессы, которые генерируют оксид азота и простагландины, являющиеся ключевыми эффекторными молекулами, вырабатываемыми макрофагами (Infantino V. et al., 2011). Третьим метаболитом, образующимся из цитрата, является итаконовая

кислота, которая оказывает прямое бактерицидное действие на ряд микроорганизмов. Этот конкретный пример показывает, что в результате метаболической перестройки могут синтезироваться метаболиты с прямой антимикробной активностью. Сукцинат, накапливающийся в М1 макрофагах в следствие нарушенного ЦКТ, оказывает прямое влияние на продукцию цитокинов макрофагами. Одним из задействованных механизмов, в этом случае, является ингибирование сукцинатом пролилгидроксилазы, что приводит к стабилизации HIF1 α и длительной продукции IL-1 β (Tannahill G.M. et al., 2013). Этот путь будет работать как при нормоксии, так и при гипоксии и, следовательно, является механизмом активации HIF1 α в аэробных условиях. В совокупности эти исследования показывают, что изменения в ЦКТ, происходящие в М1 макрофагах, приводят к митохондриальному накоплению метаболитов, которые могут способствовать их иммунным функциям. Эти события могут также быть связаны с продукцией оксида азота, который инактивирует цепь переноса электронов в макрофагах.

Окисление жирных кислот в клетках иммунной системы

Окисление жирных кислот играет ключевую роль в регуляции адаптивного и врожденного иммунного ответа (рис. 74). В отличие от аэробного гликолиза, который часто наблюдается в провоспалительных и быстро пролиферирующих клетках иммунной системы, зависимыми от активности окисления жирных кислот являются широкий спектр клеток врожденного и адаптивного иммунитета, которые также демонстрируют увеличенную продолжительность жизни, включая М2 макрофаги, Tregs и Т-клетки памяти.

Доказано, что окисление жирных кислот модулирует воспалительные функции макрофагов. Аберрантное накопление жирных кислот и их производных (например, липопротеидов) в макрофагах коррелирует с образованием пенных клеток и развитием воспалительных процессов, включая атеросклеротические поражения (O'Neill L.A. et al., 2016). Показано, что повышенный внутриклеточный уровень ненасыщенных жирных кислот (включая олеиновую, линолевую и арахидоновую кислоты), стимулирует выработку IL-1 α в пенных клетках, что приводит к усилению воспаления *in vivo* (Freigang S. et al., 2013). Усиленная экспрессия конститутивно активной карнитин-пальмитоилтрансферазы I (транспортирует длинноцепочечные жирные кислоты в митохондрии) в клеточных линиях макрофагов повышает окисление жирных кислот, снижает накопление липидов и снижает продукцию воспалительных цитокинов. Следовательно, стимулирование окисления жирных кислот в провоспалительных макрофагах может быть одним из подходов к снижению их воспалительного потенциала.

Также было обнаружено, что окисление жирных кислот играет ключевую роль в дифференцировке макрофагов. В то время как М1 макрофаги (индуцированные стимуляцией IFN γ и липополисахаридами) используют гликолитический метаболизм, функциональная активность М2 макрофагов (определяемые активацией IL-4) ориентирована на систему окисления жирных кислот, которая

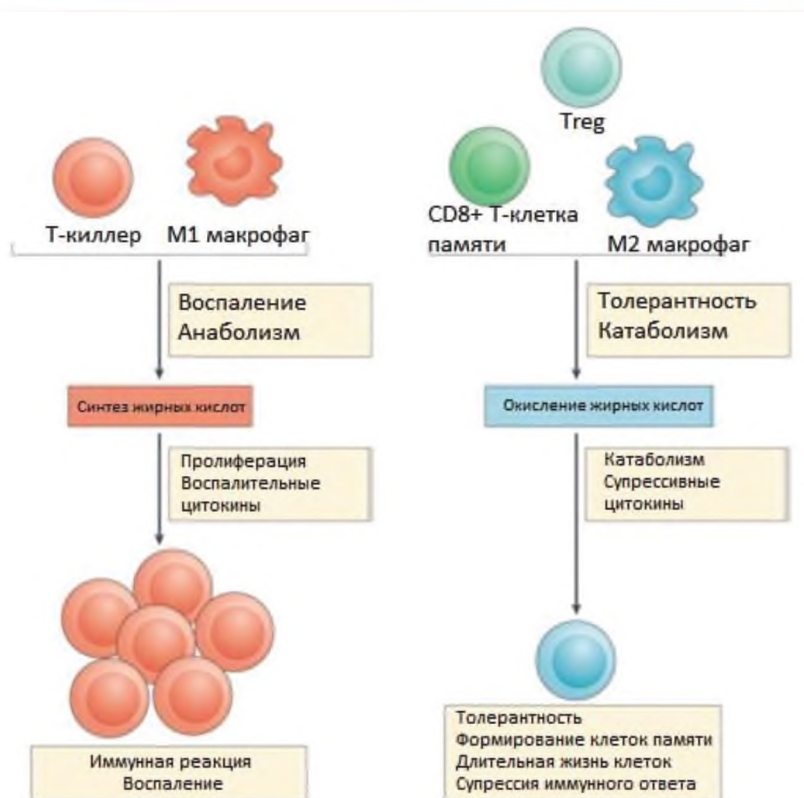


Рис. 74. **Функциональное значение синтеза и окисления жирных кислот для клеток иммунной системы** [по: O'Neill L.A. et al., 2016].

Воспалительные сигналы увеличивают уровень синтеза жирных кислот, что важно для пролиферации клеток иммунной системы и синтеза провоспалительных цитокинов. Напротив, толерогенные стимулы иммунной системы стимулируют окисление жирных кислот, которое необходимо для производства противовоспалительных цитокинов, что приводит к иммунной толерантности и ингибированию воспаления. Эффекторные Т-клетки демонстрируют повышенный уровень синтеза жирных кислот, что необходимо для их роста. В Т-клетках памяти выявляется высокий уровень окисления жирных кислот, что ограничивает их рост и стимулирует продолжительность жизни.

стимулируется STAT6 (сигнальный белок и активатор транскрипции 6) и PPAR γ (рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами) и ингибирует воспалительные сигналы (Huang S.C. et al., 2014). Таким образом, процесс окисления жирных кислот может играть некоторую дополнительную роль в поляризации M2 макрофагов.

Окисление жирных кислот также играет важную роль в регуляции функциональной активности Т-клеток. Обнаружено, что окисление жирных кислот регулирует баланс между провоспалительными эффекторными Т-клетками и Tregs, а также стимулирует активность долгоживущих Т-клеток памяти, которые

необходимы для устойчивой и длительной реализации иммунных процессов. В контексте регулирования баланса между эффекторными Т-клетками и Tregs было показано, что Tregs проявляют высокий уровень окисления жирных кислот по сравнению с Т-хелперами 1, 2 и 17 типов, и что окисление жирных кислот способствует генерации Tregs при ингибировании поляризации эффекторных Т-клеток (Michalek R.D. et al., 2011). Кроме того, Tregs имеют повышенную экспрессию генов ферментов, участвующих в окислении жирных кислот, включая карнитин-пальмитоилтрансферазу I, по сравнению с клетками Th17-лимфоцитами (Gerriets V.A. et al., 2015). Интересно, что в эффекторных Т-клетках подавляется окисление жирных кислот во время процесса активации. В соответствии с тем, что окисление жирных кислот ингибирует функцию эффекторных Т-клеток и способствует развитию толерогенного эффекта, лигирование рецептора PD1 на Т-клетках приводит к повышенной экспрессии карнитин-пальмитоилтрансферазы I и повышенному уровню окисления жирных кислот.

Окисление жирных кислот также играет важную роль в формировании и поддержании долгоживущих CD8⁺Т-клеток памяти. Показано, что CD8⁺Т-клетки памяти, которые медленно пролиферируют в стационарных условиях, но обеспечивают быстрый иммунный ответ на ранее встреченные антигены нуждаются в высоком уровне окисления жирных кислот для своевременного функционального ответа на антигенную стимуляцию (van der Windt G.J. et al., 2013). Стимуляция CD8⁺Т-клеток памяти с помощью IL-15 увеличивает их экспрессию карнитин-пальмитоилтрансферазы I и способствует окислению жирных кислот, приводя к увеличению выживаемости клеток.

В отличие от окисления жирных кислот, которое способствует развитию и активности противовоспалительных клеток иммунной системы, синтез жирных кислот положительно регулирует образование и функцию провоспалительных клеток как врожденной, так и адаптивной иммунной системы (см. рис. 74).

Провоспалительные стимулы, такие как липополисахариды бактериального происхождения и цитокины, вызывают увеличение синтеза жирных кислот в макрофагах (Feingold K.R. et al., 2012). Фактор транскрипции 1c, связывающий регуляторный элемент стерола (SREBP1c), активируется во время дифференцировки моноцитов в макрофаги после обработки макрофагальным колониестимулирующим фактором (M-CSF), что приводит к увеличению экспрессии ряда генов, связанных с системой синтеза жирных кислот, например, гена синтазы жирных кислот. Важно отметить, что увеличение уровня синтеза жирных кислот имело решающее значение для дифференцировки и проявлению провоспалительной функции макрофагов. Установлено, что митохондриальный разобщающий белок UCP2 стимулирует синтез жирных кислот посредством регуляции активности синтазы жирных кислот, что приводит к выраженной воспалительной реакции, развивающейся на фоне (Moon J.S. et al., 2015).

В ряде исследований показано, что синтез жирных кислот обеспечивает связь между врожденным и адаптивным иммунитетом посредством регуляции функции ДК. Было обнаружено, увеличение уровня синтеза жирных кислот является обязательным условием при опосредованной через Toll-подобные рецепторы активации ДК, что значительно стимулирует их функциональный ответ по отношению к цитотоксическим Т-лимфоцитам (Everts B. et al., 2015). Синтез жирных кислот также является ключом к реализации функциональной активности Т- и В-клеток: синтез жирных кислот и стеролов необходим для клеточной пролиферации после активации этих клеток через их антигенные рецепторы (Dufort F.J. et al., 2014). Специфичная для Т-клеток деления ацетил-КоА-карбоксилазы 1 (фермент, ограничивающий скорость синтеза жирных кислот) приводит к снижению уровня бласттрансформации и понижению накопления антиген-специфических CD8⁺Т-клеток. Этот дефект может быть преодолен добавлением экзогенных жирных кислот к дефицитным по ацетил-КоА-карбоксилазе 1 Т-клеткам (Lee J. et al., 2014).

Уровень синтеза жирных кислот также влияет на баланс эффекторных Т-клеток и Tregs. Фармакологическое или генетическое ингибирование ацетил-КоА-карбоксилазы 1 в CD4⁺Т-клетках показало, что синтез жирных кислот необходим для правильной дифференцировки Th17-клеток, но не для формирования и функционирования Tregs (O'Neill L.A. et al., 2016).

Wang C. et al. (2015) показали, что белок, называемый CD5-антигеноподобным (CD5L), связывает синтазу жирных кислот и, как полагают, способствует выработке полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Этот белок экспрессируется именно на Th17-клетках, которые продуцируют низкие уровни IL-17, синтезируют в большом количестве противовоспалительный цитокин IL-10 (Wang C. et al., 2015). Показано, что у мышей эта фракция Th17-клеток имеет гомеостатическое значение в кишечнике, предотвращая инвазию микробной флоры в кишечника и стимулируя функцию эпителиального барьера, тогда как у людей они могут играть роль в защите хозяина от *Staphylococcus aureus*. ПНЖК, вероятно, модулируют выработку лигандов, производных от холестерина, для ROR γ t, ключевого транскрипционного фактора для Th17-клеток. Соответственно, модифицированные лиганды для ROR γ t способствуют выработке IL-10, одновременно ограничивая синтез IL-23 и IL-17. При патогенном воздействии на Th17-лимфоциты, экспрессия CD5L понижается и это может способствовать продукции насыщенных жирных кислот (за счет активации синтазы жирных кислот), что, в свою очередь, способствует образованию лигандов для ROR γ t, которые усиливают активность клеток в синтезе IL-23 и IL-17, но, при этом, ограничивая их способность синтезировать IL-10 (рис. 75).

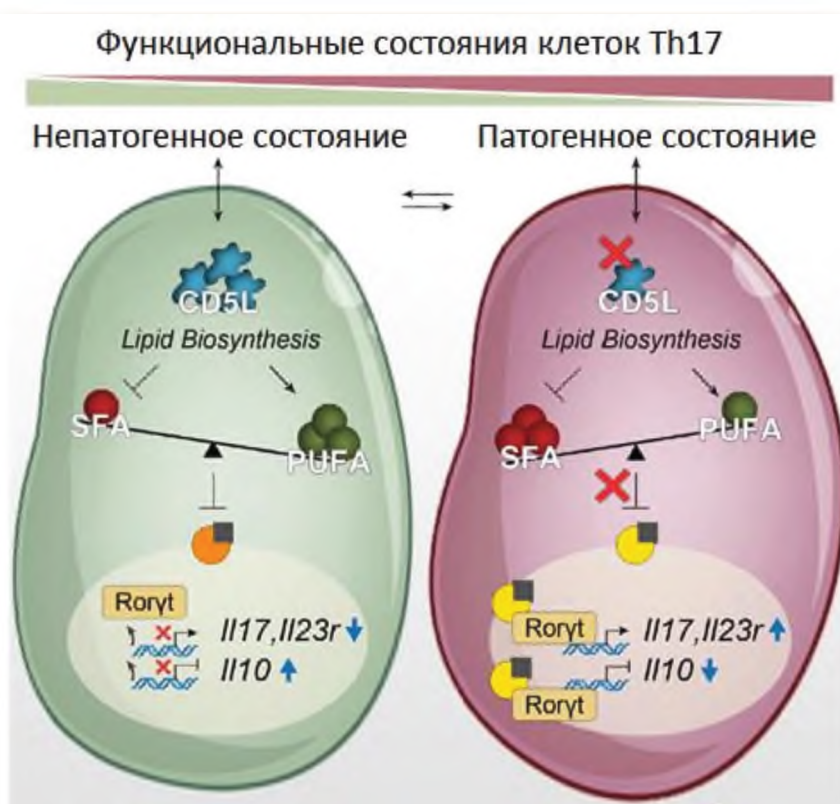


Рис. 75. Роль синтеза и окисления жирных кислот (в процессе липидного обмена) в механизмах регуляции функциональной активности Th17-клеток [по: Wang C. et al., 2015].

ROR γ t – фактор транскрипции RAR-родственных орфанных ядерных рецепторов (ROR);
 SFA – насыщенные жирные кислоты (saturated fatty acids);
 PUFA – полиненасыщенные жирные кислоты (polyunsaturated fatty acid).

В целом, процессы окисления и синтеза жирных кислот играют противоположные роли в иммунной системе. При этом окисление жирных кислот преимущественно проявляется в противовоспалительных и толерогенных клетках иммунной системы, тогда как синтез жирных кислот характерен для провоспалительных клеток врожденного и адаптивного иммунитета.

Особенности метаболизма аминокислот в клетках иммунной системы

Путь mTOR играет важную роль в клеточном метаболизме, в том числе в регуляции аминокислотного состава и их количества для взаимосвязи доступности питательных веществ при клеточном росте и пролиферации. Поэтому неудивительно, что доступность и метаболизм различных аминокислот играют важную роль в реализации различных функций клеток иммунной системы (рис. 76).

Катаболизм глутамин регулирует многочисленные аспекты функций клеток иммунной системы и играет важную роль в контексте генеза различных иммунопатологических состояний, например, сепсис (Kelly D., Wischmeyer P.E., 2003). Показано, что глутамин необходим для индукции IL-1 макрофагами в ответ на стимуляцию бактериальными полисахаридами (O'Neill L.A. et al., 2016). Кроме того, метаболизм глутамин также важен для образования оксида азота за счет участия в синтезе аргинина, что демонстрирует роль данной аминокислоты в цитотоксических и антимикробных функциях фагоцитирующих клеток. Фармакологическое ингибирование активности глутаминазы или изъятие глутамин из культуральной среды приводило к снижению продукции оксида азота активированными макрофагами. Установлено, что глутамин активно участвует в ЦТК и пути синтеза гексозамина и способствует поляризации M2 макрофагов в ответ на стимуляцию IL-4, тогда как липополисахарид-стимулированные M1 макрофаги M1 не нуждаются в глутамине для своего развития (Jha A.K. et al., 2015).

Функциональные ответы T- и B-клеток также регулируются метаболизмом глутамин. Метаболизм глутамин заметно возрастает при активации как T-клеток, так и B-клеток, и обе популяции нуждаются в глутамине для ответа на стимуляцию антигенных рецепторов (O'Neill L.A. et al., 2016; Wang R. et al., 2011). Гетерозиготный нокаут глутаминазы в T-лимфоцитах приводил к повышенным уровням синтеза АФК, который возрастал при гипоксии, указывая на роль метаболизма глутамин в контроле стресса АФК. Метаболизм глутамин также регулирует баланс между эффекторными T-клетками и Tregs, поскольку генетическая потеря белка-транспортера ASCT2 (который отвечает за поглощение нейтральных аминокислот, таких как глутамин и лейцин) в T-клетках приводила к нарушению образования и функции клеток Th1- и Th17-клеток, тогда как генерация Tregs была не изменена (Nakaya M. et al., 2014). Иллюстрируя ключевую связь между уровнями аминокислот и активностью пути mTOR в иммунной системе, это же исследование показало, что потеря ASCT2 или снижение уровней глутамин в культуральной среде приводит к снижению активности mTORC1, что совпадает с наблюдаемыми дефектами эффекторных T-клеток.

Метаболизм аргинин также играет ключевую роль в проявлении провоспалительной функции макрофагов (Rath M. et al., 2014). Макрофаги используют аргинин в двух разных метаболических путях: пути синтеза оксида азота и аргиназы. Аргинин-зависимый путь синтеза оксида азота наиболее выражен в провоспалительных M1 макрофагах. В данном случае аргинин через цетруллин превращается в оксид азота, процесс опосредуется индуцибельной синтазой оксида азота (iNOS). При этом экспрессия iNOS сама по себе необходима для функции провоспалительных макрофагов, поскольку макрофаги, полученные от мышеч с дефицитом iNOS, демонстрируют дефект завершеного фагоцитоза бактериальных и опухолевых клеток *in vitro*. Кроме того, экспрессия аргиназы в макрофагах ограничивает провоспалительный потенциал эффекторных T-клеток

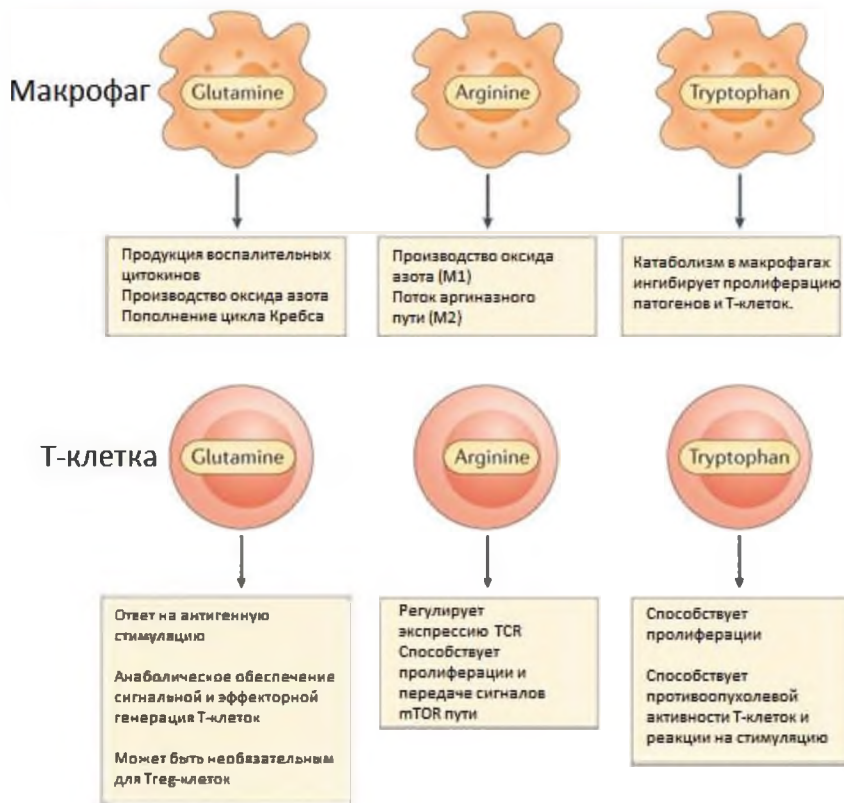


Рис. 76. Функциональное значение метаболизма аминокислот для клеток иммунной системы

[по: O'Neill L.A. et al., 2016].

В макрофагах глутамин и аргинин имеют решающее значение для реализации функциональной активности, включая выработку цитокинов и оксида азота. Аргинина в макрофагах является ключевым в поляризации провоспалительных и толерогенных клеток. Активация метаболизм триптофана в макрофагах может привести к ингибированию активности адаптивного иммунитета. Активация метаболизма глутамина в Т-клетках необходима в ответ на стимуляцию Т-клеточного рецептора, что приведет к усилению пролиферативного ответа и продукции цитокинов. Триптофан играет важную роль в стимулировании пролиферации Т-клеток, отсутствие его может быть причиной неспособности Т-лимфоцитов реагировать на инфекционные и опухолевые антигены.

и положительно коррелирует с тяжестью заболевания как при висцеральном лейшманиозе, так и при ВИЧ-инфекции (Takele Y. et al., 2013). Указывая на возможную иммунорегуляторную роль метаболизма аргинина, было обнаружено, что аргинин регулирует экспрессию компонентов Т-клеточного рецептора и стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов человека (Rodriguez P.C. et al., 2006). Подобно тому, что наблюдается при дефиците глутамина, активность mTORC1 в Т-клетках подавляется в культурах *in vitro* при истощении и по аргинину.

Триптофан – еще одна аминокислота, которая, как было замечено, играет ключевую роль в модуляции функций клеток иммунной системы. Показано, что лечение животных высокими дозами экзогенного триптофана приводило к развитию аутоиммунного фенотипа, характеризующегося aberrантной функцией эозинофилов (O'Neill L.A. et al., 2016). Многие исследования иммунорегуляторной роли метаболизма триптофана в клетках иммунной системе были сосредоточены на роли фермента, называемого индоламин-2,3-диоксигеназой (IDO), который отвечает за лимитирующую стадию катаболизма триптофана. Экспрессия IDO стимулируется воздействием липополисахаридов на фагоцитирующие клетки. Кроме того, для активации синтеза $IFN\gamma$ необходимо увеличение катаболизма триптофана путем запуска экспрессии IDO (Werner E.R. et al., 1989). Также было обнаружено, что катаболизм триптофана в клетках-хозяевах может предотвращать рост бактерий и паразитов, лишая последние необходимого субстрата для анаболического роста (Schroten H. et al., 2001). При более прямом анализе роли метаболизма триптофана в иммунной системе было показано, что Т-клеткам требуется триптофан для пролиферации *in vitro*, тогда как управление экспрессией IDO и катаболизмом триптофана в АДК приводит к ингибированию стимуляцию Т-лимфоцитов (Lee G.K. et al., 2002). Таким образом, различные аспекты метаболизма триптофана, в том числе метаболиты, образующиеся при катаболизме триптофана (такие как кинуренин) могут играть важную роль в модулировании функции клеток иммунной системы.

Значение метаболизма триптофана для клеток иммунной системы стала областью интенсивных исследований, поскольку она также связана со склонностью опухолевых клеток уклоняться от иммунного ответа. Во многих типах опухолей экспрессия IDO наблюдается как в опухолевых клетках, так и в ассоциированных с опухолью стромальных клетках, а повышенные уровни экспрессии IDO коррелируют с неблагоприятным прогнозом при некоторых типах рака (Weinlich G. et al., 2007). Принудительная экспрессия IDO в опухолевых клетках нарушает противоопухолевый ответ Т-клеток, что можно преодолеть путем фармакологического ингибирования IDO с помощью 1-метилтриптофана. Будущие исследования роли метаболизма аминокислот в реализации функций клеток иммунной системы, может дать важные новые сведения о механизмах управления реактивностью иммунной системы.

Глава 7. Метаболизм клеток иммунной системы при онкологических заболеваниях



Рак является одной из основных причин смерти от злокачественных новообразований среди мужчин и женщин во всем мире [Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2002; Аксель Е.М., 2011; Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2011]. Статистическое изучение факторов, влияющих на возникновение и течение болезни, свидетельствует о том, что факторы внешней среды — одна из основных причин развития рака. Так, табакокурение преобладает среди факторов, способствующих развитию рака легкого, и представляет смесь физических и химических канцерогенов. Этим и обусловлено, что злокачественными новообразованиями легких в 1,5–2 раза чаще болеют жители крупных промышленных городов, где велик выброс в атмосферу канцерогенных веществ за счет заводов, двигателей внутреннего сгорания, металлургической и химической промышленности, производства удобрений. Риск возникновения рака легкого повышен у рабочих, занятых на производстве алюминия, кокса, чугуна и стали, асбеста, каменноугольной смолы, никеля и его соединений, талька и веществ, содержащих асбестоподобные волокна [Fucic A. et al., 2010; Dela Cruz C.S. et al., 2011; Torok S. et al., 2011; Yano T. et al., 2011].

Однако в качестве основных этиологических факторов развития рака легкого выделяют также и генетическую предрасположенность. На сегодняшний день рак легкого считается мультифакториальной генетической болезнью [Кузнецова И.А. и др., 2012; Cheng Z. et al., 2012; Hou X.H. et al., 2012; Otsuki T. et al., 2012; Wei H.B. et al., 2012]. Доказано, что канцерогенез по своей сути является процессом длительного накопления мутаций и «эпимутаций» прото- и антионкогенов. Выделяют группу онкоассоциированных аллелей, представляющих собой нормальные варианты генов, которые определяют повышение риска развития рака легкого. Так, в ряде исследований установлено, что полиморфизмы генов системы биотрансформации ксенобиотиков GSTM1 и GSTT1 (глутатион-S-трансферазы классов M1 и T1) служат фактором риска развития рака легкого. Это связано с тем, что снижается активность глутатион-зависимой системы биотрансформации ксенобиотиков, что повышает патогенность влияния вредных факторов окружающей среды (в том числе и курения) на легочную ткань и, соответственно, повышает вероятность развития рака легкого [Ушакова Н.В. и др., 2006; Cabral R.E. et al., 2010; Timofeeva M. et al., 2010; Ada A.O. et al., 2012; Li W. et al., 2012; Pliarchopoulou K. et al., 2012]. Глутатион-S-трансферазы (GST) являются группой ферментов (состоят из 4 классов), которые обладают широкой субстратной специфичностью, метаболизируя многие субстраты [Higgins L.G. et al., 2011; Chen J. et al., 2012; Lannutti F. et al., 2012; Sireesha R. et al., 2012; Sotton B.

et al., 2012; Zhang W. et al., 2012]. Различия в уровнях активности изоферментов GST, определяемые полиморфными вариантами соответствующих генов, обуславливают изменения в способности и скорости метаболизма ксенобиотиков. Доказано, что при снижении активности GST классов M1 и T1 риск развития рака легкого возрастает в 16–41 раз, в то же время при снижении активности GST только класса M1 он увеличивается в 2,5 раза [Alexandrie A.K. et al., 2004; Sobti R.C. et al., 2004; Vineis P. et al., 2004; Wenzlaff et al., 2005].

Наряду с полиморфизмом генов системы биотрансформации ксенобиотиков в последнее время все большее внимание уделяется гену-онкосупрессору p53, который играет центральную роль в поддержании стабильности генома и предотвращает процесс удвоения поврежденной ДНК. Продукт данного гена (белок p53) блокирует процесс деления клетки в случае повреждения ее ДНК [Gu B., Zhu W.G., 2012; Sahin E., DePinho R.A., 2012; Roemer K., 2012 Wang X., Jiang X., 2012]. Причем в случае невозможности репарации ДНК белок p53 запускает механизм апоптоза. Белок p53 является фактором транскрипции и регулирует активность большого числа генов, которые участвуют в торможении клеточного цикла, активации апоптоза и ингибированию ангиогенеза [(Freed-Pastor W.A., Prives C., 2012; Knappskog S., Lønning P.E., 2012; Miyake N. et al., 2012; Zwang Y. et al., 2012)]. Таким образом, мутация гена p53 играет ключевую роль в приобретении клеткой злокачественного фенотипа.

Еще одним фактором, обуславливающим развитие рака, является снижение реактивности иммунной системы. В то же время, с одной стороны, доказано, что именно иммунодефицитное состояние определяет развитие злокачественной опухоли [Hadden J.W., 2003; Hamelin R. et al., 2004; Makinson A. et al., 2010; de Miranda N.F. et al., 2011]. С другой стороны, накапливается все больше сведений, что сама опухоль индуцирует развитие иммунной супрессии, которая может проявляться в широком диапазоне от незначительной степени до полной анергии. Механизмы, ответственные за нарушения функции иммунной системы, в настоящее время полностью не определены. В целом установлено, что у больных онкологическими заболеваниями дисфункция иммунной системы проявляется в нарушении антигенпредставляющей функции антигенпрезентирующих клеток, эффекторной функции Т-лимфоцитов, уменьшении пролиферативного индекса и экспрессии отдельных субъединиц рецептора IL-2, а также в нарушении баланса синтеза цитокинов [Sun T. et al., 2009; Biswas S.K., Mantovani A., 2010; Görgün G., Anderson K.C., 2011; Lum L.G., Thakur A., 2011; Morre M., Beq S., 2012].

Тем не менее, несмотря на ряд исследований, определяющих важную роль иммунной системы и полиморфизма различных генов в развитии рака легкого, многое в патогенезе данного онкологического заболевания остается неизученным. В частности, отсутствуют исследования метаболического статуса клеток иммунной системы при данном заболевании в зависимости от гистологического типа рака легкого, стадии заболевания и генетического полиморфизма.

При исследовании состояния активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных раком легкого в зависимости от гистологического типа опухоли (рис. 77) установлено, что активность ГбФДГ снижается в

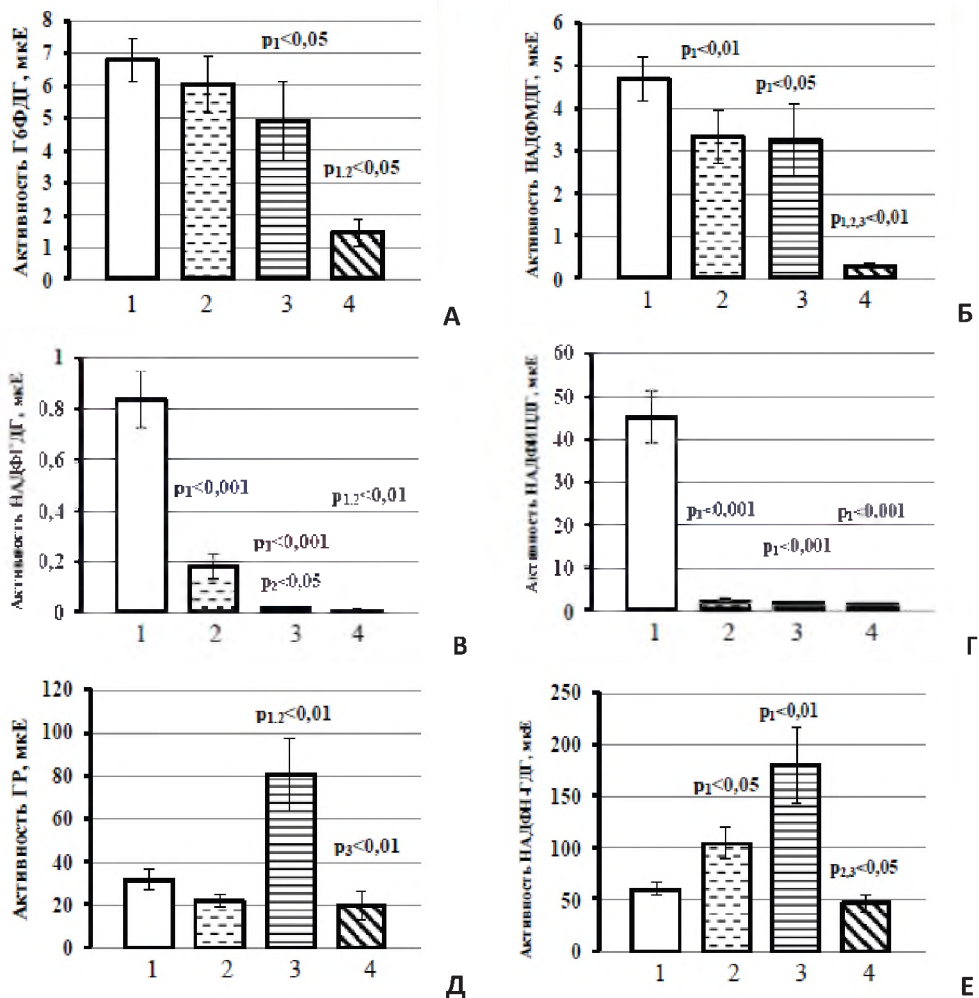


Рис. 77. Активность никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных раком легкого в зависимости от гистологического типа опухоли: 1 — контроль; 2 — плоскоклеточный рак легкого; 3 — аденокарцинома; 4 — мелкоклеточный рак

лимфоцитах крови больных аденокарциномой и мелкоклеточным раком легкого (МРЛ) (рис. 77 А). При этом у больных МРЛ достоверность снижения активности фермента проявляется по отношению как к контролю, так и к диапазону, выявляемому у больных плоскоклеточным раком легкого (ПКР). Независимо от гистологического типа опухоли у больных мужчин в лимфоцитах крови снижена активность НАДФ-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы (малик-фермента) (НАДФМДГ) (рис. 77 Б), НАДФГДГ (рис. 77 В) и НАДФИЦГ (рис. 77 Г). Однако минимальный уровень активности НАДФМДГ выявляется в лимфоцитах крови у больных МРЛ. В то же время минимальная активность НАДФГДГ выявляется в клетках иммунной системы у больных

аденокарциномой и МРЛ. Только у больных аденокарциномой в лимфоцитах крови повышена активность ГР, причем достоверность различия проявляется по отношению как к контрольному уровню, так и к диапазонам активности, выявляемых у больных ПКР и МРЛ (рис. 77 Д). Кроме того, обнаружено, что активность НАДФН-ГДГ повышена у больных ПКР и аденокарциномой относительно контрольного диапазона и уровня активности больных МРЛ (рис. 77 Е).

Состояние уровней активности НАД-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных раком легкого в зависимости от гистологического типа опухоли представлено на рисунке (рис. 78).

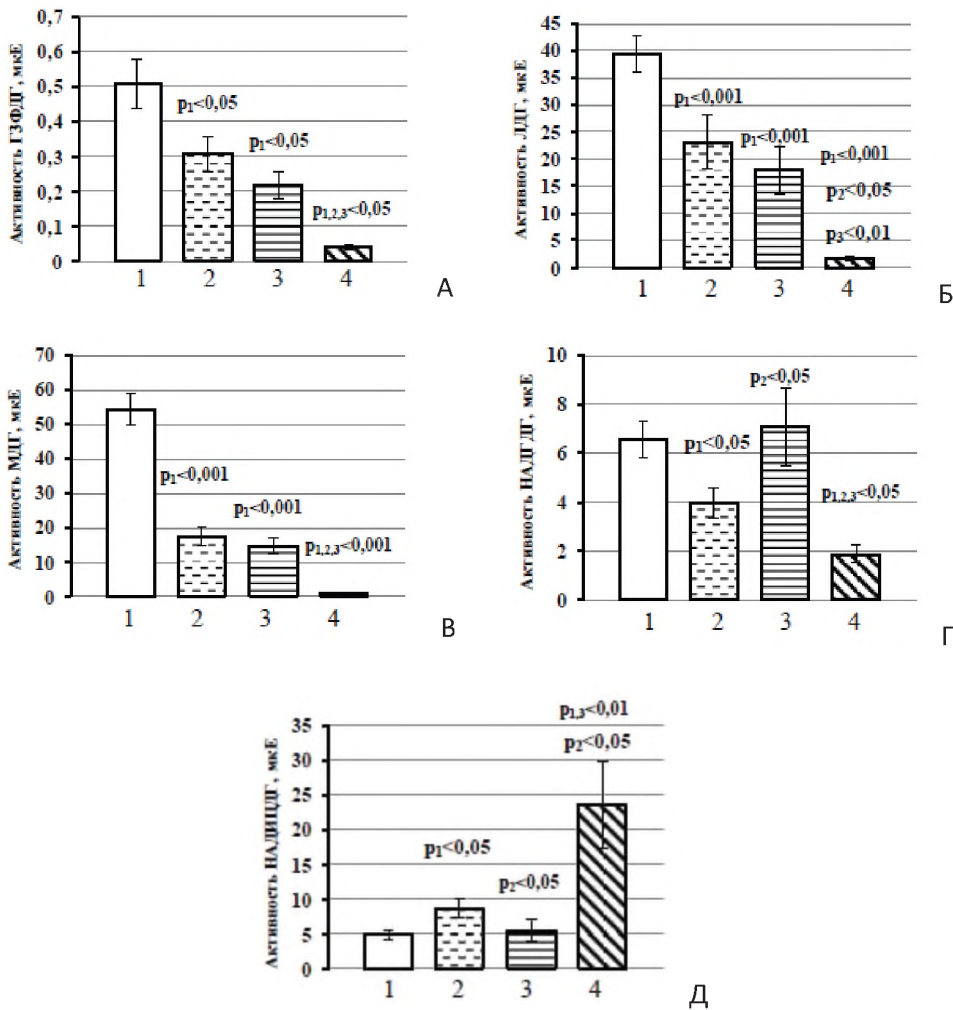


Рис. 78. Активность никотинамидадениндинуклеотид-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных раком легкого в зависимости от гистологического типа опухоли. (обозначения см. рис. 69)

Установлено, что у больных ПКР, аденокарциномой и МРЛ в клетках иммунной системы снижена активность ГЗФДГ (рис. 78 А). Однако минимальная активность ферментов выявляется у больных МРЛ. Соответствующим образом относительно контрольного диапазона изменяется активность ЛДГ и МДГ (рис. 78 Б и В): уровни ферментов снижены независимо от гистологического типа опухоли, но у больных МРЛ активность фермента достоверно ниже и по сравнению с диапазоном, выявленным у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Активность НАДГДГ снижена в лимфоцитах крови у больных ПКР и МРЛ (рис. 78 Г), в то время как уровень НАДИЦДГ у больных данных групп повышен (рис. 78 Д). При этом активность НАДИЦДГ в лимфоцитах крови больных НМРЛ максимальна.

Только у больных ПКР и МРЛ в лимфоцитах крови снижена активность НАДН-ЛДГ (рис. 79 А). При этом активность НАДН-ЛДГ в лимфоцитах крови больных МРЛ минимальна и статистически достоверно отличается от уровней, выявляемых у больных ПКР и аденокарциномой. Независимо от гистологического типа опухоли в лимфоцитах крови больных раком легкого снижена активность НАДН-МДГ (рис. 79 Б).

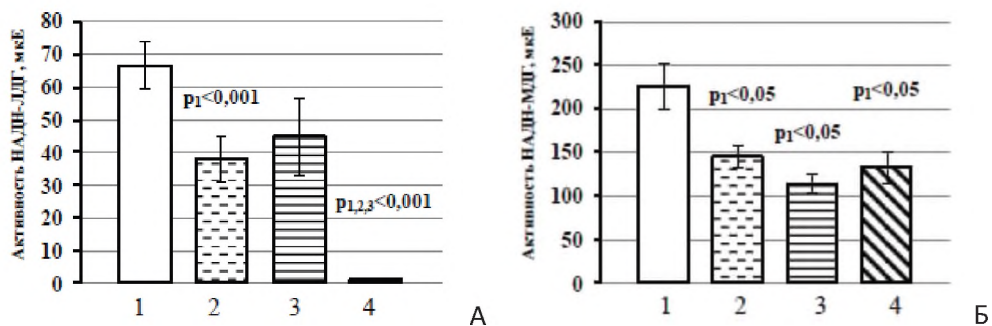


Рис. 79. Активность никотинамидадениндинуклеотидфосфат--зависимых реакций лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы в лимфоцитах крови у больных раком легкого в зависимости от гистологического типа опухоли. (обозначения см. рис. 69)

С помощью корреляционного анализа установлено, что взаимосвязь метаболических показателей клеток иммунной системы крови с размером опухоли зависит от гистологического типа опухоли. Так, выявляются многочисленные корреляционные связи размера опухоли с активностью ферментов в лимфоцитах крови у больных ПКР: с Г6ФДГ ($r = -0,32$, $p = 0,032$), ЛДГ ($r = -0,42$, $p = 0,005$), НАДФМДГ ($r = -0,35$, $p = 0,006$), НАДФГДГ ($r = -0,42$, $p = 0,008$), МДГ ($r = -0,37$, $p = 0,007$), НАДГДГ ($r = -0,33$, $p = 0,024$), ГР ($r = -0,32$, $p = 0,041$), НАДН-ГДГ ($r = 0,40$, $p = 0,006$) и НАДФН-ГДГ ($r = -0,52$, $p < 0,001$). В то же время у больных

аденокарциномой уровни активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови не взаимосвязаны с размером опухоли. У больных МРЛ является единственная взаимосвязь: с НАДН-ЛДГ ($r=-0,75$, $p < 0,001$).

Сравнительный анализ уровней активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных раком легкого в зависимости от гистологического типа опухоли позволяет отметить, что ферментативный статус клеток иммунной системы больных МРЛ значительно отличается от особенностей внутриклеточного метаболизма больных ПКР и аденокарциномой. Так, на основании установленной активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ у больных ПКР и аденокарциномой метаболизм лимфоцитов крови можно характеризовать следующим образом.

Снижение активности ГЗФДГ определяет пониженный уровень переноса продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза, что, соответственно, отражается на интенсивности анаэробного окисления глюкозы ([Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Ishijima S. et al., 2008; Tsang W.Y. et al., 2008; Yeh J.I. et al., 2008; Kota V. et al., 2010; Saheki T. et al., 2011; de la Roche M. et al., 2012]). Сниженный уровень гликолиза в лимфоцитах крови больных ПКР и аденокарциномой характеризуется понижением активности анаэробной реакции ЛДГ и НАДН-зависимой реакции МДГ. Особенностью метаболического состояния цитоплазматического компартмента клеток иммунной системы у больных НМРЛ является снижение активности НАДФМДГ, что может привести к ингибированию реакций липидного анаболизма. Кроме того, у больных аденокарциномой снижена активность ключевой и инициализирующей реакции пентозофосфатного цикла — Г6ФДГ, а активность ГР повышена. Следовательно, в клетках иммунной системы крови у больных аденокарциномой значительно снижены реакции пластического обмена, но при повышении активности глутатион-зависимой антиоксидантной системы.

Состояние митохондриального компартмента клеток иммунной системы крови у больных ПКР и аденокарциномой характеризуется разнонаправленным изменением активности оксидоредуктаз цикла трикарбоновых кислот, снижением активности вспомогательных дегидрогеназных реакций и повышенным уровнем оттока интермедиатов цикла Кребса на реакции аминокислотного обмена через НАДФ-зависимую глутаматдегидрогеназу. Установлено, что у больных ПКР, в отличие от пациентов с аденокарциномой, повышена активность НАДИЦДГ — одной из начальных реакций цикла трикарбоновых кислот [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Wise D.R. et al., 2011]. Однако за счет повышенного уровня оттока субстратов уровень МДГ у больных ПКР и аденокарциномой понижен. Кроме того, в лимфоцитах крови больных НМРЛ снижен уровень притока субстратов на окислительно-восстановительные реакции лимонного цикла. Однако в этом случае выявляются особенности, определяемые гистологическим

типом опухоли. Так, у больных ПКР при снижении активности НАДГДГ менее выражено снижается активность НАДФГДГ. В то же время у больных аденокарциномой активность НАДГДГ находится на контрольном уровне, тогда как активность НАДФГДГ снижена до минимума, который может быть определен биолюминесцентным методом.

Метаболизм лимфоцитов крови больных МРЛ также характеризуется ингибированием анаэробных реакций пластического обмена, анаэробного окисления глюкозы и цикла трикарбоновых кислот. Однако снижение активности данных метаболических процессов более выражено, чем в лимфоцитах больных НМРЛ. При этом установлено, что максимальный уровень НАДИЦДГ в лимфоцитах крови больных МРЛ совпадает с минимальным уровнем МДГ, активность которой характеризует терминальные реакции цикла трикарбоновых кислот. Причем ингибирование реакций цикла Кребса не связано с оттоком субстратов на реакции аминокислотного обмена, что определяется нормальным уровнем НАДФН-ГДГ.

Значительно различаются регуляторные особенности метаболизма клеток иммунной системы крови у больных раком легкого с различным гистологическим типом опухоли, что определяется взаимосвязями активности метаболических ферментов лимфоцитов с размером опухоли. Так, максимальное количество взаимосвязей выявляется у больных ПКР. С ростом опухоли снижается интенсивность пластических процессов, определяемых продуктами пентозофосфатного цикла, а также активность реакций липидного анаболизма и аэробного дыхания. В то же время у больных аденокарциномой метаболизм лимфоцитов крови не зависит от размера опухоли, что отражает отсутствие регуляторных взаимосвязей опухоли и клеток иммунной системы крови. У больных МРЛ с помощью корреляционного анализа установлено, что с ростом опухоли снижается активность анаэробной реакции ЛДГ, характеризующей интенсивность терминальных стадий гликолиза.

Взаимоотношения злокачественной опухоли и организма-носителя многообразны. С одной стороны, организм создает опухоли необходимые условия для существования и роста, с другой — противодействует развитию рака [Долгих В.Т., 2001; Барышников А.Ю., 2003]. В динамике роста и развития опухоли меняются ее взаимоотношения с иммунной системой, что характеризуется и в том числе изменением интенсивности метаболических процессов в лимфоцитах.

Обнаружено, что уже при I стадии заболевания снижены уровни активности Г6ФДГ, НАДФМДГ, НАДФГДГ и НАДФИЦДГ (рис. 80). Активность Г6ФДГ в клетках иммунной системы крови у больных с II стадией рака легкого остается сниженной, при этом на III стадии заболевания повышается, превалируя

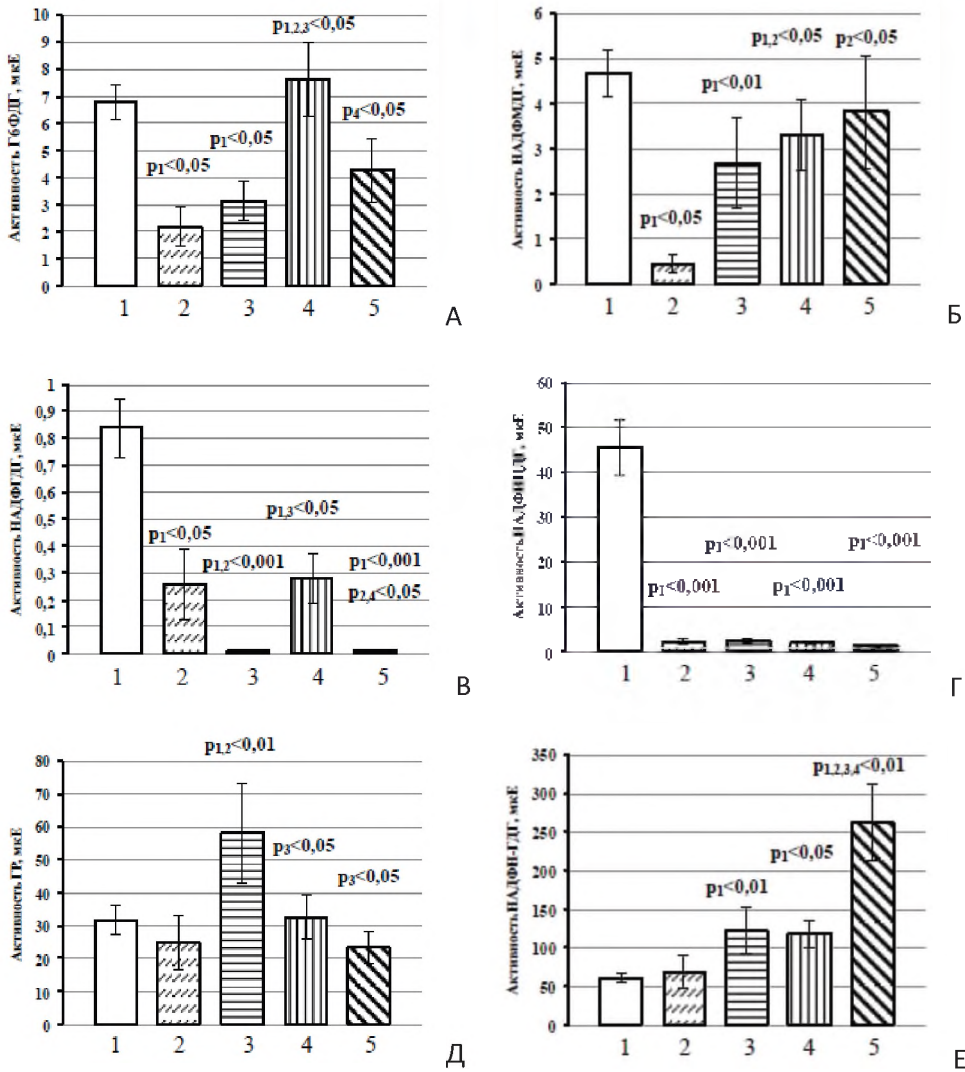


Рис. 80. Активность никотинамиддениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от стадии заболевания: 1 — контроль; 2 — I стадия; 3 — II стадия; 4 — III стадия; 5 — IV стадия

контрольный уровень (рис. 80 А). В то же время при IV стадии заболевания активность Г6ФДГ снижается относительно уровня, выявленного на III стадии НМРЛ, достигая контрольного диапазона. Пониженная активность НАДФМДГ в лимфоцитах крови при I стадии рака легкого на II и последующих стадиях повышается, достигая контрольного диапазона на IV стадии заболевания (рис. 80 Б). Активность НАДФГДГ в лимфоцитах крови изменяется в

зависимости от стадии заболевания, но при этом постоянно остается достоверно ниже контрольного диапазона (рис. 80 В). Активность НАДФИЦДГ независимо от стадии НМРЛ также остается ниже контрольного уровня (рис. 80 Г). Активность ГР в клетках иммунной системы повышается при II стадии заболевания, но уже при III стадии снижается до контрольного уровня, сохраняясь в диапазоне нормы (рис. 80 Д). Уровень активности НАДФН-ГДГ в лимфоцитах больных с II стадией патологического процесса повышается. При IV стадии заболевания он резко повышается относительно как контрольного диапазона, так и уровней, выявленных у больных с I, II и III стадиями рака легкого.

Уровни активности НАД-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных НМРЛ в зависимости от стадии заболевания представлены на рис. 81.

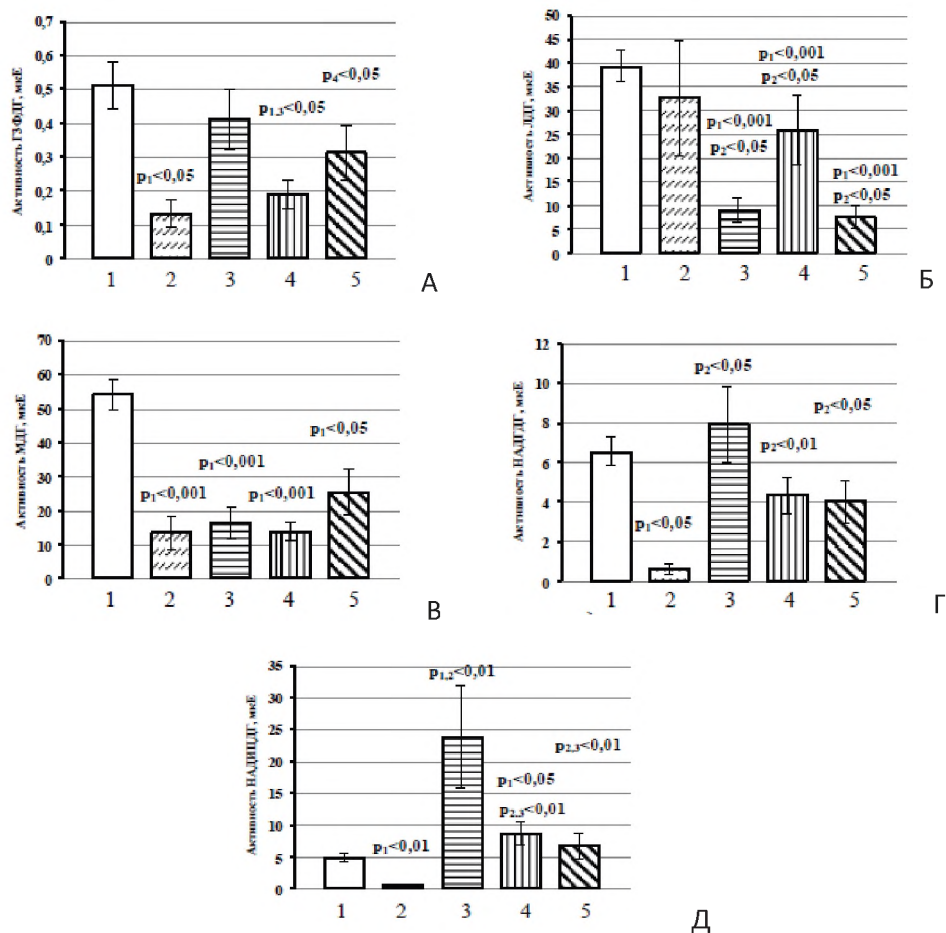


Рис. 81. Активность никотинамидадениндинуклеотид-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от стадии заболевания. (обозначения см. рис. 69)

Установлено, что уже на I стадии заболевания в лимфоцитах периферической крови снижена активность ГЗФДГ, МДГ, НАДГДГ и НАДИЦДГ. Активность ГЗФДГ в клетках иммунной системы крови у больных с II стадией рака легкого нормализуется, однако на III стадии снова статистически достоверно понижается с повышением до контрольного диапазона на IV стадии (рис. 81 А). Активность ЛДГ в лимфоцитах крови у больных с II стадией заболевания снижается в 4,4 и 3,7 раза соответственно относительно контрольного диапазона и уровня, выявленного у мужчин на I стадии рака легкого (рис. 81 Б). При III стадии патологического процесса активность данного фермента несколько повышается, не достигая при этом контрольного и исходного уровней. На IV стадии заболевания она снова снижается. Активность МДГ в лимфоцитах крови больных НМРЛ снижена относительно контрольного уровня независимо от стадии заболевания (рис. 81 В). Активность НАДГДГ, сниженная в лимфоцитах крови больных с I стадией заболевания, при II стадии повышается до контрольного диапазона и остается на данном уровне при III и IV стадиях (рис. 81 Г). Сниженная активность НАДИЦДГ в лимфоцитах крови у больных с I стадией НМРЛ значительно повышается на II стадии патологического процесса, при III стадии снижается, оставаясь при этом повышенной относительно как исходного уровня, так и контрольного диапазона (рис. 81 Д). При IV стадии заболевания внутриклеточная активность данного фермента снижается уже до уровня контрольного диапазона.

Активность анаэробной реакции ЛДГ в лимфоцитах периферической крови снижена уже у больных с I стадией НМРЛ (рис. 82 А).

На II стадии заболевания она повышается, но контрольного диапазона достигает лишь на III стадии. У больных с IV стадией активность НАДН-ЛДГ вновь резко снижается. Активность НАДН-МДГ в лимфоцитах крови у больных с I стадией НМРЛ также понижена (рис. 82 Б). При II стадии она восстанавливается до контрольного диапазона, а при III и IV стадиях прогрессивно снижается, достигая на терминальной стадии уровня, выявленного при I стадии патологического процесса. Аналогично в зависимости от стадии НМРЛ изменяется активность НАДН-ГДГ (рис. 82 В). При I стадии заболевания обнаружено ее значительное снижение, тогда как при II стадии уровень фермента восстанавливается, вновь снижаясь к IV стадии рака легкого.

С помощью корреляционного анализа выявлены особенности во взаимосвязи уровней активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови с размером опухоли в зависимости от стадии НМРЛ. Установлено, что при I стадии заболевания с размером опухоли коррелирует только активность ЛДГ ($r = -0,75$, $p = 0,028$). При II стадии не обнаружены взаимосвязи между размером опухоли и уровнями активности метаболических ферментов в лимфоцитах крови. У больных с III стадией рака легкого с размером опухоли взаимосвязаны

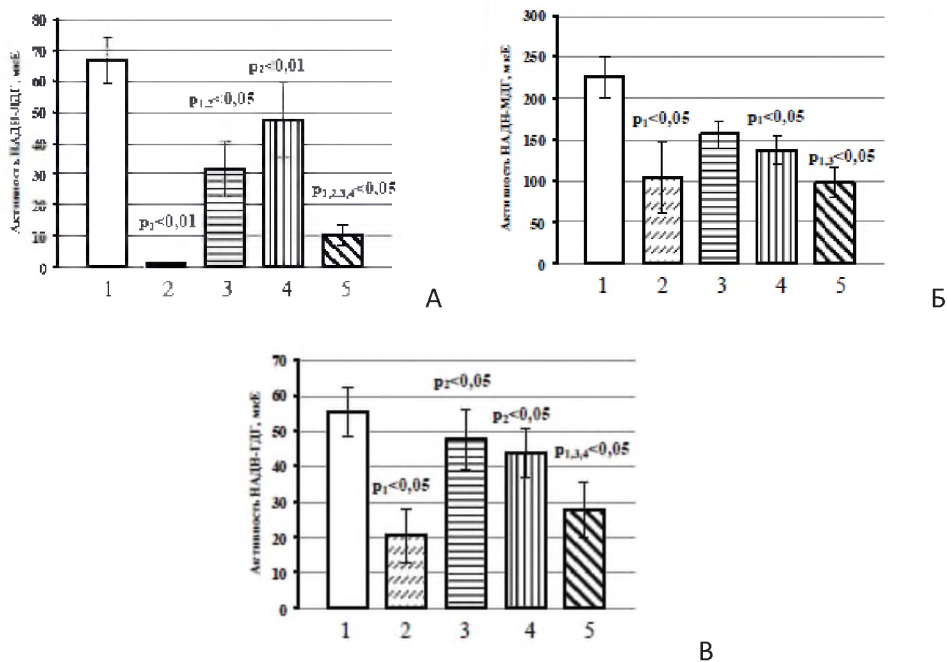


Рис. 82. Активность никотинамидадениндинуклеотид-зависимых реакций лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и никотинамидадениндину-клеотид-зависимой глутаматдегидрогеназы в лимфоцитах крови у больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от стадии заболевания. (обозначения см. рис. 69)

уровни активности НАДФМДГ ($r = -0,44$, $p = 0,005$), НАДФГДГ ($r = -0,43$, $p = 0,006$), МДГ ($r = -0,43$, $p = 0,006$), НАДГДГ ($r = -0,44$, $p = 0,005$) и НАДФН-ГДГ ($r = -0,44$, $p = 0,005$). При IV стадии заболевания также выявлены отрицательные взаимосвязи размера опухоли и уровней активности Г6ФДГ ($r = -0,62$, $p = 0,012$), ЛДГ ($r = -0,67$, $p = 0,003$), НАДФГДГ ($r = -0,67$, $p = 0,002$) и МДГ ($r = 0,53$, $p = 0,031$).

Анализ уровней активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови в зависимости от стадии НМРЛ позволил установить, что уже при I стадии заболевания в клетках иммунной системы крови снижены пластические процессы, определяемые реакциями Г6ФДГ и НАДФМДГ. Пониженный уровень активности ГЗФДГ характеризует снижение интенсивности переноса продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Ishijima S. et al., 2008; Tsang W.Y. et al., 2008; Yeh J.I. et al., 2008; Kota V. et al., 2010; Saheki T. et al., 2011; de la Roche M. et al., 2012]. Подобное состояние реакций, стимулирующих анаэробное окисление глюкозы, соответственно, может

привести к ингибированию гликолиза, что подтверждается сниженной активностью анаэробной реакции ЛДГ и НАДН-зависимой реакции МДГ. При этом можно предположить, что ингибирование ферментативных реакций гликолиза в лимфоцитах крови больных с I стадией рака легкого осуществляется не только на терминальных реакциях (характеризуется уровнями активности НАДН-ЛДГ и НАДН-МДГ), но и на начальных (характеризуется активностью Г6ФДГ). Снижение наработки пирувата в гликолизе может быть компенсировано уровнем активности аэробной реакции ЛДГ. Однако в лимфоцитах крови активность аэробной реакции ЛДГ не отличается от контроля, в результате чего в митохондриальный компартмент может поступать пониженное количество данного субстрата, что, соответственно, приведет к ингибированию ферментативных реакций цикла трикарбоновых кислот. Действительно, пониженные уровни активности НАДИЦДГ и МДГ отражают снижение интенсивности субстратного потока по лимонному циклу [Matsuda T. et al., 2010; Shi Q., Alexander B.M., Mehta M.P., 2011; Gibson G.E., 2011; Robbins D. et al., 2012]. Метаболическая значимость аэробной реакции ЛДГ характеризуется наличием отрицательной корреляционной взаимосвязи между ЛДГ и размером опухоли: у больных с I стадией заболевания именно при снижении активности ЛДГ увеличивается размер опухоли. Недостаточность метаболических реакций митохондриального компартмента также определяется снижением активности вспомогательных дегидрогеназных реакций (НАДФИЦДГ и НАДФГДГ) и нарушением взаимосвязей между реакциями цикла Кребса и процессами аминокислотного обмена (понижение активности НАДГДГ и НАДН-ГДГ).

При II стадии НМРЛ в лимфоцитах крови сохраняется пониженная активность Г6ФДГ и НАДФМДГ, что позволяет предположить пониженную наработку ряда интермедиатов для реакций макромолекулярного синтеза и ингибирование процессов липидного анаболизма. При этом выявляется повышение активности ГР, что характеризует активацию глутатион-зависимой антиоксидантной системы [Сафонова О.А. и др., 2011; Ефременко Е.С. и др., 2012; Waggjallah H., Alzohairy M., 2011; Djukic M.M. et al., 2012; Niedźwiedz A. et al., 2012; Yan J. et al., 2012]. Между тем активность ГЗФДГ в клетках иммунной системы крови у больных раком легкого с II стадией заболевания восстанавливается до контрольного уровня, что, соответственно, стимулирует окислительно-восстановительные реакции гликолиза за счет продуктов липидного катаболизма. По-видимому, сохранение активности ГЗФДГ в уровне контрольного диапазона можно определить как компенсаторную реакцию, так как уровень анаэробной реакции ЛДГ в лимфоцитах крови у больных с II стадией заболевания значительно выше, чем при I стадии, а активность НАДН-зависимой реакции МДГ достигает контрольного диапазона. Можно отметить, что наработка пирувата в цитоплазматическом компартменте лимфоцитов, по-видимому, даже несмотря на сниженный

уровень аэробной реакции ЛДГ, достаточен, так как уровень НАДИЦДГ в лимфоцитах крови больных с II стадией заболевания резко повышается и более чем в 5,0 раза превышает контрольный диапазон. Однако при этом выявляется низкая (в 3,3 раза по сравнению с контролем) активность МДГ, что позволяет предположить ингибирование последних реакций цикла трикарбоновых кислот. Необходимо отметить, что подобное состояние реакций лимонного цикла проявляется при сниженном уровне вспомогательных дегидрогеназных реакций, но при повышении оттока субстратов с цикла через НАДФН-ГДГ и при сохранении интенсивности притока через НАДГДГ.

В лимфоцитах крови у больных с III стадией НМРЛ выявляется значительное повышение активности Г6ФДГ (относительно уровней активности при предыдущих стадиях заболевания и относительно контрольного диапазона), что позволяет предположить активацию ряда пластических процессов. При этом сохраняется пониженный уровень активности ключевой реакции липидного анаболизма — НАДФМДГ [Kuo C.C. et al., 2008; Xu J. et al., 2008; Fu Z.Y. et al., 2009; Hsieh J.Y. et al., 2009]. При этом с помощью корреляционного анализа доказано, что чем выше ингибирование НАДФМДГ, тем больше размер опухоли. Подобные особенности в наработке НАДФН в цитоплазматическом компартменте приводят к тому, что активность ГР сохраняется на уровне контрольного диапазона. Вновь в лимфоцитах крови больных на II стадии заболевания выявляется снижение активности Г3ФДГ, однако при этом активность анаэробной реакции ЛДГ достигает диапазона нормы, тогда как активность НАДН-зависимой реакции МДГ значительно снижена. В связи с этим можно предположить, что интенсивность анаэробного окисления глюкозы соответствует контрольному уровню, а ингибирование ключевой реакции малат-аспартатного шунта связано с недостаточностью митохондриальных метаболических процессов. Действительно, при исследовании состояния метаболических реакций в митохондриальном компартменте клеток иммунной системы крови у больных с III стадией НМРЛ обнаружено, что если активность НАДИЦДГ и превышает контрольный уровень, то активность МДГ почти в 4 раза снижена по сравнению с ним. При этом сохраняются пониженной активностью вспомогательных дегидрогеназных реакций и повышенным отток субстратов с лимонного цикла через НАДФН-зависимую реакцию глутаматдегидрогеназы, но при сохранении на контрольном уровне интенсивности притока интермедиатов через НАДГДГ. Необходимо подчеркнуть, что при данной стадии заболевания выявляется максимальное количество взаимосвязей между размером опухоли и уровнями активности ферментов митохондриального компартмента. Причем выявляются только отрицательные корреляционные связи, что отражает зависимость роста опухоли от ингибирования метаболических процессов в митохондриальном компартменте. С этой позиции прежде всего выделяются ферменты, определяющие взаимосвязь реакций цикла

трикарбоновых кислот и процессов аминокислотного обмена (НАДФГДГ, НАДГДГ и НАДФН-ГДГ).

При IV стадии НМРЛ в лимфоцитах крови активность Г6ФДГ, НАДФМДГ и ГР выявляется на уровне контрольного диапазона, что характеризует достаточность реакций пластического обмена, липидного анаболизма и глутатион-зависимой антиоксидантной системы соответственно. При этом можно предположить, что Г6ФДГ проявляет себя как конкурент гликолизу за субстрат, так как, несмотря на высокий уровень активности ГЗФДГ, выявляется снижение активности анаэробной реакции ЛДГ (в 6,6 раза) и НАДН-зависимой реакции МДГ (в 2,3 раза). Сниженная интенсивность гликолиза проявляется при пониженном уровне аэробной реакции ЛДГ, что, соответственно, дополнительно ухудшает энергетическое состояние цитоплазматического компартмента клеток иммунной системы при терминальной стадии канцерогенеза. При этом выявляется отрицательная взаимосвязь уровней активности Г6ФДГ и ЛДГ с размером опухоли, что отражает повышение роста опухоли именно при ингибировании интенсивности пластических реакций и аэробных процессов в лимфоцитах крови. Состояние метаболических реакций в цикле трикарбоновых кислот в лимфоцитах крови при IV стадии заболевания характеризуется сохранением на контрольном уровне активности НАДИЦДГ и снижением активности МДГ. Активность вспомогательных дегидрогеназных реакций также снижена. При этом несомненно, что на нарушение активности метаболических реакций лимонного цикла влияют повышенный уровень оттока интермедиатов через НАДФН-ГДГ (более чем в 4,3 раза), снижение оттока через НАДН-ГДГ (в 2 раза) и сохранение на уровне нормы притока субстратов через НАДГДГ. Метаболическая значимость снижения активности НАДФГДГ и МДГ также определяется наличием отрицательной корреляционной связи уровней активности данных ферментов и размера опухоли.

Таким образом, установлены зависимости метаболического состояния лимфоцитов крови от стадии заболевания. Так, уже при I стадии НМРЛ обнаружено ингибирование аэробных и анаэробных энергетических процессов при снижении активности дегидрогеназных реакций, определяющих состояние пластических и анаболических процессов. При II стадии заболевания выявляется некоторое восстановление интенсивности анаэробного окисления глюкозы при выраженных нарушениях метаболического состояния митохондриального компартмента клеток иммунной системы крови (повышенная активность НАДИЦДГ и ингибирование МДГ). Можно предположить, что ингибирование терминальных стадий цикла трикарбоновых кислот осуществляется за счет повышения оттока субстратов на реакции аминокислотного обмена. В лимфоцитах крови больных с III стадией заболевания сохраняется снижение активности ключевой реакции липидного анаболизма, но при восстановлении активности Г6ФДГ и

интенсивности гликолиза. Однако при этом выявленные уровни активности метаболических ферментов митохондриального компартмента клеток иммунной системы позволяют предположить снижение интенсивности аэробных дыхательных процессов. При IV стадии НМРЛ восстанавливается интенсивность метаболических реакций, определяющих интенсивность пластических и анаболических процессов, но при выраженном снижении уровня активности анаэробного окисления глюкозы и аэробных процессов. В зависимости от стадии заболевания значительно изменяется состояние метаболизма клеток иммунной системы в лимфоузлах корня легкого. Причем наиболее выраженные изменения проявляются при II стадии НМРЛ: снижается активность ферментов, определяющих наработку внутриклеточного пирувата, что влияет на интенсивность субстратного потока по начальным реакциям цикла трикарбоновых кислот. Однако терминальные реакции лимонного цикла сохраняют свою активность на стабильном уровне независимо от стадий заболевания. Также на II стадии в метаболические механизмы реагирования клеток иммунной системы лимфоузлов корня легкого отмечается взаимодействие между интенсивностью субстратных потоков по циклу Кребса и реакциями аминокислотного обмена, однако уже с III стадии интенсивность анаэробного окисления глюкозы восстанавливается. С II стадии снижается активность ферментов, характеризующих наработку интермедиатов для реакций макромолекулярного синтеза и уровень реакций липидного катаболизма. На III стадии заболевания активность НАДФМДГ снижается, а на IV понижается уровень ГР. В связи с этим можно заключить, что метаболические механизмы функциональных проявлений лимфоцитов региональных лимфоузлов определяются изменением уровней не энергетических процессов, а прежде всего, обменных реакций, влияющих на рецепторные, пластические и антиоксидантные процессы.

Глава 8. Метаболизм клеток иммунной системы при инфекциях



Активность НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов у больных рецидивирующим герпесом

Иммунные реакции, особенно на уровне клеточного иммунитета, играют важную роль в патогенезе герпесвирусной инфекции [Исаков В.А. и др., 2006; Aubert M. et al., 2006; Diaz G.A. et al., 2006; Gorgian Mohammadi M. et al., 2009; Huilan Y. et al., 2010]. Изучение патогенеза заболевания является одним из условий успешной борьбы с инфекцией. Определение особенностей метаболизма лимфоцитов позволяет охарактеризовать их уровень реактивности [Робинсон М.В. и др., 1986; Савченко А.А., Смирнова С.В., 2001; Козлов В.А. и др., 2009; Савченко А.А. и др., 2011; Vyas S., Roberti I., 2011; Zhou H. et al., 2011].

Диагноз герпесвирусной инфекции устанавливался клинически на основании жалоб, анамнестических данных и характерных морфологических элементов высыпаний (локальная эритема, сгруппированные везикулы, эрозии, покрытые сероватым налетом, с тенденцией к слиянию). Диагноз подтверждался обнаружением специфических иммуноглобулинов класса М и наличием антигена вируса в мазках-отпечатках с поверхности эрозий.

Обнаружено, что у лиц с рецидивирующей герпесвирусной инфекцией (РГВИ), в отличие от здоровых обследованных, выявляется снижение активности оксидоредуктаз, определяющих интенсивность биоэнергетических процессов в лимфоцитах (табл. 31). Различия в активности исследуемых ферментов лимфоцитов крови у лиц контрольной группы и больных с РГВИ позволяют оценить физиологическое состояние клеток иммунной системы. Так, снижение уровня Г6ФДГ — ключевого фермента пентозофосфатного цикла — может привести к меньшему образованию НАДФН и рибозо-5-фосфата — важных компонентов для многих синтетических процессов (синтеза РНК, ДНК, липидов и др.) [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Гаврилюк Л.А. и др., 2011; Ozlü F. et al., 2011; Hamilton N.M. et al., 2012; Stanton R.C., 2012; Zhao G. et al., 2012]. О низкой интенсивности энергетических процессов в лимфоцитах герпесвирусных больных свидетельствует ингибирование активности Г3ФДГ — фермента, выполняющего двойную роль в клеточном метаболизме: во-первых, он участвует в митохондриальном водородном шунте, во-вторых, осуществляет перенос продуктов катаболизма липидов на гликолиз и глюконеогенез [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф.,

1998; Ishijima S. et al., 2008; Tsang W.Y. et al., 2008; Yeh J.I. et al., 2008; Kota V. et al., 2010; Saheki T. et al., 2011; de la Roche M. et al., 2012]. Снижение потока субстратов по гликолизу, вероятно, приведет к снижению содержания восстановленных пиридиновых нуклеотидов в цитоплазме. При этом ингибирование анаэробной и аэробной реакции ЛДГ, с одной стороны, свидетельствует о снижении возможности окисления цитоплазматического НАДН, что может вести к постоянному ингибированию гликолиза на уровне гексокиназы и фосфофруктокиназы, с другой — об ослаблении способности лимфоцитов у больных РГВИ метаболизировать эндогенный лактат при аэробном дыхании.

Таблица 31

Активность никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ (мкЕ) в лимфоцитах крови здоровых людей и больных рецидивирующей герпесвирусной инфекцией ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Контроль (n = 104)	Больные РГВИ (n = 71)	p
Г6ФДГ	8,43±0,83	0,32±0,05	<0,001
Г3ФДГ	0,97±0,15	0,05±0,01	<0,001
ЛДГ	35,76±3,66	15,98±1,96	<0,001
МДГ	118,63±13,31	20,51±2,41	<0,001
НАДФМДГ	5,04±0,61	22,10±2,21	<0,001
НАДФГДГ	0,82±0,12	0,73±0,15	
НАДГДГ	7,42±1,09	0,60±0,10	<0,001
НАДИЦДГ	11,49±2,55	1,32±0,21	<0,01
НАДФИДГ	42,37±7,16	21,18±3,25	<0,05
НАДН-ЛДГ	166,70±26,17	1,60±0,30	<0,001
НАДН-МДГ	278,89±33,88	6,93±0,94	<0,001
ГР	57,73±9,09	6,13±1,20	<0,001

Нарушение обмена веществ в цитоплазме может отражаться на внутримитохондриальных процессах. Так, значительное снижение активности НАДИЦДГ и МДГ (ферментов цикла Кребса), по-видимому, характеризуют более низкий уровень субстратного потока в митохондриальном цикле, который совместно со снижением уровня НАДН-зависимой реакции МДГ (ключевой фермент малат-аспаратного шунта) может обусловить функциональную недостаточность митохондрий. О депрессивном состоянии внутримитохондриальных процессов в лимфоцитах больных РГВИ дополнительно свидетельствует ингибирование реакций

НАДФДГ и НАДН-ГДГ (окислительного дезаминирования глутамата и восстановительного аминирования α -кетоглутарата соответственно).

Снижение активности НАДФИДГ, с одной стороны, наряду со сниженным уровнем НАДФН-ГДГ (реакция восстановительного аминирования 2-оксоглутарата), может обусловить недостаточное поступление субстратов в цикл Кребса, с другой — снижение интенсивности процессов биосинтеза липидов, для реализации которого необходим НАДФН. В частности, у больных герпесвирусной инфекцией наблюдается снижение активности ГР, которая осуществляет НАДФН-зависимое восстановление окисленного глутатиона.

Интересно отметить, что у больных РГВИ наблюдается повышение активности НАДФМДГ на фоне выявленной функциональной недостаточности лимфоцитов, проявляющейся в снижении уровня метаболических процессов. Однако увеличение активности НАДФМДГ не может компенсировать недостаточность пентозофосфатного пути, так как не образуется рибозо-5-фосфат, необходимый для синтеза макромолекулярных веществ. К тому же известно, что без активации ферментов пентозофосфатного цикла скорость реакции бласттрансформации снижается (Савченко А.А. и др., 2011; Rosa L.F. et al., 1993; De Azevedo R.B. et al., 1996).

Таким образом, изучение активности внутриклеточных ферментов позволило обнаружить снижение активности оксидоредуктаз, в значительной степени определяющих биоэнергетические возможности лимфоцитов. По-видимому, именно подобное состояние метаболизма лимфоцитов и определяет угнетение их функциональной активности. Предположено, что дефицит клеточного иммунитета при рецидивирующем ВПГ связан с некоторыми механизмами, которые на определенном этапе способствуют переходу от вирусоносительства к формированию тяжелой патологии. Изучение биохимических показателей, отражающих состояние внутриклеточного обмена веществ, а следовательно, и функциональную активность лимфоцитов крови у больных герпесвирусной инфекцией, может определять прогностическое значение в разработке методов реконвалесценции при данной патологии.

Исследованы уровни активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у больных РГВИ в зависимости от стадии заболевания. Выявленные различия в активности исследуемых ферментов лимфоцитов периферической крови у здоровых людей и лиц с РГВИ в периоды рецидива и ремиссии заболевания позволяют оценить метаболическое состояние лимфоцитов при данной патологии. Обнаружено, что в состоянии ремиссии у лиц с РГВИ снижены уровни ГЗФДГ, МДГ, НАДФГДГ, НАДИЦДГ и увеличена активность анаэробной реакции ЛДГ и ГР (табл. 32).

Активность никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ (мкЕ) в лимфоцитах крови больных рецидивирующей герпесвирусной инфекцией в периоды рецидива и ремиссии заболевания ($X \pm m$)

Показатель	Контроль (n = 104)	Больные РГВИ	
		Рецидив (n = 71)	Ремиссия (n = 16)
Г6ФДГ	8,43±0,83	0,32±0,05 $p_1 < 0,001$	0,35±0,08 $p_1 < 0,001$
ГЗФДГ	0,97±0,15	0,05 ± 0,01 $p_1 < 0,001$	0,005±0,002 $p_{1,2} < 0,05$
ЛДГ	35,76±3,66	15,98±1,96 $p_1 < 0,001$	12,84±4,32 $p_{1,2} < 0,01$
МДГ	118,63±13,31	20,51±2,41 $p_1 < 0,001$	5,83±1,43 $p_{1,2} < 0,01$
НАДФМДГ	5,04±0,61	22,10±2,21 $p_1 < 0,001$	5,69±1,69 $p_1 < 0,001$
НАДФГДГ	0,82±0,12	0,73±0,15	0,03±0,01 $p_{1,2} < 0,05$
НАДГДГ	7,42±1,09	0,60±0,10 $p_1 < 0,001$	0,38±0,13 $p_1 < 0,05$
НАДИЦДГ	11,49±2,55	1,32±0,21 $p_1 < 0,01$	0,59±0,21 $p_{1,2} < 0,05$
НАДФИЦДГ	42,37±7,16	21,18±3,25 $p_1 < 0,05$	13,07±3,82 $p_1 < 0,05$
НАДН-ЛДГ	166,70±26,17	1,60±0,30 $p_1 < 0,001$	5,43±2,15 $p_{1,2} < 0,01$
НАДН-МДГ	278,89±33,88	6,93±0,94 $p_1 < 0,001$	8,93±3,65 $p_1 < 0,01$
ГР	57,73±9,09	6,13±1,20 $p_1 < 0,001$	23,06±10,58 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$

Примечание: p_1 — статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p_2 — -/- с показателями больных с рецидивом РГВИ.

Снижение уровня МДГ и низкая активность НАДН-зависимой реакции малатдегидрогеназы у больных в период ремиссии заболевания свидетельствуют о менее эффективной работе малат-аспартатного челночного механизма, играющего важную роль в глюконеогенезе, а особенно в переносе оксалоацетата через митохондриальную мембрану. По-видимому, нарушение транспорта оксалоацетата может повлечь за собой сбой в обмене аминокислот, так как данный интермедиат относится к одной из трех важных кетокислот (пируват, 2-оксоглутарат и оксалоацетат), служащих акцептором NH_2 -групп в реакциях

переаминирования аминокислот. Кроме того, снижение активности МДГ, приводящее к образованию меньшего количества оксалоацетат в митохондриях, вероятно, может ограничивать количество субстрата, поступающего в цикл Кребса, тем самым снижая уровень интенсивности энергетического цикла.

Об эффективности работы цикла трикарбоновых кислот можно также судить по изменению уровней активности НАДИЦДГ, НАДФИЦДГ, НАДФГДГ и НАДГДГ. У лиц с РГВИ в период ремиссии заболевания наблюдается снижение уровня НАДИЦДГ, а активность НАДФИЦДГ практически не отличается от таковой у больных при рецидиве патологического процесса.

Еще один путь поступления субстратов в цикл Кребса — поступление 2-оксоглутарата, образующегося в результате расщепления ряда аминокислот: аргинина, гистидина, пролина, глутамина (при их окислении образуется глутамат) и глутамата. Глутамат под действием НАДГДГ превращается в 2-оксоглутарат. Этот фермент присутствует только в матриксе митохондрий и отвечает за большую часть аммиака, образующегося в животных тканях. Так как глутамат — единственная аминокислота, способная таким путем с большей скоростью отщеплять свою α -аминогруппу, то очевидна ее особая роль в обмене аминокрупп. Обнаружено, что уровень НАДГДГ в ремиссии заболевания практически не отличается от такового у лиц с РГВИ при рецидиве.

Один из путей обезвреживания аммиака — восстановительное аминирование, катализируемое НАДФГДГ с образованием глутамата. Наличие различных кофакторов, используемых глутаматдегидрогеназой (НАД и НАДФ) для отщепления и присоединения аммиака, обеспечивает независимую регуляцию дезаминирования глутамата и аминирования 2-оксоглутарата. Хотя вклад восстановительного аминирования в обезвреживание аммиака незначителен (для фермента требуется высокая концентрация 2-оксоглутарат), снижение уровня НАДФГДГ в лимфоцитах у лиц с рецидивом РГВИ свидетельствует о значительном снижении данного механизма связывания аммиака.

Следовательно, снижение уровней НАДИЦДГ, НАДФГДГ и низкая активность НАДГДГ и НАДИЦДГ в лимфоцитах больных в ремиссии РГВИ наряду со снижением скорости потока субстратов по циклу трикарбоновых кислот сопровождается угнетением дыхательных процессов в клетках, наблюдается характерное снижение как биосинтетических процессов, так и процессов обезвреживания аммиака.

Анализ полученных данных показал, что у лиц с РГВИ при ремиссии заболевания в лимфоцитах периферической крови снижаются интенсивность гликолиза, скорость цикла Кребса, дезактивируются глицеролфосфатный и малатаспартатный челночные механизмы и, как следствие этого, угнетается клеточное дыхание. Отмечено также, что в этот период заболевания характерна низкая реакция бласттрансформации лимфоцитов. Предполагается, что подобное

метаболическое состояние лимфоцитов определяет выраженное снижение их функциональной активности. Вместе с тем среди уровней некоторых (преимущественно цитозольных) ферментов, таких как НАДФМДГ и ГР лимфоцитов крови лиц при ремиссии РГВИ, наблюдается тенденция приближения к диапазону здоровых лиц.

По-видимому, результаты, регистрируемые в ходе данного исследования, характеризуют определенную стадию промежуточного процесса на пути к восстановлению реактивности лимфоцитов периферической крови. Кроме того, по ингибированию маркерных митохондриальных энзимов, таких как МДГ и НАДФГДГ, можно судить не только об ухудшении работы митохондриальной системы трансформации, но и о пониженной аккумуляции энергии в макроэргических связях АТФ.

Таким образом, в «микрופатогенезе» герпетической инфекции на клеточном уровне важное место занимает патологическое действие, которое оказывает весь процесс вирусной репродукции на клеточные мембраны, в том числе цитоплазматические и митохондриальные; при этом меняется их проницаемость, а вследствие этого — и транспорт веществ, регулирующих определенные звенья метаболизма. Особо важную роль играют митохондрии и их мембраны. Поскольку митохондрии обладают собственной ДНК и зависимой от нее системой синтеза РНК, они имеют все необходимое для автономного биосинтеза белка. Вполне естественно, что этот биосинтез, в нормальных условиях полностью согласованный с функцией клеточного генома, при систематическом нарушении функции митохондриальных мембран резко меняется и может служить источником патологических продуктов, репрессирующих или депрессирующих функциональную активность клеточной ДНК. Об этом свидетельствует низкая активность ГбФДГ у лиц с РГВИ.

Состояние уровней активности никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных острым вирусным гепатитом В при разной степени вирусной нагрузки

Доказано, что прогрессирование острого вирусного гепатита В (ОВГВ) зависит от продолжающейся репликации вируса в печени и состояния иммунной системы больного [Chen X. et al., 2008; Gujar S.A. et al., 2008; Schurich A. et al., 2011; Gu X.B. et al., 2012; Purvina M. et al., 2012]. Вирус не оказывает прямого цитопатического действия, лизис инфицированных гепатоцитов определяется иммунным ответом хозяина [Mansour-Ghanaei F. et al., 2012; Murata M. et al., 2012; Xia Y.J. et al., 2012; Yang W.B. et al., 2012]. Недостаточность лизиса инфицированных вирусом гепатоцитов объясняется различными механизмами, она может быть связана с усиленной супрессорной Т-клеточной функцией, дефектом цитотоксических лимфоцитов, увеличенным уровнем апоптоза специфических

Т-лимфоцитов, наличием блокирующих антител на клеточной мембране, а также недостатком синтеза цитокинов. При этом только на основе знания механизмов, приводящих к различным изменениям иммунореактивности, возможны совершенствование диагностики и разработка адекватных методов терапии. Одним из перспективных направлений, позволяющих охарактеризовать патогенез нарушения реактивности иммунной системы при инфекционном процессе, является изучение метаболизма клеток иммунной системы. На сегодняшний день установлено, что функциональные проявления лимфоцитов, например такие, как дифференцировка, пролиферация, синтез рецепторов и цитокинов, осуществляются только при соответствующем изменении их метаболизма [Робинсон М.В. и др., 1986; Савченко А.А., Смирнова С.В., 2001; Козлов В.А. и др., 2009; Савченко А.А. и др., 2011; Vyas S., Roberti I., 2011; Zhou H. et al., 2011]. Можно предположить, что изменения в системе внутриклеточного метаболизма лимфоцитов при ОВГВ будут зависеть от степени вирусной нагрузки.

Диагноз ОВГВ устанавливался при помощи стандартных клинико-биохимических методов и верифицировался обнаружением с помощью иммуноферментных методов специфических маркеров — НВsAg, НВеAg, специфических иммуноглобулинов G и M к НВсAg, общих антител к НВеAg и вирусной ДНК. Из обследования исключались лица, инфицированные другими вирусами гепатитов и вирусом иммунодефицита человека. ДНК вируса гепатита В (ВГВ) выявляли методом полимеразной цепной реакции с использованием флуоресцентно-меченых гибридизационных зондов («ДНК-технология», Москва).

При обследовании больных ОВГВ установлено, что содержание ДНК ВГВ в сыворотке крови характеризуется следующими статистическими характеристиками: $Me = 3,40 \times 10^4$ копий ДНК/мл, $S_{25} = 1,90 \times 10^3$ копий ДНК/мл, $S_{75} = 5,25 \times 10^5$ копий ДНК/мл, минимальное содержание = 0 копий ДНК/мл, максимальное = $1,44 \times 10^{10}$ копий ДНК/мл. Обнаружено, что уровень содержания вирусной ДНК в сыворотке крови взаимосвязан с активностью НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови. Выявлена отрицательная взаимосвязь с активностью НАДИЦДГ ($r = -0,28$, $p = 0,042$) и положительные корреляционные связи с уровнями ГР ($r = 0,39$, $p = 0,008$), НАДН-ГДГ ($r = 0,33$, $p = 0,033$) и НАДФН-ГДГ ($r = 0,32$, $p = 0,029$). Активность НАДИЦДГ характеризует интенсивность субстратного потока на начальных этапах цикла трикарбоновых кислот, в значительной степени определяющего уровень аэробной энергетики. Следовательно, с увеличением количества ДНК в сыворотке крови больных ОВГВ может снижаться интенсивность аэробного дыхания. Возможно, что положительные взаимосвязи между количеством ДНК ВГВ и уровнями активности НАДН-ГДГ и НАДФН-ГДГ и определяют компенсаторные реакции внутриклеточного метаболизма, стимулируя субстратный поток по циклу Кребса продуктами аминокислотного обмена [Stanley C.A., 2004; Li M. et al., 2011; McKenna M.C., 2011;

Spanaki C., Plaitakis A., 2012]. ГР — фермент глутатион-зависимой антиоксидантной системы [Сафонова О.А. и др., 2011; Ефременко Е.С. и др., 2012; Waggiallah H., Alzohairy M., 2011; Djukic M.M. et al., 2012; Niedźwiedz A. et al., 2012; Yan J. et al., 2012]. В связи с наличием положительной взаимосвязи можно предположить, что с увеличением количества вирусной ДНК в сыворотке у больных ОВГВ повышается уровень перекисных процессов.

Исходя из распределения количества ДНК ВГВ, мы разделили всех больных ОВГВ на три подгруппы: с низкой степенью вирусной нагрузки (ниже уровня, соответствующего величине C_{25}), со средней степенью вирусной нагрузки (лица с интерквартильным размахом ДНК ОВГВ: C_{25} – C_{75}) и с высокой степенью вирусной нагрузки (выше уровня, соответствующего значению C_{75}). Показатели количества ДНК ВГВ в сыворотке крови у больных ОВГВ в зависимости от степени вирусной нагрузки представлены в табл. 33.

Таблица 33

Количество молекул ДНК вирусного гепатита В в сыворотке крови больных острым вирусным гепатитом в зависимости от степени вирусной нагрузки (Me, C_{25} – C_{75})

Группы больных ОВГВ		ДНК ВГВ, копий ДНК/мл	p
1. Низкая степень вирусной нагрузки (n=19)	Me	$0,00 \times 10^0$	
	C_{25} – C_{75}	$0,00 \times 10^0$ – $1,00 \times 10^3$	
2. Средняя степень вирусной нагрузки (n=38)	Me	$3,40 \times 10^4$	$p_1 < 0,001$
	C_{25} – C_{75}	$7,00 \times 10^3$ – $2,30 \times 10^5$	
3. Высокая степень вирусной нагрузки (n=19)	Me	$4,50 \times 10^7$	$p_{1,2} < 0,001$
	C_{25} – C_{75}	$5,80 \times 10^6$ – $3,50 \times 10^9$	

Примечание: p_1 — статистически достоверные различия с группой больных острым вирусным гепатитом В с низкой степенью вирусной нагрузки; p_2 — статистически достоверные различия с группой больных острым вирусным гепатитом В со средней степенью вирусной нагрузки.

При исследовании уровней активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных ОВГВ в зависимости от степени вирусной нагрузки установлено, что при низком содержании ДНК ВГВ в клетках понижается активность МДГ, НАДН-ЛДГ, НАДН-МДГ и НАДН-ГДГ (рис. 83 и 84).

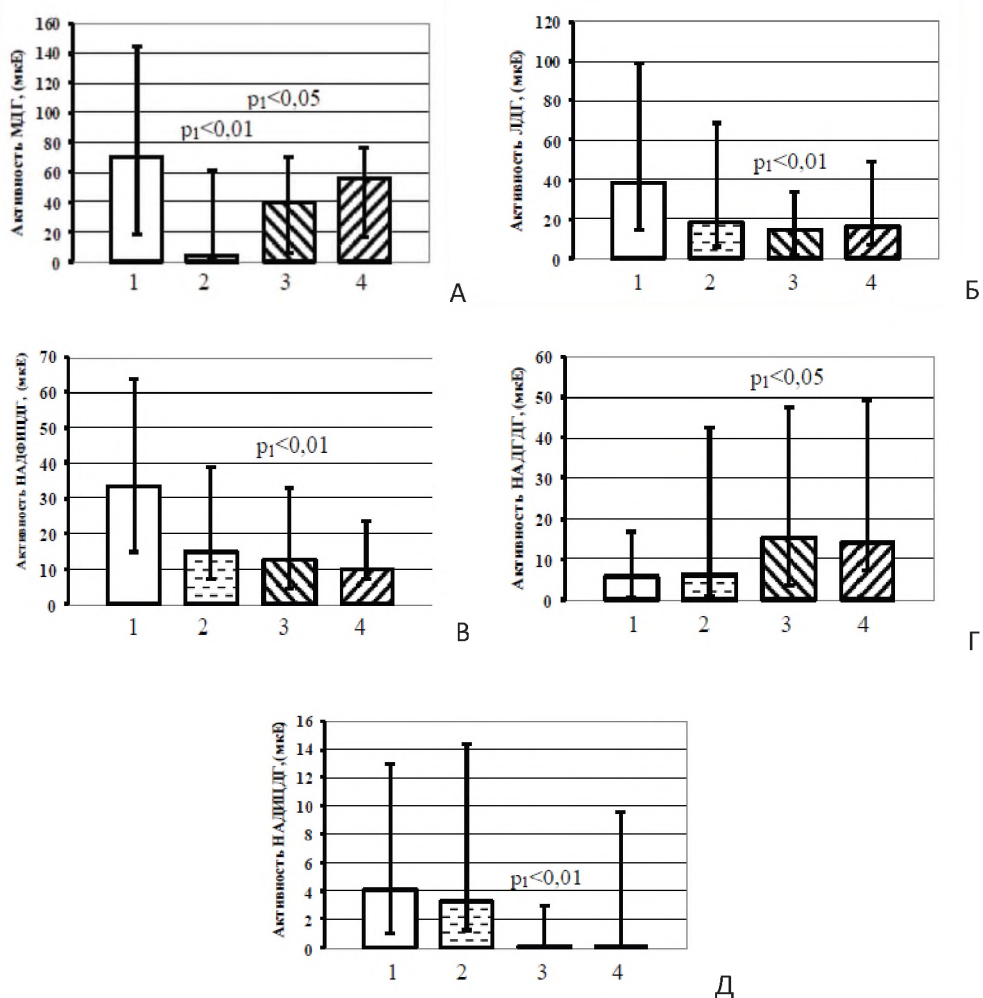


Рис. 83. Особенность уровней активности никотинамидадениндинуклеотид- и никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных острым вирусным гепатитом В в зависимости от степени вирусной нагрузки: 1 — лица контрольной группы; 2 — больные острым вирусным гепатитом В с низкой степенью вирусной нагрузки; 3 — больные острым вирусным гепатитом В со средней степенью вирусной нагрузки; 4 — больные острым вирусным гепатитом В с высокой степенью вирусной нагрузки

При средней степени вирусной нагрузки у больных ОВГВ в лимфоцитах крови относительно контрольного уровня понижается активность ЛДГ, НАДФИЦДГ, МДГ, НАДИЦДГ, НАДН-ЛДГ, НАДН-МДГ и НАДН-ГДГ. Обнаружено, что у больных данной подгруппы относительно контрольного диапазона повышается активность НАДГДГ. Как относительно контрольного диапазона, так и уровня, выявленного при низкой вирусной нагрузке, повышается

активность НАДФН-ГДГ. Только относительно активности, выявленной при низкой вирусной нагрузке, у больных со средней степенью вирусной нагрузки увеличивается активность ГР (см. рис. 84). У больных с высокой степенью вирусной нагрузки снижается активность НАДН-ЛДГ. Только относительно уровня, выявленного при низкой вирусной нагрузке, у больных с высокой степенью вирусной нагрузки повышается активность НАДН-ГДГ и ГР. Как относительно контрольного диапазона, так и уровня, выявленного при низком содержании ДНК ВГВ, у больных ОВГВ с высокой степенью вирусной нагрузки повышается активность НАДФН-ГДГ.

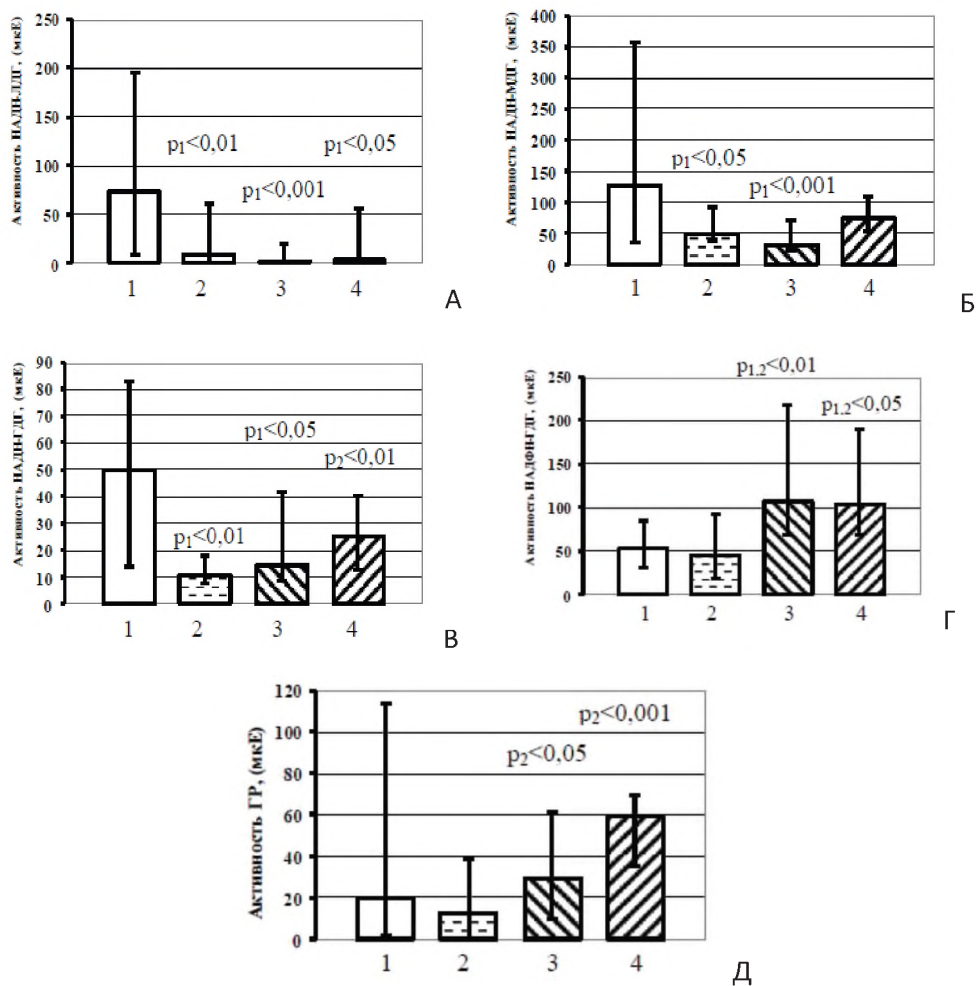


Рис. 84. Особенность уровней активности никотинамидадениндинуклеотид- и никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных острым вирусным гепатитом В в зависимости от степени вирусной нагрузки: (обозначения см. рис. 72)

Исследуемые ферменты занимают ключевые позиции на разных метаболических путях клетки. Так, снижение активности анаэробной реакции ЛДГ и НАДН-зависимой реакции МДГ в лимфоцитах крови больных ОВГВ с низким содержанием ДНК ВГВ в сыворотке крови может осуществляться за счет низкой активности анаэробного окисления глюкозы и, соответственно, пониженного уровня наработки НАДН в гликолизе. Пониженная наработка пирувата в гликолизе может привести к снижению интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот, что выявляется через резко сниженную активность МДГ. В то же время пониженная активность НАДН-ГДГ — фермента, который осуществляет НАД-зависимый перенос субстратов с цикла Кребса на реакции аминокислотного обмена, определяет наличие компенсаторных процессов, направленных на поддержание уровня интенсивности аэробной энергетики.

Значительно более выраженные изменения в системе внутриклеточного метаболизма лимфоцитов крови выявляются у больных ОВГВ со средней степенью вирусной нагрузки. У больных данной подгруппы сохраняется сниженный уровень активности анаэробной реакции ЛДГ и НАДН-зависимой реакции МДГ. Однако сниженная наработка пирувата в гликолизе также сопровождается понижением активности аэробной реакции ЛДГ, что может значительно ингибировать субстратный поток по лимонному циклу. Действительно, у больных ОВГВ со средней степенью вирусной нагрузки сниженные уровни активности НАДИЦДГ и МДГ характеризуют функциональную недостаточность цикла Кребса. Причем пониженный уровень НАДФИЦДГ — вспомогательной дегидрогеназной реакции — также характеризует субстратную недостаточность цикла трикарбоновых кислот. При этом в системе внутриклеточного метаболизма лимфоцитов у больных со средней степенью вирусной нагрузки выявляются компенсаторные реакции, направленные на поддержание метаболических процессов, определяющих уровень аэробного дыхания. Так, повышение активности НАДГДГ и снижение уровня НАДН-ГДГ определяет, соответственно, увеличение притока субстратов и понижение уровня оттока на реакции аминокислотного обмена.

При высокой степени вирусной нагрузки в лимфоцитах крови у больных ОВГВ выявляются минимальные изменения со стороны внутриклеточного метаболизма. Так же как и при низком и среднем содержании ДНК ВГВ в сыворотке крови, у больных с высокой степенью вирусной нагрузки обнаружено понижение активности анаэробной реакции ЛДГ. Однако изменений активности исследуемых дегидрогеназ цикла трикарбоновых кислот не установлено, что позволяет предположить соответствующий контрольному диапазону уровень аэробных дыхания. При этом усиливается НАДН- и НАДФН-зависимый отток субстратов с цикла Кребса на реакции аминокислотного обмена.

Необходимо отметить, что у больных со средней и высокой степенью вирусной нагрузки в лимфоцитах крови повышена активность ГР относительно уровня, выявленного у больных с низким содержанием вирусной ДНК в сыворотке крови, что отражает более высокий уровень протекания перекисных процессов. Кроме того, только у лиц данных подгрупп в лимфоцитах крови повышена активность НАДФН-ГДГ, что характеризует активацию НАДФН-зависимого оттока субстратов цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена.

Только у больных ОВГВ со средней и высокой степенью вирусной нагрузки выявляется взаимосвязь активности исследуемых оксидоредуктаз лимфоцитов с уровнем содержания вирусной ДНК в сыворотке крови. У больных со средней степенью вирусной нагрузки содержание вирусной ДНК отрицательно взаимосвязана с уровнем активности НАДИЦДГ в лимфоцитах крови ($r = -0,38$, $p = 0,029$). Необходимо отметить, что данная взаимосвязь выявлена на полной группе больных ОВГВ. У больных с высокой степенью вирусной нагрузки уровень сывороточного содержания ДНК ВГВ также отрицательно взаимосвязан с активностью НАДФМДГ ($r = -0,64$, $p = 0,011$). Известно, что НАДФМДГ является ключевым ферментом липидного анаболизма [Куо С.С. et al., 2008; Xu J. et al., 2008; Fu Z.Y. et al., 2009; Hsieh J.Y. et al., 2009]. Следовательно, у больных с высокой степенью вирусной нагрузки при повышении уровня содержания вирусной ДНК в сыворотке крови в лимфоцитах снижается интенсивность анаболизма липидов.

Таким образом, исследована зависимость уровней активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных ОВГВ в зависимости от степени вирусной нагрузки. Установлено, что уже при низком уровне содержания вирусной ДНК в сыворотке крови в лимфоцитах крови снижается интенсивность метаболических реакций, определяющих активность анаэробных и аэробных процессов. При средней степени вирусной нагрузки выявляется наиболее выраженное изменение метаболических реакций, определяющих недостаточность энергетических процессов, при высокой обнаружен наименьший уровень изменения активности исследуемых дегидрогеназ в лимфоцитах крови. У больных данной группы установлено снижение интенсивности анаэробного окисления глюкозы и повышение оттока субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена при относительном увеличении активности ГР. Только при средней и высокой степени вирусной нагрузки выявляется наличие корреляционных взаимосвязей между уровнем содержания вирусной ДНК в сыворотке крови и активностью некоторых из исследуемых оксидоредуктаз лимфоцитов, что отражает увеличение степени недостаточности энергетических и анаболических реакций при высоком уровне содержания ДНК ВГВ.

Метаболизм лимфоцитов при распространенном гнойном перитоните

Лечение распространенного гнойного перитонита (РГП) и в настоящее время остается одной из самых актуальных проблем неотложной хирургии. Это связано с большим количеством больных с РГП, высокой частотой послеоперационных осложнений и летальностью, достигающей 50% и более при развитии полиорганной недостаточности (ПОН) и септического шока [Винник Ю.С., Здзитовецкий Д.Э., 2011; Здзитовецкий Д.Э. и др., 2012; Суковатых Б.С. и др., 2012]. Большое значение при планировании комплекса лечебных мероприятий у больных РГП имеет прогноз течения и исхода заболевания. Во многом он зависит от характера происходящих изменений в системе иммунитета [Косинец В.А., 2012; Савченко А.А. и др., 2012; Kiank C. et al., 2007; Griveas I. et al., 2009; Takano T. et al., 2009]. Тяжелая дисфункция иммунной системы у пациентов с РГП является не просто ранним и надежным признаком развивающейся ПОН, а во многом обеспечивает ее возникновение и последующее прогрессирование. Учитывая высокую информативность метаболических показателей для характеристики функционального состояния клеток иммунной системы, исследование метаболических параметров позволяет улучшить диагностику иммунных нарушений, оценить прогноз течения заболевания и правильно выбрать хирургическую тактику и объем интенсивной терапии.

Под нашим наблюдением находились 50 больных с РГП (22 мужчин и 28 женщин) внебольничного и госпитального происхождения, проходивших лечение в отделении гнойной хирургии и отделении реанимации и интенсивной терапии МУЗ «ГБСМП им. Н.С. Карповича» г. Красноярск. Средний возраст больных составил $54,2 \pm 19,2$ года. Из исследования были исключены больные, у которых РГП был осложнением панкреонекроза, неоперабельных онкологических заболеваний органов брюшной области и неоперабельного нарушения мезентериального кровообращения. Исходную степень тяжести больных определяли по шкале SAPSII [Le Gall J.-R. et al., 1993]. Тяжесть РГП исходно определяли по Мангеймскому индексу перитонита (МИП) и индексу брюшной полости (ИБП) [Linder M.M. et al., 1987]. Наличие и степень выраженности ПОН исходно и в динамике определяли по шкале SOFA [Vincent J.L. et al., 1996]. При оценке тяжести синдрома системной воспалительной реакции (ССВР) мы придерживались критериев ACCP/SCCM [Bone R.S. et al., 1992].

При исследовании уровней активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов у больных РГП обнаружено, что только при средней степени тяжести статистически достоверно снижается активность Г6ФДГ. Активность НАДФГДГ в лимфоцитах больных снижена относительно контрольных показателей независимо от степени тяжести, но при тяжелой степени РГП более выражено, в том числе и относительно уровней, выявленных при средней степени тяжести заболевания (рис. 85). Независимо от степени тяжести заболевания в лимфоцитах больных РГП относительно контрольных значений понижена активность НАДФМДГ, НАДФИЦДГ, ГР и НАДФН-ГДГ (см. рис. 85).

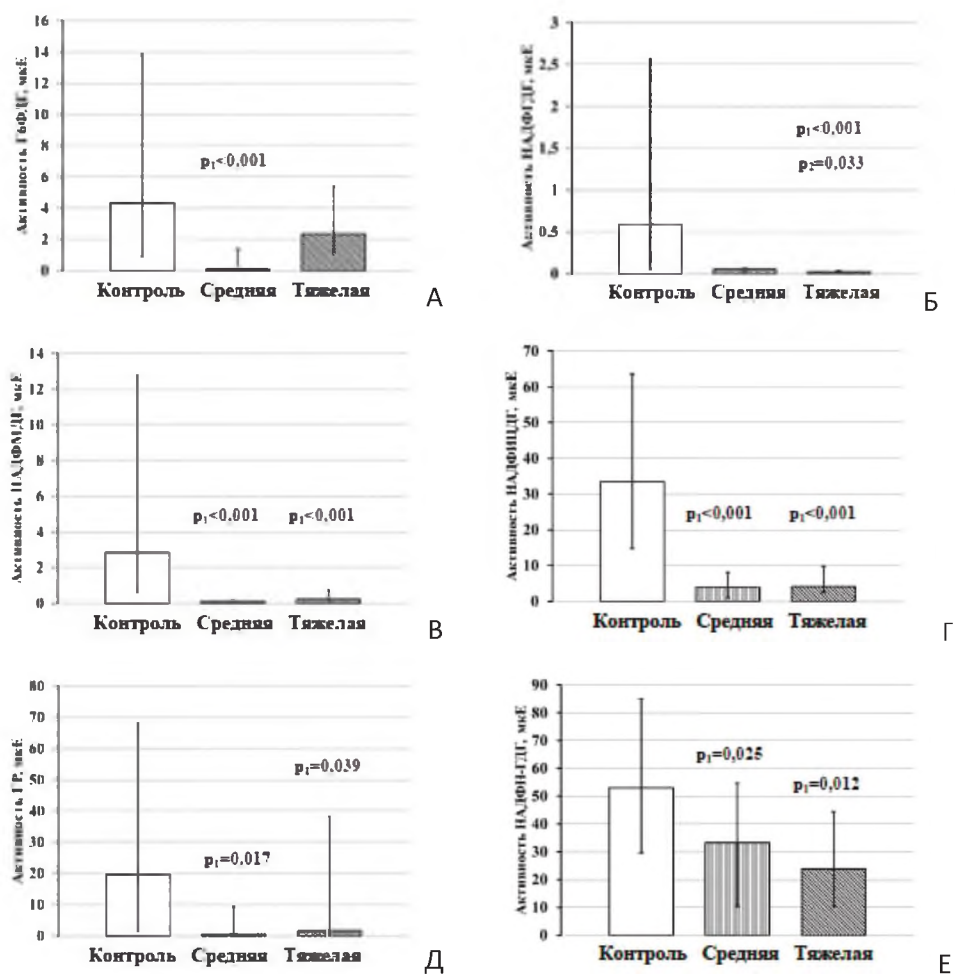


Рис. 85. Уровни активности никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от степени тяжести заболевания: p_1 — статистически достоверные различия с контрольными значениями; p_2 — // — с показателями больных со средней степенью тяжести

Активность ЛДГ в лимфоцитах крови снижена относительно контрольного уровня только у больных со средней степенью тяжести РГП, ГЗФДГ повышена у больных обеих групп, МДГ и НАДФДГ понижена независимо от тяжести заболевания (рис. 86). Уровни активности НАДН-зависимых реакций ЛДГ, МДГ и НАДФДГ также снижены в лимфоцитах крови больных РГП независимо от тяжести заболевания (рис. 87).

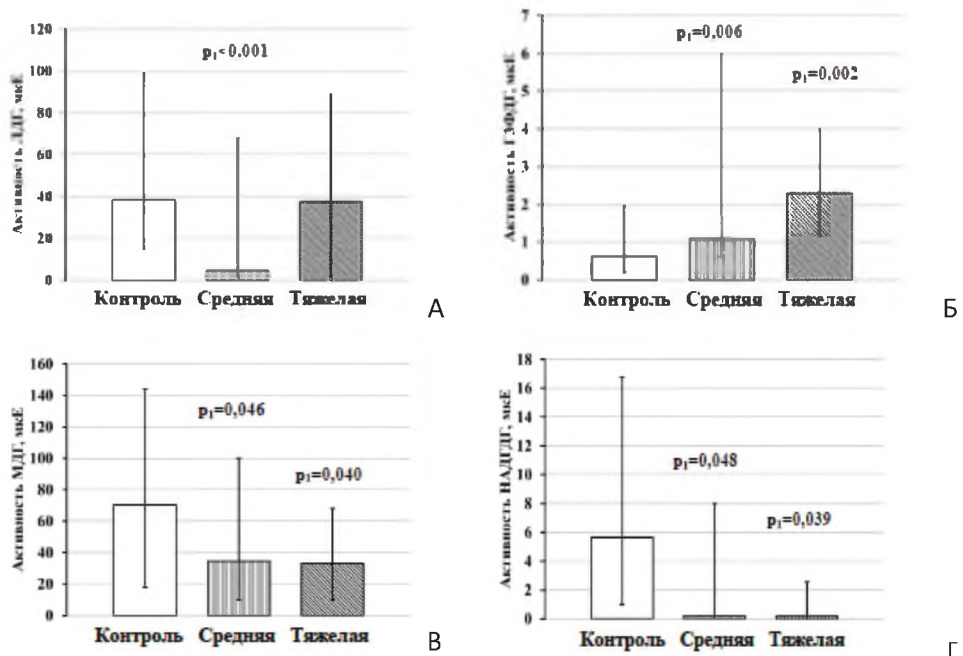


Рис. 86. Уровни активности никотинамидадениндинуклеотид-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от степени тяжести заболевания: p_1 — статистически достоверные различия с контрольными значениями; p_2 — +/- с показателями больных со средней степенью тяжести

С помощью корреляционного анализа обнаружено, что единственная взаимосвязь между уровнями активности внутриклеточных ферментов и клиническими показателями тяжести выявляется только у больных с тяжелой степенью тяжести РПП: активность НАДН-ГДГ с МИП ($r = 0,63$, $p = 0,028$).

Исследуемые ферменты занимают ключевые позиции на разных метаболических путях клетки, характеризуя основные обменные процессы и тем самым определяя функциональные возможности клеток. Так, независимое от степени тяжести РПП снижение активности НАДН-зависимой реакции ЛДГ характеризует ингибирование субстратного потока на терминальной стадии анаэробного гликолиза и в целом определяет недостаточность анаэробного дыхания лимфоцитов крови у больных РПП. При этом повышение активности ГЗФДГ — фермента, который характеризует интенсивность липидного катаболизма и осуществляет перенос его продуктов на окислительно-восстановительные реакции гликолиза, не компенсирует низкий уровень субстратного потока по анаэробному гликолизу.

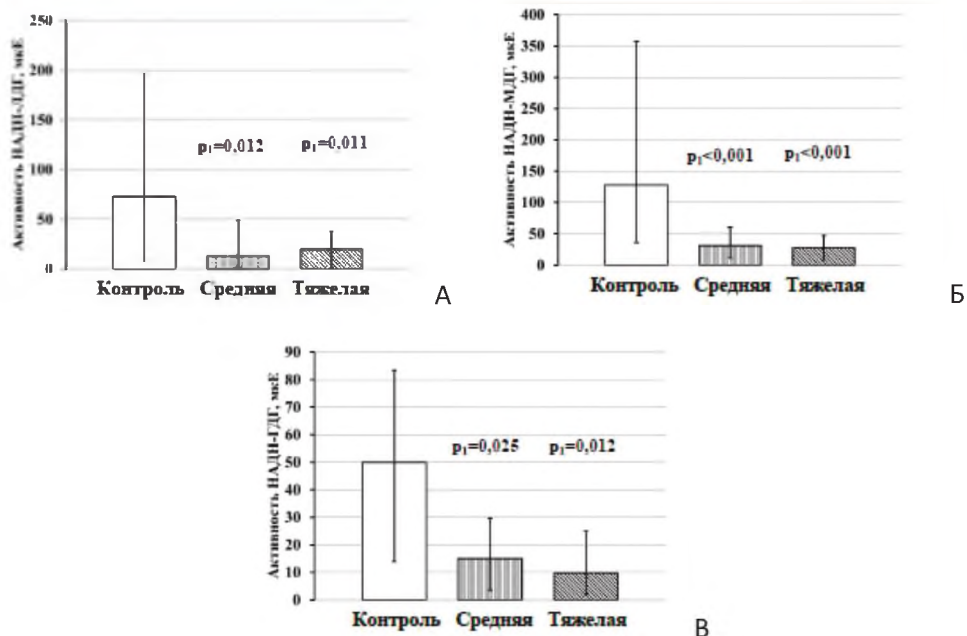


Рис. 87. Уровни активности никотинамидадениндинуклеотид-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от степени тяжести заболевания: p_1 — статистически достоверные различия с контрольными значениями; p_2 — -//- с показателями больных со средней степенью тяжести

Малик-фермент (НАДФМДГ) — ключевой в системе липидного анаболизма — через восстановление НАДФ+ принимает участие в реакциях катаболизма ксенобиотиков и осуществляет шунтирование медленных реакций цикла трикарбоновых кислот [Kuo C.C. et al., 2008; Xu J. et al., 2008; Fu Z.Y. et al., 2009; Hsieh J.Y. et al., 2009]. Снижение активности данного фермента в лимфоцитах больных РГП характеризует недостаточность данных процессов. Кроме того, недостаточность реакций восстановления НАДФ+ в цитоплазматическом компартменте лимфоцитов также влияет на активность ГР, которая у больных РГП снижена. Фермент осуществляет восстановление глутатиона за счет окисления НАДФН, что определяет его функциональную важность в реакциях глутатион-зависимой антиоксидантной системы [Сафонова О.А. и др., 2011; Ефременко Е.С. и др., 2012; Waggiallah H., Alzohairy M., 2011; Djukic M.M. et al., 2012; Niedźwiedz A. et al., 2012; Yan J. et al., 2012].

Характерной особенностью метаболизма лимфоцитов у больных со средней степенью тяжести РГП является снижение активности ГбФДГ — ключевого и инициализирующего фермента пентозофосфатного цикла [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Гаврилюк Л.А. и др., 2011; Ozlü F. et al., 2011; Hamilton N.M. et

al., 2012; Stanton R.C., 2012; Zhao G. et al., 2012]. Продукты пентозофосфатного цикла используются в широком спектре реакций макромолекулярного синтеза (синтез РНК и ДНК, коферментный обмен, синтез углеводной составляющей гликопротеидов и гликолипидов и т.д.). Кроме того, НАДФН, синтезируемый в реакциях окислительно-восстановительной стадии пентозофосфатного цикла, также используется при восстановлении окисленного глутатиона [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Ninfali P. et al., 1996; Bülbül M., Erat M., 2008; Tandogan B. et al., 2011]. Другая характерная особенность метаболизма лимфоцитов у больных со средней степенью тяжести РГП — низкая активность аэробной реакции ЛДГ, осуществляющей субстратное стимулирование цикла трикарбоновых кислот.

Необходимо отметить, что лимфоциты — это аэробные клетки и интенсивность кислород-зависимого дыхания влияет как на физиологическое состояние клеток, так и на уровень их реактивности [Савченко А.А. и др., 2011; Szabò I. et al., 2005]. Одним из исследуемых ферментов цикла трикарбоновых кислот является МДГ, характеризующая интенсивность субстратного потока на завершающей стадии цикла Кребса [Matsuda T. et al., 2010; Pérez A. et al., 2010; Wang Q. et al., 2010; Shi Q., Gibson G.E., 2011]. Активность фермента в лимфоцитах снижена независимо от степени тяжести РГП. Кроме того, у НАДГДГ и НАДФГДГ (ферменты, осуществляющие приток интермедиатов на энергетические процессы за счет реакций аминокислотного обмена) она также снижена. Причем у больных с тяжелой степенью РГП она минимальна у НАДФГДГ. При этом отмечается и ингибирование НАДН- и НАДФН-зависимых реакций глутаматдегидрогеназ. Подобное состояние активности глутаматдегидрогеназ характеризует снижение ключевых реакций обмена азота в лимфоцитах крови больных РГП и понижение субстратного взаимодействия между энергетическими процессами и реакциями аминокислотного обмена.

Известно, что функционирование дыхательной цепи митохондрий зависит от уровня водородного градиента. НАДН-зависимая реакция МДГ является ключевой в системе малат-аспартатного шунта митохондрий [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Magori E. et al., 2005; Mali Y., Zisapel N., 2009]. Снижение активности данной реакции позволяет определить понижение активности аэробного дыхания лимфоцитов у больных РГП, которое развивается за счет как низкого уровня метаболических процессов в митохондриях, так и снижения водородного градиента.

Таким образом, независимо от степени тяжести РГП в лимфоцитах периферической крови снижены интенсивность анаэробного и аэробного дыхания, реактивность глутатион-зависимой антиоксидантной системы, а также уровень липидного анаболизма и субстратного взаимодействия между циклом трикарбоновых кислот и реакциями аминокислотного обмена. При средней степени

тяжести РГП выявляется более выраженная реакция метаболизма лимфоцитов крови, характеризующаяся ингибированием ключевой и инициализирующей реакции пентозофосфатного цикла и аэробной реакции ЛДГ. В то же время при тяжелой степени тяжести РГП в лимфоцитах крови выявляется более выраженное снижение активности НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназной реакции.

Хемилюминесцентная и энзиматическая активность нейтрофильных гранулоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом

Нейтрофильные гранулоциты представляют собой высокореактивное звено в иммунной системе. Они первыми мобилизуются в очаг воспаления, от их фагоцитарной активности во многом зависит эффективность противомикробной защиты организма [Мечников И.И., 1901, 1947; Цинкернагель Р., 2008; Козлов В.А. и др., 2009]. Воспринимая многочисленные сигналы о дестабилизации внутренней среды, нейтрофилы модулируют свои функции, нацеленные на ее восстановление. Активированные нейтрофилы сами становятся мощными эффекторами пусковых и регуляторных механизмов каскадных реакций, обеспечивающих развитие воспаления. Это связано с тем, что нейтрофильные гранулоциты способны не только в качестве эффекторов продуцировать цитотоксические молекулы, но и как регуляторные клетки синтезировать широкий спектр различных цитокинов [Козлов В.А. и др., 2009; Ярилин А.А., 2010; Черешнев В.А., Шмагель К.В., 2011; Mariscalco M.M., 2011].

Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов характеризует состояние «респираторного взрыва», который развивается при взаимодействии клеток с объектами фагоцитоза [Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В., 2009; Куртасова Л.М. и др., 2009]. Обсуждается значение синтеза ряда активных форм кислорода в системе внешнего киллинга [Куртасова Л.М. и др., 2009; Benbarek H. et al., 2012]. «Респираторный взрыв» относится к серии метаболических процессов, активность которых изменяется при стимуляции нейтрофилов: увеличение потребления кислорода и усиление окисления глюкозы в пентозофосфатном цикле [Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В., 2009; Куртасова Л.М. и др., 2009]. Однако зависимость интенсивности «респираторного взрыва» нейтрофильных гранулоцитов от основных ферментативных реакций, определяющих энергетическое и пластическое состояние клеток, до сих пор не исследована. В то же время у больных РГП развивается мощная воспалительная реакция, эффективность которой во многом определяет тяжесть течения и исход заболевания. Изучение метаболических механизмов функционирования нейтрофильных гранулоцитов позволит получить те внутриклеточные мишени, при воздействии на которые можно модулировать уровень реактивности клеток.

При исследовании активности люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов обнаружено, что только у больных с

благоприятным исходом РГП повышается максимальная интенсивность спонтанной хемилюминесценции (табл. 34). Независимо от исхода заболевания при перитоните снижено время выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции и повышен максимум интенсивности зимозан-индуцированной хемилюминесценции. При благоприятном исходе заболевания снижен индекс активации по люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов.

Таблица 34

Люцигенин-зависимая хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов в зависимости от исхода распространенного гнойного перитонита (Me, C₂₅–C₇₅)

Показатели	Контроль (n=135)		Благоприятный (n=28)		Неблагоприятный (n=22)	
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅
Спонтанная хемилюминесценция						
T _{max} , с.	2718	2010–3791	1789	1193–2518	2108	1655–2531
			p ₁ =0,002		p ₁ =0,024	
I _{max} , о.е. × 10 ³	5,68	2,55–14,06	24,09	10,70–57,91	10,73	2,68–21,09
			p ₁ =0,001			
S, о.е. × с. × 10 ⁶	2,28	0,96–5,85	2,25	1,40–6,00	1,79	1,75–2,61
Зимозан-индуцированная хемилюминесценция						
T _{max} , с.	2064	1676–2722	2110	1401–2349	2164	1027–2559
I _{max} , о.е. × 10 ³	12,87	7,83–27,64	23,58	15,56–35,91	24,14	15,51–32,11
			p ₁ =0,017		p ₁ =0,048	
S, о.е. × с. × 10 ⁶	4,53	2,52–8,22	2,77	2,03–8,74	2,77	1,93–4,44
Синд./Спонт.	2,04	1,20–3,60	1,50	0,89–2,09	2,38	1,29–7,39
			p ₁ =0,048		p ₂ =0,047	

Примечание: статистически достоверные различия с показателями:

p₁ — контрольной группы; p₂ — больных с благоприятным исходом РГП.

Известно, что люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием супероксид-радикала, который определяется как первичная активная форма кислорода и синтезируется в системе НАДФН-оксидазы [Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В., 2009; Куртасова Л.М. и др., 2009; Benbarek H. et al., 2012]. Следовательно, исследование люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов позволяет охарактеризовать состояние активности НАДФН-оксидазы в нейтрофильных гранулоцитах у больных РГП. Можно заключить, что у больных с благоприятным исходом РГП у НАДФН-оксидазы уже в состоянии относительного покоя нейтрофильных гранулоцитов она повышена, в то же время при дополнительной индукции «респираторного взрыва» с помощью опсонизированного зимозана повышена как при благоприятном, так и при неблагоприятном исходе РГП. Однако снижение величины индекса

активации при благоприятном исходе РГП определяет относительную недостаточность повышения интенсивности зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции.

Время выхода на максимум характеризует скорость развития «дыхательного взрыва» в случае регуляторного или антигенного воздействия на клетку. Спонтанная хемилюминесцентная реакция развивается за счет регуляторного влияния оптимизации температуры на метаболизм нейтрофильных гранулоцитов. Сокращение времени выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции при РГП характеризует способность метаболической системы клеток к высокому уровню продукции супероксид-радикала. Отсутствие аналогичных изменений при дополнительной антигенной стимуляции клеток (зимозан-индуцированная хемилюминесценция) отражает предел в скорости активации НАДФН-оксидазы, который определяется метаболическими резервами клеток.

Цитотоксическая активность нейтрофильных гранулоцитов определяется уровнем продукции как первичных, так и вторичных активных форм (гидроксильный радикал, перекись водорода и др.) кислорода. В формировании пула вторичных форм кислорода в нейтрофильных гранулоцитах принимают участие такие ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза, миелопероксидаза и др. [Куртасова Л.М. и др., 2009; Benbarek H. et al., 2012]. Люминол способен вступать в хемилюминесцентную реакцию и с первичными, и с вторичными активными формами кислорода [Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В., 2009]. При исследовании интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов обнаружено, что независимо от исхода РГП у больных повышается максимум интенсивности спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции (табл. 35). При этом более выраженное повышение интенсивности стимулированной хемилюминесценции определяет увеличение индекса активации нейтрофильных гранулоцитов. Следовательно, у больных РГП независимо от исхода заболевания уровень синтеза вторичных активных форм кислорода повышен как в состоянии относительного покоя нейтрофильных гранулоцитов, так и при дополнительной индукции «респираторного взрыва» с помощью опсонизированного зимозана. Повышенный индекс активации характеризует наличие метаболических резервов для функциональной активации нейтрофилов.

Исследование уровней активности НАД- и НАДН-зависимых дегидрогеназ нейтрофильных гранулоцитов позволило установить, что только при неблагоприятном исходе заболевания в клетках повышена активность НАДИЦДГ и НАДН-ЛДГ (рис. 88). Независимо от исхода РГП в нейтрофильных гранулоцитах больных снижена активность ЛДГ и повышена активность НАДН-МДГ и НАДН-ГДГ (см. рис. 88). При исследовании уровней активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ обнаружено, что независимо от исхода РГП в нейтрофильных

Таблица 35

**Люминол-зависимая хемилюминесцентная активность
нейтрофильных гранулоцитов в зависимости от исхода распространенного
гнойного перитонита (Ме, С₂₅–С₇₅)**

Показатели	Контроль (n=135)		Благоприятный (n=28)		Неблагоприятный (n=22)	
	Ме	С ₂₅ –С ₇₅	Ме	С ₂₅ –С ₇₅	Ме	С ₂₅ –С ₇₅
Спонтанная хемилюминесценция						
Т _{max} , с.	981	615–1531	1102	884–1192	1157	951–1325
l _{max} , о.е. × 10 ³	7,59	3,05–15,58	29,37	14,46–43,13	30,90	19,04–38,46
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	
S, о.е. × с. × 10 ⁶	2,18	1,09–5,60	3,01	1,73–5,78	3,17	2,21–7,74
Зимозан-индуцированная хемилюминесценция						
Т _{max} , с.	1117	796–1489	1028	880–1327	1102	854–1377
l _{max} , о.е. × 10 ³	16,75	6,86–31,71	62,28	25,21–83,69	70,21	56,57–108,00
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	
S, о.е. × с. × 10 ⁶	4,71	1,71–9,71	8,30	3,17–10,13	8,72	4,68–9,37
Синд./ Спонт.	1,72	1,33–2,42	2,68	1,57–3,59	2,26	1,77–3,39
			p ₁ = 0,010		p ₁ = 0,049	

Примечание: статистически достоверные различия с показателями:

p₁ — контрольной группы; p₂ — больных с благоприятным исходом РГП.

гранулоцитах крови она снижена у ГбФДГ и НАДФГДГ, но повышена у НАДФИЦДГ (рис. 78).

В целом метаболизм нейтрофильных гранулоцитов у больных РГП характеризуется низкой активностью ГбФДГ — ключевого и инициализирующего фермента пентозофосфатного цикла, от уровня которого зависит реализация ряда пластических процессов, а также стимуляция активности НАДФН-оксидазы. Низкая активность НАДФИЦДГ и высокая активность НАДН-ГДГ в нейтрофилах больных РГП определяют дисбаланс в реакциях обмена азота. При этом недостаточность реакций по восстановлению НАДФ+ частично может компенсироваться высоким уровнем активности НАДФИЦДГ. Необходимо отметить, что данный фермент определяется как вспомогательный в цикле трикарбоновых кислот. И хотя нейтрофильные гранулоциты — преимущественно анаэробные клетки, обменные процессы митохондриального компартмента значимо влияют на их метаболизм. Кроме того, повышение активности НАДН-зависимой реакции МДГ, являющейся ключевой в системе малат-аспаратного шунта митохондрий, также отражает изменения интенсивности реакций, связанных с аэробными энергетическими процессами. Активация обменных процессов в митохондриальном компартменте нейтрофильных гранулоцитов при РГП также определяется высокой активностью НАДН-ГДГ. Однако при интенсификации

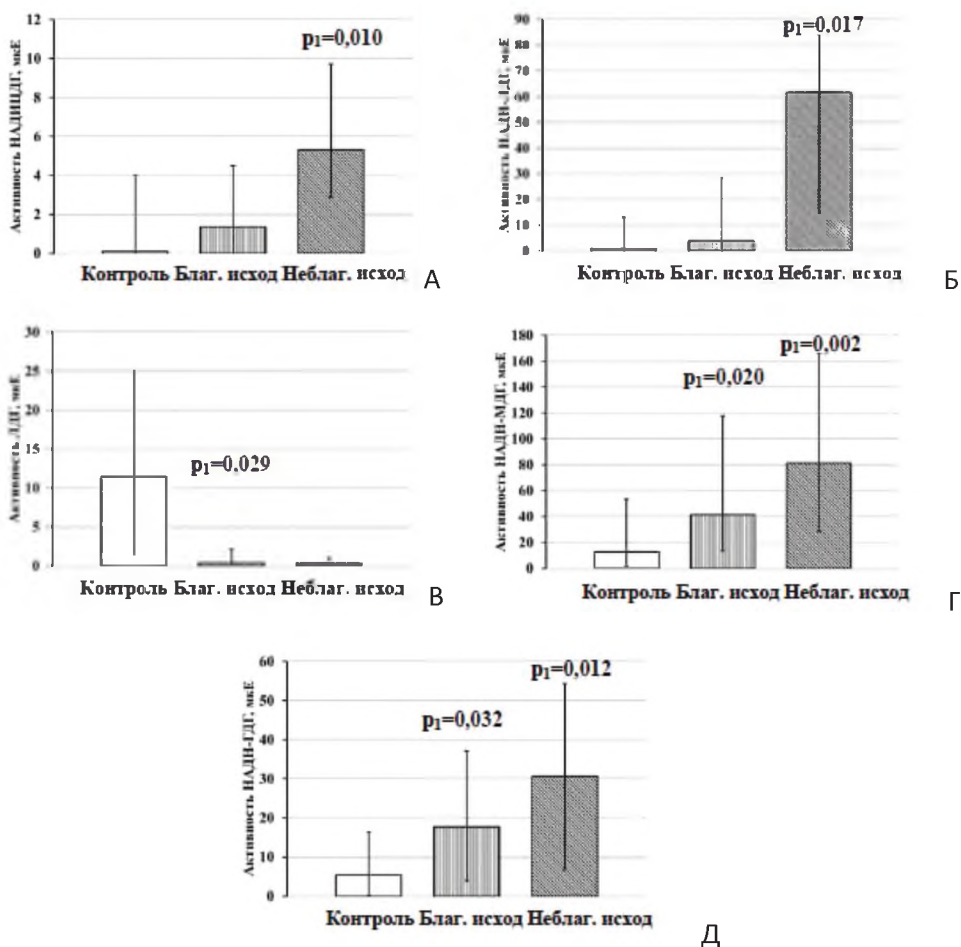


Рис. 88. Активность никотинамидадениндинуклеотид- и никотинамидадениндинуклеотид (Н)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от исхода заболевания: p_1 — статистически достоверные различия с контролем

ряда реакций в митохондриях у больных наблюдается снижение аэробной реакции ЛДГ.

Особенность метаболизма нейтрофильных гранулоцитов у больных с неблагоприятным исходом РГП определяется повышением активности анаэробной реакции ЛДГ, характеризующей интенсивность терминальных реакций анаэробного гликолиза, и НАДИЦДГ — фермента, в значительной степени определяющего интенсивность субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот. Следовательно, интенсивность анаэробных и аэробных процессов в нейтрофильных гранулоцитах при неблагоприятном исходе РГП повышена.

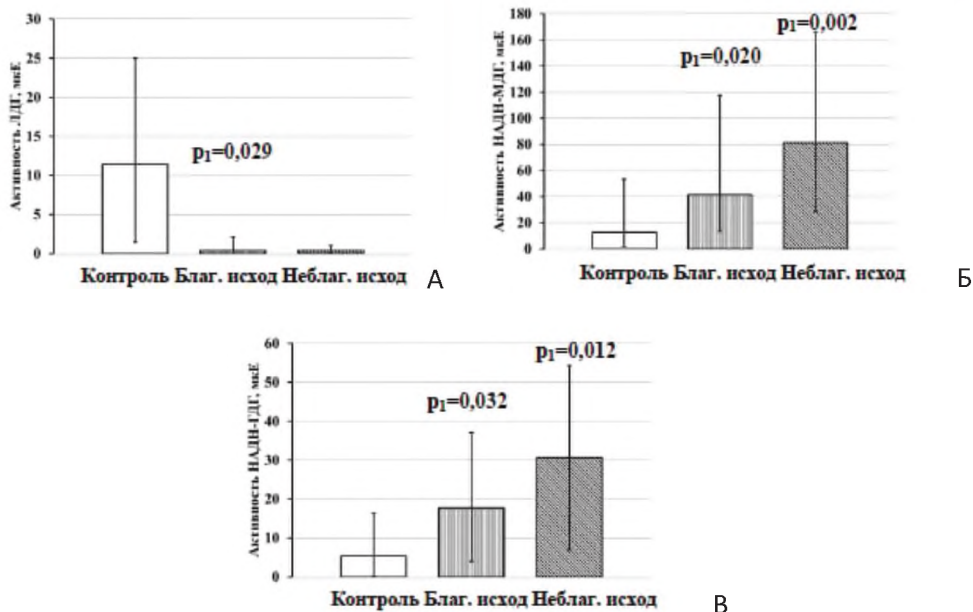


Рис. 89. Активность никотинамидадениндинуклеотид (Н)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от исхода заболевания: p1 — статистически достоверные различия с контролем

Таким образом, установлены особенности метаболических механизмов хемилюминесцентной реакции нейтрофильных гранулоцитов у больных РГП в зависимости от исхода заболевания. Обнаружено, что при неблагоприятном исходе РГП в нейтрофильных гранулоцитах активированы ферментативные реакции, характеризующие интенсивность анаэробных и аэробных процессов.

Активность никотинамидадениндинуклеотид- и никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов у больных острыми и хроническими гайморитами

Патогенез гнойных воспалений околоносовых пазух сложен, а причины не всегда ясны, что вызывает затруднение в их лечении, частые рецидивы и осложнения. Острый гайморит является наиболее частым осложнением острой респираторной вирусной инфекции и стоит на одном из первых мест среди хронических заболеваний ЛОР-органов. В ряде случаев гаймориты отличаются упорным течением и трудно поддаются консервативному лечению [Бобров В.М. и др., 2007; Czecior E. et al., 2012; Hickner J., 2012; Ohe Y. et al., 2012; Won E.J. et al., 2012; Wu M.M. et al., 2012]. Общая тенденция к росту воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости носа и околоносовых пазух связана со снижением

иммунореактивности населения, механизм которой также определяется нарушением метаболических процессов клеток иммунной системы

Под наблюдением находились 43 больных хроническим гайморитом (ХГ) в возрасте от 18 года до 45 лет в острый период заболевания и 38 человек с острым гайморитом (ОГ). Тяжесть заболевания оценивалась с учетом выраженности клинических симптомов, а также на основании гематологических изменений периферической крови.

При определении уровней активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов обнаружено, что только у больных ОГ снижена активность Г6ФДГ (табл. 36).

Таблица 36

Активность никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ (мкЕ) в лимфоцитах крови у больных хроническим и острым гайморитом (Ме, С₂₅–С₇₅)

Показатели	Контроль (n =32)		Хронический гайморит (n =43)		Острый гайморит (n =38)	
	Ме	С ₂₅ –С ₇₅	Ме	С ₂₅ –С ₇₅	Ме	С ₂₅ –С ₇₅
Г6ФДГ	2,14	0,56–10,75	2,30	0,07–10,72	0,29	0,03–4,03
					p ₁ < 0,05	
ГЗФДГ	0,01	0,01–0,93	1,04	0,01–2,12	0,12	0,01–1,15
			p ₁ < 0,05			
ЛДГ	6,90	1,93–16,75	11,80	4,91–18,67	5,61	1,13–13,33
					p ₂ < 0,05	
НАДФМДГ	0,06	0,01–9,62	1,28	0,01–19,87	1,33	0,02–17,47
			p ₁ < 0,05		p ₁ < 0,05	
НАДФГДГ	0,01	0,001–0,01	0,01	0,01–0,16	0,01	0,01–0,11
НАДФИЦДГ	1,14	0,01–11,3	0,95	0,01–3,61	0,79	0,01–2,22
МДГ	54,50	13,31–153,46	7,94	1,07–27,51	6,17	0,01–41,19
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,01	
НАДГДГ	9,52	0,05–31,31	2,09	0,01–9,14	3,04	0,01–30,46
НАДИЦДГ	0,01	0,01–12,14	0,04	0,01–36,44	0,19	0,01–1,71
НАДН-ЛДГ	38,46	9,96–107,66	12,47	0,01–36,44	3,36	0,01–85,66
НАДН-МДГ	38,46	9,96–107,66	48,34	12,72–87,94	62,19	10,19–111,31
ГР	1,53	0,61–4,41	0,99	0,01–7,43	1,45	0,01–11,12
НАДФН-ГДГ	4,55	0,26–10,68	6,39	0,01–40,91	7,47	0,11–44,05
					p ₁ < 0,05	
НАДН-ГДГ	7,71	3,38–29,38	3,19	0,21–28,26	3,75	0,63–11,04

Примечание: статистически достоверные различия с показателями: p₁ — контрольной группы; p₂ — больных с хроническими гайморитами.

Как уже обсуждалось выше, данный фермент является ключевым и инициализирующим в пентозофосфатном цикле, продукты которого используются в

реакциях макромолекулярного синтеза [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Гаврилюк Л.А. и др., 2011; Ozlü F. et al., 2011; Hamilton N.M. et al., 2012; Stanton R.C., 2012; Zhao G. et al., 2012]. Другая характерная особенность метаболизма лимфоцитов у больных ОГ — повышение активности НАДФН-ГДГ, осуществляющего восстановительное аминирование 2-оксоглутарата, тем самым принимая участие в системе внутриклеточного обмена азота и осуществляя перенос интермедиатов с реакций цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена. Особенностью состояния метаболических процессов в лимфоцитах крови больных ХГ является повышение активности ГЗФДГ. Фермент характеризует уровень переноса продуктов липидного катаболизма на реакции анаэробного окисления глюкозы [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Ishijima S. et al., 2008; Tsang W.Y. et al., 2008; Yeh J.I. et al., 2008; Kota V. et al., 2010; Saheki T. et al., 2011; de la Roche M. et al., 2012]. Следовательно, у больных с ХГ увеличена субстратная стимуляция гликолиза.

В обеих группах больных выявлены повышение активности НАДФМДГ и снижение активности МДГ. Активность МДГ характеризует уровень субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот (Matsuda T. et al., 2010; Pérez A. et al., 2010; Wang Q. et al., 2010; Shi Q., Gibson G.E., 2011). Следовательно, у больных ХГ и ОГ снижены обменные процессы в митохондриальном компартменте, что также может отрицательно влиять и на состоянии аэробного дыхания в целом. Возможно, повышение активности малик-фермента является в этом случае компенсаторным, что позволяет стимулировать реакции цикла Кребса за счет шунтирования.

Таким образом, состояние метаболизма лимфоцитов при гайморитах характеризуется снижением активности МДГ и компенсаторным повышением активности шунтирующей реакции малик-фермента. Особенностью метаболизма лимфоцитов у больных ОГ является снижение интенсивности субстратного потока на пентозофосфатный цикл и повышение НАДФН-зависимого субстратного оттока с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена. При хронизации заболевания данные процессы нормализуются, но повышается уровень липидного катаболизма, что проявляется в субстратной стимуляции окислительно-восстановительных реакций гликолиза.

Глава 9. Метаболизм клеток иммунной системы при аутоиммунных заболеваниях и аллергиях



Метаболизм лимфоцитов при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы

Диффузный токсический зоб (ДТЗ) и аутоиммунный тиреоидит (АИТ) относятся к наиболее распространенным органоспецифическим аутоиммунным заболеваниям и имеют сходную этиологию — аутоиммунный процесс, но различный патогенез, специфичность которого на уровне организма проявляется в том числе и уровнем тиреоидных гормонов [Шагарова С.Г., 2011; Brown R.S., 2009; Brent G.A., 2010; Eschler D.C. et al., 2011; Saranac L. et al., 2011; Simmonds M.J., Gough S.C., 2011; Сапрына Т.В., 2012; Stathatos N., Daniels G.H., 2012]. Реактивность организма практически полностью определяется функциональной активностью иммунокомпетентных клеток. При этом доказано, что функциональная активность лимфоцитов зависит от интенсивности их метаболизма. Именно на уровне метаболической системы клеток формируются реакции на воздействия, в том числе и гормональной природы.

Учитывая неоднозначность гормонального воздействия на лимфоциты при аутоиммунной патологии щитовидной железы, а также сложные взаимосвязи реакций внутриклеточного метаболизма, применение стандартных подходов к анализу данных не всегда позволяет оценить значения ферментативных реакций в патогенезе заболевания. С этой точки зрения перспективно использование самообучающихся нейронных сетей (нейросетевого анализа), осуществляющих комплексную оценку всего многообразия уровней изучаемых параметров и их взаимосвязей и позволяющих выявить скрытые неоднородности в распределении структурных показателей системы [Горбань А.Н., Россиев Д.А., 1996; Нейроинформатика, 1998].

Диагноз ДТЗ и АИТ устанавливался на основании клинических данных, результатов гормонального анализа и ультразвукографии щитовидной железы. Для всех больных проводились морфологический анализ биопсийного материала щитовидной железы и радиоиммунный анализ концентрации тиреотропного и тиреоидных гормонов, антител к микросомальной фракции тиреоцитов и к тиреоглобулину.

Оценка значимости (информативность) внутриклеточных ферментов в модели осуществлялась с помощью нейросетевого классификатора Panalyzer 2004.

Обучающая выборка была разбита на два класса: показатели здоровых женщин и больных АИТ либо ДТЗ. Информативность оценивалась измерением сигнала, подаваемого на входные синапсы нейросетевой модели, и представлена в относительных единицах (о.е.) [Горбань А.Н., Россиев Д.А., 1996; Нейроинформатика, 1998].

Уровни активности исследуемых НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у здоровых женщин и у больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (АЗЩЖ) представлены в табл. 37.

Таблица 37

Активность никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у женщин с диффузным токсическим зобом и аутоиммунным тиреоидитом
(X * m)

Показатели	Контроль (n = 96)	ДТЗ (n = 42)	АИТ (n = 45)
Г6ФДГ	8,14±0,85	11,03±2,59 p ₂ <0,05	5,47±1,19 p ₁ <0,01
ГЗФДГ	0,13±0,03	0,31±0,14	0,39±0,09 p ₁ <0,001
ЛДГ	34,17±3,69	28,42±6,32 p ₂ <0,01	11,28±2,34 p ₁ <0,001
МДГ	137,29±19,40	15,99±2,11 p ₁ <0,001	16,50±2,60 p ₁ <0,001
НАДФМДГ	9,71±1,50	0,14±0,09 p ₁ <0,01	0,84±0,18 p ₁ <0,001
НАДФГДГ	0,11±0,02	0,08±0,04	0,08±0,01
НАДГДГ	5,60±0,81	3,17±0,51	4,00±0,82
НАДИЦДГ	12,64±2,38	4,96±1,89	3,33±0,55 p ₁ <0,01
НАДФИЦДГ	238,35±55,24	16,08±6,10 p ₁ <0,001	20,44±3,52 p ₁ <0,001
НАДН-ЛДГ	57,27±8,89	11,27±5,10 p ₁ <0,05	30,73±7,76
НАДН-МДГ	92,49±9,71	15,25±4,60 p ₁ <0,01	103,43±23,91 p ₂ <0,05
ГР	10,26±1,81	13,93±3,74	25,66±6,31
НАДН-ГДГ	27,76±5,78	16,73±8,10	61,31±23,02
НАДФН-ГДГ	41,38±4,33	91,60±27,23	80,02±13,82 p ₁ <0,05

Примечание: статистически достоверные различия:

p₁ — с группой здоровых лиц; p₂ — между группами больных ДТЗ и АИТ.

Обнаружено, что в лимфоцитах женщин с АЗЩЖ выявляются изменения активности исследуемых НАДФ-зависимых дегидрогеназ, как общие для двух данных патологий, так и специфические. К общим изменениям активности ферментов лимфоцитов крови у женщин с АЗЩЖ относительно здоровых относится снижение уровней МДГ, НАДИЦДГ, НАДФИЦДГ и ГР. В обеих исследуемых группах с патологией установлено увеличение активности НАДФН-ГДГ. Также у женщин с АЗЩЖ в лимфоцитах крови снижается уровень НАДФМДГ, но у больных с АИТ активность фермента понижается в меньшей степени, что приводит к проявлению тенденции повышения его уровня относительно аналогичного параметра у больных с ДТЗ. Только у женщин с ДТЗ обнаружено снижение активности НАДН-зависимых реакций ЛДГ и МДГ в лимфоцитах. В то же время только у женщин с АИТ выявляется снижение активности Г6ФДГ и ЛДГ, но повышение уровня Г3ФДГ.

Как уже отмечалось выше, в основе патогенеза данных патологий лежит аутоиммунный процесс, исходом которого стали гипертиреоз (при ДТЗ) и гипотиреоз (при АИТ). В связи с этим анализ полученных результатов проведен исходя из предположения, что общие изменения активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови характеризуют аутоиммунный процесс, в то время как специфические особенности метаболизма иммунокомпетентных клеток определяются регуляторным воздействием разных доз тиреоидных гормонов.

С этой точки зрения снижение активности ферментов, прежде всего определяющих метаболическое состояние митохондриального компартмента лимфоцитов (МДГ, НАДФМДГ, НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ), является, по-видимому, результатом, который определяется в нашем случае развитием в организме аутоиммунного процесса. Конечно, повышение реактивности лимфоцитов, в том числе сенсibilизированных к собственным антигенам, сопровождается активацией энергетических и синтетических процессов. Однако необходимо отметить, что при органоспецифических аутоиммунных заболеваниях сенсibilизированные к аутоантигенам лимфоциты находятся в органе-мишени. При этом активированными иммунокомпетентными клетками выделяется ряд цитокинов, которые влияют и на метаболизм лимфоцитов периферической крови. Можно предположить, что длительное воздействие цитокинов, стимулирующих метаболические реакции, определяющие активацию иммунокомпетентных клеток, приведет к истощению субстратного пула и, соответственно, ингибированию метаболических процессов.

Роль вспомогательных и шунтирующих реакций цикла трикарбоновых кислот достаточно важна для сохранения метаболического статуса митохондриального компартмента. Доказано, что в случае снижения активности НАД-зависимых процессов в митохондриях интенсивность субстратного потока лимонного цикла может быть компенсирована НАДФ-зависимыми реакциями

глутамат- и изоцитратдегидрогеназы [Sidhu N.S. et al., 2011; Moon J.L. et al., 2012; Spanaki C., Plaitakis A., 2012]. Уровень активности шунтирующей реакции НАДФМДГ также важен как для энергетических процессов митохондрий, так и для метаболизма клеток в целом. Во-первых, данный фермент является ключевым во внутриклеточных реакциях анаболизма липидов. Во-вторых, НАДФМДГ, шунтируя реакции цикла Кребса, стимулирует окислительно-восстановительные процессы митохондриального компартмента [Кuo C.C. et al., 2008; Xu J. et al., 2008; Fu Z.Y. et al., 2009; Hsieh J.Y. et al., 2009]. Таким образом, снижение активности НАД-зависимых оксидоредуктаз цикла трикарбоновых кислот, а также вспомогательных и шунтирующих НАДФ-зависимых ферментов определяет снижение энергетического потенциала лимфоцитов у женщин с АЗЩЖ. Именно значимостью НАДФГДГ и НАДФМДГ во внутриклеточном метаболизме, а также снижением активности НАДФМДГ, по-видимому, определяется наибольшая информативность данных ферментов в моделях нейросетевого классификатора здоровые — ДТЗ и здоровые — АИТ.

Общими для метаболизма клеток иммунной системы у женщин с ДТЗ и АИТ являются снижение активности ГР и повышение уровня обратной реакции НАДФГДГ. Активность ГР в значительной степени определяется внутриклеточной концентрацией НАДФН. Доказано, что в ряде клеток (например, в эритроцитах) ГР находится в межферментном комплексе с Г6ФДГ [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Ninfali P. et al., 1996; Bülbül M., Erat M., 2008; Tandogan B. et al., 2011]. В связи с этим можно предположить, что снижение активности ГР определяется понижением концентрации НАДФН. Действительно, в лимфоцитах крови больных АЗЩЖ установлено снижение активности НАДФМДГ и НАДФИЦДГ, у женщин с АИТ также снижен уровень активности Г6ФДГ. Кроме того, повышение уровня НАДФН-ГДГ, осуществляющей аминирование α -кетокислоты в аминокислоту, может указывать не только на интенсификацию белковых синтетических процессов, но и на дополнительное снижение концентрации НАДФН.

Тем не менее у женщин с ДТЗ и АИТ на фоне общих изменений метаболизма лимфоцитов, характеризующих, прежде всего, снижение активности оксидоредуктаз, определяющих аэробные энергетические процессы, выявляются специфические особенности, которые, по-видимому, определяются воздействием разных доз тиреоидных гормонов. Специфической особенностью метаболизма иммунокомпетентных клеток крови у женщин с ДТЗ является снижение активности НАДН-зависимых реакций ЛДГ и МДГ. При этом повышается регуляторная роль аэробной реакции ЛДГ, что определяется с помощью нейросетевого классификатора. Снижение активности НАДН-ЛДГ и НАДН-МДГ может также определяться понижением интенсивности гликолиза и, соответственно, низкой концентрацией НАДН в цитоплазматическом компартменте.

В то же время в лимфоцитах женщин с АИТ выявляются специфические изменения активности метаболических ферментов лимфоцитов крови, которые отражают процессы, стимулирующие гликолиз. Так, снижение активности Г6ФДГ (ключевого и инициализирующего фермента пентозофосфатного цикла) может привести к снижению интенсивности реакций макромолекулярного цикла, зависящих от рибозо-5-фосфата и НАДФН [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Гаврилюк Л.А. и др., 2011; Ozlü F. et al., 2011; Hamilton N.M. et al., 2012; Stanton R.C., 2012; Zhao G. et al., 2012]. Но в то же время пентозофосфатный цикл является основным конкурентом гликолиза за субстрат. Следовательно, снижение активности Г6ФДГ будет стимулировать интенсивность гликолиза. Метаболическое значение Г3ФДГ заключается в переносе продуктов катаболизма липидов на окислительно-восстановительные реакции гликолиза, т.е., повышение активности Г3ФДГ в лимфоцитах больных АИТ позволяет предположить стимулирование субстратного потока по гликолизу продуктами липидного катаболизма и, соответственно, более выраженную «анаэробность» клеток иммунной системы. Вероятно, в связи с этим Г6ФДГ и анаэробная реакция ЛДГ лимфоцитов крови у женщин с АИТ являются одними из наиболее информативных параметров нейросетевой модели.

Таким образом, особенностью метаболизма лимфоцитов периферической крови, характеризующих длительно текущие аутоиммунные органоспецифические процессы у женщин с ДТЗ и АИТ, является, прежде всего, снижение активности ферментов, определяющих уровень аэробного дыхания. В то же время особенность метаболизма лимфоцитов больных ДТЗ состоит в том, что при понижении активности ферментов, определяющих интенсивность аэробных энергетических процессов, установлены изменения активности ферментов, позволяющие предполагать снижение субстратного потока по гликолизу. У больных АИТ, наоборот, обнаружены изменения ряда цитоплазматических дегидрогеназ, изменение активности которых стимулирует интенсивность гликолиза.

Интенсивность аутоиммунного процесса можно охарактеризовать уровнем аутоантител к тканеспецифическим антигенам. Исследованы уровни активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов у женщин с ДТЗ в зависимости от концентрации антител к тиреоидной пероксидазе (АТкТПО).

При исследовании уровней активности НАДФ- и НАД-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных ДТЗ в зависимости от уровня АТкТПО обнаружено, что только у больных с уровнем содержания АТкТПО меньше 100 мЕд/л снижена активность НАДФИЦДГ (рис. 90). Уровни активности НАДФГДГ, ГР и НАДН-ЛДГ повышены в лимфоцитах больных ДТЗ относительно контрольных значений независимо от уровня содержания АТкТПО (см. рис. 90). Также независимо от содержания АТкТПО у больных ДТЗ относительно контрольных уровней повышены активности НАДГДГ, НАДН-МДГ и

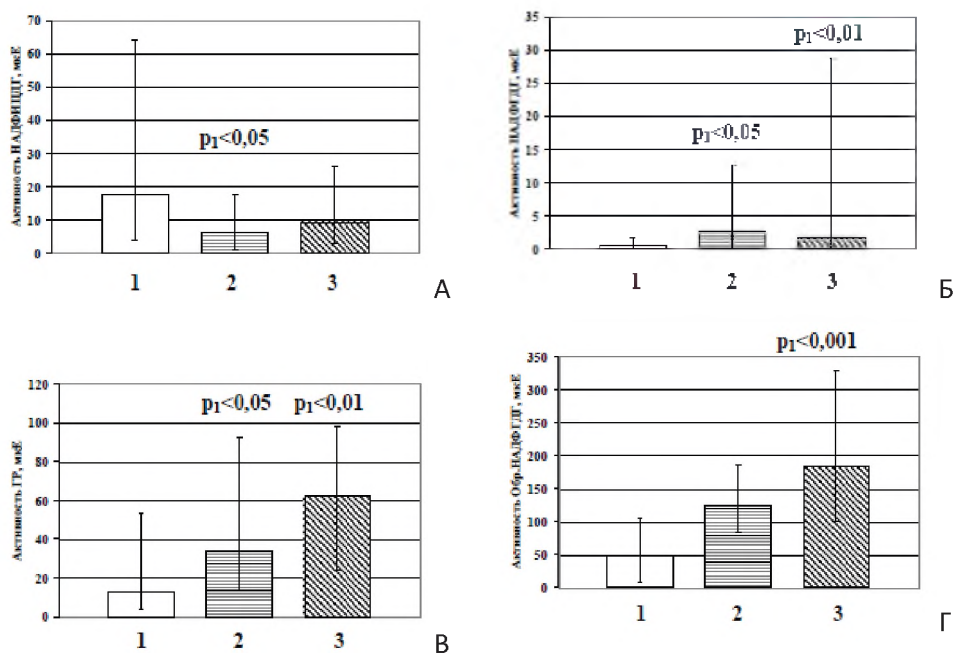


Рис. 90. Активность никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных диффузным токсическим зобом в зависимости от уровня концентрации антител к тиреоидной пероксидазе: 1 — контроль; 2 — больные диффузным токсическим зобом с уровнем концентрации антител к тиреоидной пероксидазе меньше 100 мЕд/л; 3 — больные диффузным токсическим зобом с уровнем концентрации антител к тиреоидной пероксидазе больше 100 мЕд/л

НАДН-ГДГ (рис. 91). При этом необходимо отметить, что только у больных ДТЗ с уровнем содержания АТкТПО меньше 100 мЕд/л выявляются отрицательные взаимосвязи между концентрацией аутоантител и активностью НАДН-ГДГ ($r = -0,49$, $p = 0,029$) и НАДФН-ГДГ ($r = -0,52$, $p = 0,020$).

В целом необходимо отметить, что различия в особенностях метаболического состояния лимфоцитов больных ДТЗ в зависимости от уровня содержания АТкТПО незначительны. НАДФИЦДГ катализирует вспомогательную дегидрогеназную реакцию цикла трикарбоновых кислот, значимость которой возрастает при повышении уровня НАДН/НАД в митохондриальном компартменте и, соответственно, ингибировании НАД-зависимого субстратного потока [Kil I.S. et al., 2011; Moon J.L. et al., 2012].

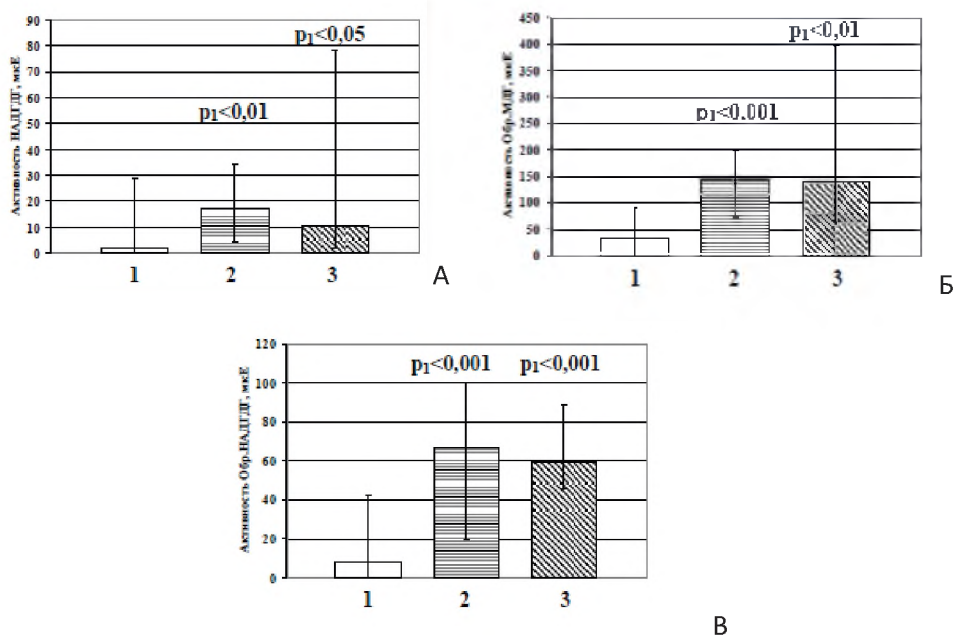


Рис. 91. Активность никотинамидадениндинуклеотид-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных диффузным токсическим зобом в зависимости от уровня концентрации антител к тиреоидной пероксидазе: 1 — контроль; 2 — больные диффузным токсическим зобом с уровнем концентрации антител к тиреоидной пероксидазе меньше 100 МЕд/л; 3 — больные диффузным токсическим зобом с уровнем концентрации антител к тиреоидной пероксидазе больше 100 МЕд/л

Следовательно, у больных ДТЗ с уровнем содержания АТкТПО меньше 100 МЕд/л при активации НАД-зависимого субстратного потока снижается возможность компенсаторного окисления через НАДФ-зависимые дегидрогеназные реакции. При этом, независимо от уровня содержания АТкТПО, метаболизм лимфоцитов больных ДТЗ характеризуется активацией субстратного взаимодействия между циклом трикарбоновых кислот и реакциями аминокислотного обмена (через НАД- и НАДФ-зависимые реакции глутаматдегидрогеназ). Кроме того, повышение активности НАДН-зависимой реакции МДГ, являющейся ключевой в малат-аспаратном шунте, отражает повышение интенсивности процессов в дыхательной цепи митохондрий [Lu M. et al., 2011; Abbrescia D.I. et al., 2012]. Необходимо отметить, что тиреоидные гормоны активируют аэробное дыхание и внутриклеточный белковый обмен [Chattopadhyay S. et al., 2010; Cheng S.Y. et al., 2010]. По-видимому, активация ряда метаболических реакций осуществляется на фоне возрастания уровня перекисных процессов, что определяется повышением активности ГР, входящей в состав основной антиоксидантной

системы клеток — глутатион-зависимой [Сафонова О.А. и др., 2011; Ефременко Е.С. и др., 2012; Waggiallah H., Alzohairy M., 2011; Djukic M.M. et al., 2012; Niedźwiedz A. et al., 2012; Yan J. et al., 2012].

По результатам корреляционного анализа установлена обратная зависимость между уровнями активности НАДН-ГДГ и НАДФН-ГДГ и содержанием АТкТПО в группе больных ДТЗ с низким количеством аутоантител. Выявленная зависимость определяет снижение оттока субстратов с цикла Кребса на реакции аминокислотного обмена при увеличении содержания АТкТПО у больных до уровня 100 мЕд/л. Следовательно, выявляется разнонаправленность в изменении интенсивности данных ферментативных реакций: под действием высокого уровня тиреоидных гормонов они активируются, при повышенном уровне аутоиммунных процессов ингибируются.

Таким образом, со стороны метаболизма лимфоцитов выраженных различий в зависимости от уровня АТкТПО у больных ДТЗ не обнаружено. Метаболизм лимфоцитов при ДТЗ в целом характеризуется высокой активностью глутаматдегидрогеназ, осуществляющих субстратное взаимодействие цикла трикарбоновых кислот и реакций аминокислотного обмена, малат-аспаратного шунта и глутатионредуктазы. Только у больных ДТЗ с содержанием АТкТПО меньше 100 мЕд/л выявляется снижение активности НАДФИЦДГ. С помощью корреляционного анализа установлена разнонаправленность в регуляторном влиянии на метаболизм лимфоцитов высокого уровня тиреоидных гормонов и АТкТПО. У больных ДТЗ с содержанием АТкТПО больше 100 мЕд/л выявляется усиление дисрегуляторных процессов, проявляющееся в полной потере взаимосвязей концентрации АТкТПО с иммунологическими показателями и уровнями активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов.

Метаболизм лимфоцитов при аллергических заболеваниях

Широкое распространение аллергических заболеваний в экономически развитых странах неразрывно связано с концентрацией населения в крупных промышленных центрах, с загрязнением атмосферы, почвы и водоемов многочисленными продуктами и отходами современного производства [Лазуткина Е.Л. и др., 2012; Assa'ad A., Fiocchi A., 2012; Gómez E. et al., 2012; Nagler C.R., 2012; Yawn B.P., Fenton M.J., 2012]. В связи с этим аллергические заболевания определяют как «болезни цивилизации», которые по социально-экономическому ущербу занимают одно из первых мест.

Аллергические реакции организма различны по своим механизмам и проявлениям. С учетом основных патогенетических механизмов выделяют две формы аллергии: истинную аллергию и псевдоаллергию [Савченко А.А., Смирнова С.В., 2001; Савченко А.А. и др., 2002; Козлов В.А. и др., 2009], но их общим патогенетическим звеном является выброс значительного количества

биологически активных веществ, поэтому исследования механизмов иммунореактивности при специфической и неспецифической формах аллергии являются актуальными. Именно реактивность клеток иммунной системы обуславливает функциональное и патоморфологическое проявление патологии. В то же время иммунокомпетентные клетки имеют богатый набор рецепторов, что делает их высокочувствительными к разнообразным нарушениям системы гомеостаза организма [Козлов В.А. и др., 2009; Савченко А.А. и др., 2011].

Реализация модулирующего воздействия биологически активных веществ осуществляется через метаболическую систему лимфоцитов, которая в свою очередь определяет функциональную активность клеток иммунной системы [Козлов В.А. и др., 2009; Ярилин А.А., 2010]. Учитывая сложность метаболических взаимосвязей, для исследования параметров внутриклеточного обмена веществ необходимо применять методы системного анализа, наиболее перспективен нейросетевой анализ [Горбань А.Н., Россиев Д.А., 1996; Нейроинформатика, 1998].

Больные обследованы в аллергологическом кабинете с использованием дифференциальных критериев диагностики истинной аллергии и псевдоаллергии, а также современных методов специфической аллергологической диагностики: 1) целенаправленного и тщательного сбора аллергологического анамнеза; 2) оценки клинической картины заболевания; 3) постановки скарификационных проб с неинфекционными аллергенами; 4) проведения элиминационных и провокационных тестов (по показаниям); 5) определения и специфического IgE в сыворотке крови на аппарате 3M Diagnostic Systems Bio Whittakes (USA): Total IgE II FAST и IgE FAST-Plus.

Уровни активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных истинной аллергией и псевдоаллергией представлены в табл. 38. Обнаружено, что у обследуемых больных изменение внутриклеточной активности оксидоредуктаз относительно контрольной группы во многом совпадает. Так, у больных независимо от наличия иммунного компонента аллергической реакции в лимфоцитах крови статистически достоверно возрастает активность Г6ФДГ, ГЗФДГ, ЛДГ, МДГ, пируватдегидрогеназного комплекса (ПДГК) и НАДН-МДГ. В то же время уровни НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ статистически достоверно выше у больных истинной аллергией. Только при специфической аллергической реакции в лимфоцитах крови повышается активность НАДГДГ, 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (ОГДГК) и НАДН-ЛДГ.

Исследуемые ферменты структурно располагаются в разных компартаментах клеток и характеризуют интенсивность энергетических и пластических реакций. Так, увеличение активности Г6ФДГ отражает повышение интенсивности окислительных реакций пентозофосфатного цикла и, соответственно, наработки НАДФН и рибозо-5-фосфата, которые используются для макромолекулярного

синтеза [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Гаврилюк Л.А. и др., 2011; Ozlü F. et al., 2011; Hamilton N.M. et al., 2012; Stanton R.C., 2012; Zhao G. et al., 2012]. По-видимому, значение пентозофосфатного цикла повышается именно при активации лимфоцитов, в то время как синтез продуктов цикла снижется при снижении функциональной активности иммунокомпетентных клеток.

Таблица 38

Активность никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ (мкЕ) в лимфоцитах крови у больных истинной аллергией и псевдоаллергией ($X \pm m$)

Показатели	Контроль (n=25)	Истинная аллергия (n=36)	Псевдоаллергия (n=19)
Г6ФДГ	2,06±0,38	3,66±0,47 0,1 > p ₁ > 0,05	4,20±0,75 p ₁ < 0,05
ГЗФДГ	0,01±0,001	2,66±0,53 p ₁ < 0,001	2,54±0,85 p ₁ < 0,001
ЛДГ	31,14±4,51	65,97±6,76 p ₁ < 0,01	78,40±10,46 p ₁ < 0,001
МДГ	34,70±4,31	104,22±15,67 p ₁ < 0,001	101,62±10,02 p ₁ < 0,001
НАДФМДГ	7,35±1,41	5,39±1,11	9,93±2,98
НАДФГДГ	0,21±0,04	0,23±0,05	0,22±0,05
НАДГДГ	1,45±0,15	13,27±2,73 p ₁ < 0,001	1,31±0,22 p ₂ < 0,001
ПДГК	0,98±0,09	6,48±1,77 p ₁ < 0,001	9,74±3,65 p ₁ < 0,001
ОГДГК	0,15±0,02	0,68±0,21 p ₁ < 0,01	0,20±0,02 p ₂ < 0,05
НАДИЦДГ	5,17±0,53	198,00±34,68 p ₁ < 0,001	101,97±25,91 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,05
НАДФИЦДГ	10,12±1,14	122,16±27,44 p ₁ < 0,001	58,01±13,81 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,05
НАДН-ЛДГ	4,75±1,42	64,70±16,90 p ₁ < 0,01	2,98±0,78 p ₂ < 0,01
НАДН-МДГ	52,12±10,29	175,79±31,09 p ₁ < 0,05	182,03±43,36 p ₁ < 0,01
ГР	57,30±10,39	52,80±5,07	58,86±7,31
НАДН-ГДГ	141,31±27,14	188,08±21,01	150,28±26,29
НАДФН-ГДГ	300,16±65,26	332,74±48,42	351,26±60,01

Примечание: статистически достоверные различия с показателями: p₁ — лиц контрольной группы; p₂ — больных с истинной аллергией.

Пентозофосфатный цикл является основным конкурентом гликолиза за субстрат [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Snoep J.L. et al., 1996; Ramnanan C.J., Storey K.B., 2006; Mailloux R.J., Harper M.E., 2010]. Следовательно, повышение активности Г6ФДГ в лимфоцитах крови больных истинной аллергией и псевдоаллергией должно привести к снижению интенсивности реакций гликолиза. Однако установленное повышение активности анаэробной реакции ЛДГ (НАДН-ЛДГ) и НАДН-МДГ может проявляться только во взаимосвязи с высокой интенсивностью терминальных стадий гликолиза и накоплением в цитоплазматическом компартменте клеток иммунной системы НАДН. При этом необходимо отметить, что если в лимфоцитах крови у больных истинной аллергией повышается активность и анаэробной реакции ЛДГ и НАДН-МДГ, то в клетках иммунной системы лиц с псевдоаллергией возрастает только уровень НАДН-МДГ.

Одним из механизмов, активирующих реакции гликолиза, является дополнительный приток субстратов через ГЗФДГ. Данный фермент осуществляет перенос продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза [Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Ishijima S. et al., 2008; Tsang W.Y. et al., 2008; Yeh J.I. et al., 2008; Kota V. et al., 2010; Saheki T. et al., 2011; de la Roche M. et al., 2012]. Обнаружено, что в лимфоцитах больных истинной аллергией и псевдоаллергией активность ГЗФДГ повышается.

Энергетические реакции лимфоцитов осуществляются за счет не только анаэробного окисления глюкозы, но и кислород-зависимых процессов. Анализ уровней активности исследуемых оксидоредуктаз лимфоцитов крови больных истинной и псевдоаллергией позволяет предположить активацию митохондриальных энергетических реакций. Так, повышение активности аэробной реакции ЛДГ и ПДГК вызывает более интенсивный приток субстратов на реакции цикла трикарбоновых кислот. Однако выявленная активация оксидоредуктаз цикла Кребса в лимфоцитах различается у больных истинной аллергией и псевдоаллергией. В клетках больных с истинной аллергией обнаружено увеличение активности всех исследуемых дегидрогеназ лимонного цикла (МДГ, НАДИЦДГ и ОГДГК). Более того, установлено повышение уровня НАДГДГ (осуществляется перенос субстратов с реакцией аминокислотного обмена на окислительно-восстановительные реакции цикла Кребса) и НАДФИЦДГ (вспомогательная дегидрогеназная реакция цикла Кребса). В лимфоцитах крови лиц с псевдоаллергией также обнаружено увеличение активности МДГ. Однако уровни НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ повышаются значительно слабее, чем у больных истинной аллергией, в то время как активность НАДГДГ и ОГДГК остается на уровне нормы. Следовательно, можно предположить, что в лимфоцитах крови лиц с псевдоаллергическими процессами активация митохондриальных окислительно-восстановительных реакций менее выражена, чем у больных истинной аллергией.

Как уже отмечалось, общим патогенетическим процессом истинной и псевдоаллергических реакций является выброс большого количества биологически активных веществ из тучных клеток и базофилов, получивших название медиаторов аллергии [Козлов В.А. и др., 2009; Ярилин А.А., 2010; Мокроносова М.А., Коровкина Е.С., 2012; Miyazaki D. et al., 2008]. При этом доказано, что воздействие медиаторов аллергии на иммунокомпетентные клетки приводит к повышению функциональной активности лимфоцитов. В связи с этим можно предположить, что общие изменения активности исследуемых НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов характеризуют метаболический ответ иммунокомпетентных клеток при воздействии на них медиаторов аллергии. В то же время специфические особенности уровней активности ферментов в лимфоцитах у больных истинной аллергией отражают метаболические реакции активированных клеток иммунной системы, патогенетически определяющих иммунную основу специфической аллергии. Следовательно, более выраженное повышение интенсивности реакций гликолиза и цикла трикарбоновых кислот в лимфоцитах больных истинной аллергией отражает не только метаболический ответ на выброс биологически активных веществ при аллергической реакции, но и специфическую активацию лимфоцитов.

Уровень активации реакций энергетического обмена в лимфоцитах у лиц с псевдоаллергической реакцией ниже, чем у больных истинной аллергией. В связи с этим «точками напряжения» метаболической системы являются ферменты гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. Это подтверждается моделью больные истинной аллергией–больные псевдоаллергией.

Таким образом, при исследовании активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у больных истинной аллергией и псевдоаллергией обнаружено увеличение интенсивности реакций, определяющих функции пентозофосфатного цикла, гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. Однако увеличение активности ферментов, отражающих интенсивность анаэробного и аэробного дыхания лимфоцитов, у больных истинной аллергией выше, чем у лиц с псевдоаллергией. В связи с этим предполагается, что для реализации повышенной функциональной активности лимфоцитов при истинной аллергии необходимо выраженное увеличение энергетических процессов. В то же время изменение активности исследуемых НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов у лиц с псевдоаллергией определяется выбросом в кровь «медиаторов аллергии».

Глава 7. Клиническая диагностика иммунометаболических нарушений



Диагностика иммунометаболических нарушений — это, прежде всего, выявление иммунных нарушений с дальнейшим выявлением изменений со стороны системного и клеточного метаболизма. Для диагностики используются классические подходы, применяемые в клинической практике.

Схематично это можно описать как трехуровневый алгоритм диагностики. На первом этапе проводятся клинические исследования, на втором анализируются лабораторные исследования, на третьем проводятся специальные исследования, в т.ч. с элементами топической диагностики. На любом этапе как итог диагностики формируется диагноз (предварительный, клинический, топический). В зависимости от диагноза определяются необходимая терапия и дальнейшая тактика ведения пациента (рис. 92).



Рис. 92. Принципы формирования иммунологического диагноза

Иммунологический диагноз

Диагностика иммунных нарушений сопряжена с рядом проблем. Это связано со сложной многоуровневой организацией иммунной системы, высокой надежностью иммунитета с многочисленными компенсаторными механизмами, многочисленными регуляторными связями между компонентами иммунной системы и нервной и эндокринной системой. Поэтому после проведения клинического осмотра и получения лабораторных исследований необходимо классифицировать имеющиеся иммунные нарушения. Традиционно все нарушения функции иммунной системы классифицируют, исходя из проявления различных заболеваний. Во всем мире принято выделять:

- 1) первичные иммунодефициты;
- 2) вторичные иммунодефициты;
- 3) аутоиммунные заболевания;
- 4) аллергии;
- 5) опухоли иммунной системы.

Хотелось бы обратить внимание на то, что не следует путать проявления иммунных нарушений и их классификацию с различной иммунопатологией, определенной в том числе и в МКБ-10 (или уже МКБ-11), так же как печеночную или сердечную недостаточность и, например, хронический гепатит или инфаркт миокарда. Иммунопатологию можно определить как болезни иммунной системы, индуцированные состояниями под воздействием факторов, влияющих на иммунную систему, и отдельную категорию аутоиммунных и аллергических болезней с избыточным или извращенным реагированием иммунной системы. Они на сегодняшний день представляют группы заболеваний, схожие клинически, но с различными иммунопатологическими механизмами (рис. 93).



Рис. 93. Патология иммунной системы

Во всех этих случаях мы диагностируем не нарушения функции иммунной системы, а непосредственно определенные заболевания, в патогенезе развития которых принимает участие, как правило, не один, а несколько типов реакций, при этом, с учетом клонально-селекционного типа реагирования иммунной системы, могут сочетаться даже гипоэргические и гиперэргические типы реакций при одной и той же патологии.

Не исключается, что в основе многих, а может быть, практически всех клинических формах иммунных нарушений лежит первичная иммунологическая недостаточность какого-то компонента иммунной системы, компенсированная до определенного времени за счет нормальной или высокой функциональной активности других компонентов этой системы. До определенного времени этот дефект может быть компенсирован за счет нормальной или повышенной функциональной активности других компонентов иммунной системы.

Болезни иммунной системы, проявляющиеся различными иммунологическими симптомами и признаками (синдромами), нарушают нормальное функционирование организма за счет поражения иммунной системы. Исходя из этого, в клинической работе необходимо определить наличие и охарактеризовать тот или иной иммунопатологический синдром, оценить степень его тяжести, выявить причины его возникновения, провести дополнительные лабораторные и инструментальные исследования, сформировать именно иммунологический диагноз, аналогичный диагнозу сердечной или печеночной недостаточности.

Исторически сложилось, что все эти нарушения определяют как гипореактивное и гиперреактивное состояние. Обычно таким разделением ранее пользовались и мы. Однако это не всегда верно, т.к., например, при классической реакция гиперреактивности — синдроме патогенного воздействия иммунных комплексов — в основе патогенеза лежит недостаточность функции макрофагов, что приводит к неполноценной элиминации иммунных комплексов и развитию воспаления в виде различной степени тяжести васкулитов. Т.е. это не реакция гиперчувствительности, а недостаточность макрофагально-фагоцитарного звена иммунной системы. Учитывая все это с позиций развития иммунного ответа, нами предложено новое распределение иммунопатологических синдромов (рис. 94).

Немаловажна и следующая проблема, связанная с наименованием иммунопатологических синдромов: нередко при одном и том же патогенезе определенного синдрома в зависимости от степени тяжести или преобладания определенной симптоматики формируются различные наименования синдрома.

Так, например, в последнее время, помимо понятия «системный воспалительный ответ» выделяют другие определения и синдромы. Это цитокиновый шторм или цитокиновая буря, синдром вторичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH), синдром активации макрофагов (MAS). В основе всех их лежат врожденные и/или приобретенные нарушения регуляции иммунного ответа, приводящие к аномальной активации клеток иммунной

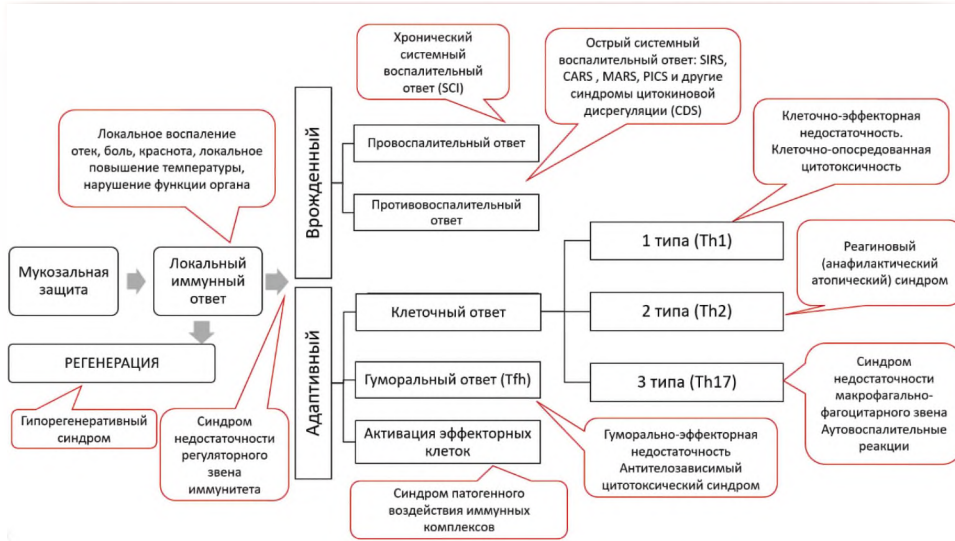


Рис. 94. Иммунопатологические синдромы с позиций иммунного ответа

системы за счет цитокиновой дисрегуляции, развития системного воспалительного ответа и поражения органов. Это все проявление системной воспалительной реакции, а возникшая путаница с их наименованием связана с тем, что в мире до настоящего времени нет единых подходов к терминологии, диагностике и лечению подобных состояний.

Локальный иммунный ответ

Наиважнейший диагностический шаг в диагностике иммунопатологии — выявление локальных (местных) и системных признаков воспаления, основного клинического синдрома местного воспаления, описанием которого в практике занимаются большинство врачей. Классическими основными местными признаками воспаления, описанными со времен Гиппократа, являются припухание, боль, краснота, локальное повышение температуры и нарушение функции органа (рис. 95). Однако в клинике гораздо важнее определить проявление системного воспалительного ответа.



Рис. 95. Местные признаки воспаления

Системный воспалительный ответ

Диагноз синдрома системного воспалительного ответа (ССВО или SIRS-systemic inflammatory response syndrome) чисто клинический, однако на основании предложенных критериев можно выделить две его разновидности (табл. 39):

I — с преобладание провоспалительной реакции (фебрильная температура, лейкоцитоз и/или смещение лейкоцитарной формулы влево);

II — с преобладание противовоспалительной реакции (гипотермия, лейкопения и/или лимфопения).

Таблица 39

Критерии синдрома системного воспалительного ответа

Показатель	Значения	
Температура тела	≥38 °С (фебрильная температура)	или ≤36 °С (гипотермия)
Частота сердечных сокращений	≥90/мин (тахикардия)	
Частота дыхания	≥20/мин или содержание диоксида углерода в крови ≤32 мм рт.ст.	
Клинический анализ крови	Лейкоцитоз >12×10 ⁹ /л или содержание молодых форм гранулоцитов более 10%	или лейкопения <4×10 ⁹ /л

Клинические проявления цитокиновой дисрегуляции суммированы нами из различных источников и указаны в табл. 40. Синдром определяется при наличии по крайней мере 5 диагностических критериев и/или мутации в гене, обуславливающим данное заболевание. Крайней степенью цитокиновой дисрегуляции является синдром вторичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH) — этот термин был впервые описан в ревматологии при потенциально опасном для жизни осложнении системных воспалительных заболеваний (системный ювенильный идиопатический артрит, системная красная волчанка (СКВ), болезнь Кавасаки и периодические лихорадки). Гемофагоцитоз определяется как поглощение клеток крови, включая эритроциты (повышение ферритина), лейкоциты и тромбоциты, фагоцитарными клетками. Помимо этого, острая фаза HLH связана с заметно повышенным уровнем провоспалительных цитокинов. Этот цитокиновый шторм запускает каскад воспалительных процессов, которые, если их не лечить, приводят к повреждению тканей и смерти.

Выделение и характеристика системного воспалительного ответа, как острого, так и хронического, обязательна для врача любой специальности. Его своевременное распознавание является основой эффективного лечения.

Таблица 40

Клинические проявления цитокиновой дисрегуляции

Симптом	Показатель
Лихорадка	Максимальный подъем температуры тела >38,5 °С или ≤36 °С (гипотермия)
Тахикардия	≥90/мин
Дыхательная недостаточность	Одышка ≥20/мин, или содержание диоксида углерода в крови ≤ 32 мм рт.ст., или сатурация менее 95%
Гепатомегалия/спленомегалия	Печень и/или селезенка пальпируются ниже края реберной дуги
Лейкоцитоз	>12×10 ⁹ /л
Цитопения с вовлечением более 2 клеточных ростков	НЬ <90 г/л, нейтрофилы < 1×10 ⁹ /л, тромбоциты <100×10 ⁹ /л
Лимфоцитопения	Менее 1,0×10 ⁹ /л
НК-клетки, ЦТЛ	Снижение или отсутствие активности
Цитокины ИЛ-6, ИЛ-1β, ФНО, IFNγ	Повышены
Уровень растворимого IL-2 (CD25)	>2400 ед/мл или очень высокие для своего возраста
Хемокин, индуцированный IFNγ, CXCL9	Повышен
С-реактивный белок	Более 5 мг/л
Ферритин в сыворотке	> 500 мкг/л
ЛДГ, АСТ, АЛТ	Повышены, связаны с поражением ткани
Гемостаз	Фибриноген <1,5 г/л, D-димер более 243 нг/мл
Гипертриглицеридемия	Триглицериды натощак >3,0 ммоль/л или превышение возрастной нормы на >3 стандартных отклонений
Прокальцитонин	Выше 2,0 нг/мл
Гемофагоцитоз	В биоптатах костного мозга, селезенки или лимфатических узлов

В последующем без дополнительных иммунологических исследований возможно диагностировать нарушения функции иммунной системы, происходящие в том или ином звене адаптивного иммунитета. Выделение определенных иммунопатологических синдромов является основанием для проведения топической диагностики иммунных нарушений.

Имунопатологические синдромы, связанные с первым типом клеточного иммунного ответа

Клеточно-эффекторная недостаточность. Этот синдром проявляется одним или несколькими следующими признаками:

- частые ОРВИ (более 4 раз в год);
- все виды бородавок, остроконечные кондиломы, опосредованные папилломавирусом человека и контагиозным моллюском (рис. 96);

- клинически выраженные инфекции, вызванные группой вирусов герпеса (рецидивирующее течение герпеса 1-го и 2-го типа, 3-го типа (герпес зостера), цитомегаловирусная инфекция, заболевания, вызванные вирусом Эпштейна–Барр; вирусные гепатиты (В, С, D, F, G);

- вирусные энтериты;

- повторные детские инфекции и/или инфекции, развивающиеся после проведения вакцинации (у детей в возрасте старше 7 лет и взрослых);

- грибковые инфекции (кандидомикоз, дерматомикоз) кожи, ногтей, слизистых оболочек (молочница), внутренних органов, трихофития;

- все виды опухолевых процессов.

Особо необходимо отметить, что любое развитие опухоли невозможно без нарушений клеточного звена иммунитета. Поэтому все пациенты с раком с момента диагностики этого заболевания (с позиций современной концепции иммуноредактирования) рассматриваются как иммунокомпрометированные больные, имеющие как минимум нарушения в клеточном звене иммунитета.

Клеточно-опосредованная цитотоксичность (гиперчувствительность замедленного типа)

Клинически это проявляется через 21–28 суток с развитием гранулемы (рис. 97), способствующей ограничению инфекции. К основным заболеваниям с реакциями гиперчувствительности замедленного типа относятся проказа, туберкулез, шистосомоз, саркоидоз, болезнь Крона, бруцеллез, сифилис.



Рис. 96. ВПЧ стоп



Рис. 97. Гранулема

Иммунопатологические синдромы, связанные со вторым типом клеточного иммунного ответа

Как мы описывали выше, Th2-иммунный ответ играет важную роль в гуморальном иммунитете и защите от гельминтозов и является основным механизмом патогенеза многих аллергических воспалительных заболеваний.

В связи с тем, что реализация данного типа ответа принадлежит тучным клеткам (резидентный тип клеток), клинические проявления гипореактивности данного типа ответа не определяются. Напротив, большое количество заболеваний (аллергия поражает более 30% населения всего мира) связано с гиперреактивным (гиперергическим) состоянием — гиперреакцией немедленного типа.

Гиперчувствительность немедленного типа. Ее развитие связано с действием IgE на тучных клетках. Синдром проявляется реакциями, возникающими обычно через 5–30 мин после контакта сенсibilизированного организма со специфическим аллергеном. Он включает атопические заболевания, которые представляют собой усиленные IgE-опосредованные иммунные реакции (астма, ринит, конъюнктивит и дерматит), и анафилаксию — аллергические реакциями на чужеродные аллергены (крапивница (рис. 98), ангионевротический отек, пищевая и лекарственная аллергия).

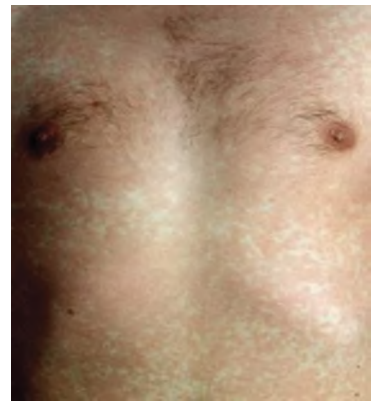


Рис. 98. Крапивница

Реакция может проявляться в разных частях тела, но может быть и системной (анафилактический шок), представляющей угрозу для жизни и требующей неотложной медицинской помощи. При местных реакциях чаще всего страдают дыхательные пути с формированием назального аллергического ринита, астмы, ангионевротического отека мягких тканей: глаза — аллергический конъюнктивит, кожа — крапивница, атопический дерматит, желудочно-кишечный тракт — аллергический энтерит. Широко распространена и лекарственная аллергия. К наиболее частым триггерам лекарственной аллергии относятся антибиотики, нестероидные противовоспалительные средства, контрастные вещества, анестетики.

Иммунопатологические синдромы, связанные с третьим типом клеточного иммунного ответа

Клинические проявления, связанные с нарушениями третьего типа клеточного иммунного ответа, весьма разнообразны. Однако с позиций патогенеза развития заболеваний можно выделить синдром недостаточности макрофагально-фагоцитарного звена и группу пациентов с аутовоспалительным синдромом.

Синдром недостаточности макрофагально-фагоцитарного звена. Диагностические признаки данного синдрома нередко идентичны признакам синдрома недостаточности гуморального звена иммунитета (см. ниже). Однако обычно при этом синдроме бактериальные инфекции протекают вяло, без высокой температуры и других признаков воспаления. Характерными признаками недостаточности макрофагально-фагоцитарного звена считаются рецидивирующие абсцессы разных локализаций и локальные бактериальные инфекции (рис. 99).



Рис. 99. Абсцесс голени

Аутовоспалительные синдромы патогенетически связаны с аномальной активацией врожденного иммунитета, клинически проявляются повторяющимися эпизодами лихорадки с системным воспалением, различными типами поражения кожи и/или слизистых, и/или суставов. Это основной механизм развития подагры, болезни Крона, псориаза, саркоидоза (рис. 100).



Рис. 100. Подагра

Также этот синдром встречается при злокачественных новообразованиях, инфекциях (например, COVID-19, вирус Эпштейна-Барр, сепсис) и первичных иммунодефицитах.

В реальной клинической практике эти заболевания довольно разнообразны, диагностика их затруднена и нередко отсрочена по времени. Основными проявлениями являются возвратные эпизоды системного воспалительного процесса (лихорадки, проявляются асептическим воспалением серозных оболочек, суставов, миндалин, кожных покровов, повышенные СОЭ, лейкоцитов, фибриногена).

Имунопатологические синдромы, связанные с нарушением гуморального звена иммунитета

С нарушениями гуморального звена иммунитета связана большая группа заболеваний. При недостаточности это чаще всего бактериальные инфекции

(сепсис, остеомиелит, бактериальные пневмонии, ангины, аднексит и др.), при гиперреакции это антителозависимая цитотоксическая гиперчувствительность

Гуморально-эффекторный иммунодефицит (недостаточность) диагностирован при наличии у больного:

- бактериальных инфекций верхних дыхательных путей и ЛОР-органов (более 3–4 раз в год с затяжным течением, с остаточными явлениями в виде субфебрилитета, астении, ангины (рис. 101);



Рис. 101. Ангина

- бактериальных инфекций легких (хронические бронхиты с бронхоспазмом или без него, пневмонии различной этиологии);

- бактериальных инфекций кожи и подкожной клетчатки (фурункулез, абсцессы, флегмоны, рецидивирующий парапроктит);

- инфекционно-воспалительных заболеваний органов мочеполовой системы (цистит, пиелонефрит и др.);

- других бактериальных инфекций (менингоэнцефалит, артрит, сепсис);

- заболеваний пищеварительного тракта, вызванных бактериями (стоматит, пародонтит, гастрит, гастродуоденит, язвенная болезнь, колит, энтероколит, холецистит, перитонит), дисбактериоз, в том числе кишечный.

Антителозависимый цитотоксический синдром (цитолитический или антителозависимая цитотоксическая гиперчувствительность) представляет собой процесс, при котором антитела направлены против антигенов собственных клеток (аутореакция). Впоследствии это приводит к лизису клеток, повреждению тканей и/или потере функции органа. Это один из механизмов развития аутоиммунных заболеваний, где в качестве антигена выступают собственные аутоантигены (рис. 102). Для развития этих реакций обычно требуется от 2 до 24 часов.

Повреждение может формироваться с помощью трех различных механизмов:

- антителозависимой клеточной цитотоксичности нейтрофилов и НК-клеток;
- активации комплемента;
- изменения активности клетки за счет связывания антител с рецепторами.



Рис. 102. Системная красная волчанка

Антитела против чужеродных антигенов также могут запускать воспаление по механизму

молекулярной мимикрии. Классический пример — острая ревматическая лихорадка, при которой антитела, направленные против стрептококковых антигенов, структурно имитируют сердечный миозин в сердце человека, что приводит к перекрестной реактивности этих антител против бактериальных антигенов и антигенов хозяина и, следовательно, к связыванию с миозином и повреждению сердечной ткани.

Многофакторные иммунопатологические синдромы

Синдром патогенного воздействия иммунных комплексов. Возникает при накоплении иммунных комплексов антиген–антитело, которые не были адекватно удалены клетками врожденного иммунитета (макрофагами и нейтрофилами) с формированием воспаления. Развитие обычно связано с хроническими персистирующими инфекциями, аутоиммунными заболеваниями, поступлением большого количества антигенов в сенсibilизированный или интактный организм (сывороточная болезнь). При менингококковой инфекции это патогномоничный признак (рис. 103).



Рис. 103. Менингококцемия

Выделяют три этапа развития данного синдрома: 1) образование мобильных иммунных комплексов; 2) депонирование иммунных комплексов в тканях; 3) развитие асептического воспаления.

Гипорегенеративный синдром. Определяется тогда, когда после повреждения не происходит возмещения дефекта ткани, идентичной погибшей, с восстановлением структуры и способности органа к выполнению специализированной функции (рис. 104). Наглядно это проявляется при хронических ранах (пролежень, диабетическая стопа и пр.). Однако как нарушение регенерации имеет смысл диагностировать такой синдром при фиброзах, прежде всего фиброзе печени.



Рис. 104. Пролежень

Синдром недостаточности регуляторного звена иммунитета

Диагностируется при сочетании вышеописанных синдромов. При этом необходимо выделить некоторые особенности течения заболеваний, имеющих

синдром недостаточности регуляторного звена иммунитета, а именно: устойчивость к стандартной специфической терапии или быстрое развитие рецидива после лечения; затяжное или хроническое течение с частыми рецидивами; активация условно-патогенной флоры, микст-инфекция, смена возбудителя в динамике болезни.

Клинические проявления метаболических нарушений клеток иммунной системы

Как описано нами выше, все процессы иммунной недостаточности имеют определенное метаболическое обеспечение. Не вызывает сомнений, что дисрегуляция метаболических процессов клеток иммунной системы влечет за собой нарушения со стороны иммунной системы и усугубляет течение патологического процесса.

В связи с этим необходимо определить клинические проявления дисфункции метаболизма клеток иммунной системы, а именно нарушения:

- энергетические;
- пластические;
- процессов утилизации.

Энергетические метаболические нарушения.

Энергетический гомеостаз клеток иммунной системы при нормальных условиях обеспечивается благодаря утилизации жирных кислот, глюкозы и молочной кислоты. В процессе метаболизма они преобразуются в ацетил-СоА и подвергаются окислению в митохондриях с образованием CO_2 и H_2O . Образовавшаяся энергия депонируется в макроэргических связях АТФ и расходуется в процессе выполнения функции клетки. Полное обновление внутриклеточных запасов АТФ происходит каждые 10–15 с. При нагрузке энергетические потребности клетки удовлетворяются за счет возрастания утилизации жиров и лактата через ФАД-зависимый участок цикла Кребса (быстрый метаболический кластер митохондрий). Снижение оксигенации клеток иммунной системы вызывает угнетение аэробного синтеза АТФ. Компенсаторная активация быстрого метаболического кластера митохондрий сдерживается нарастающим торможением фермента сукцинатдегидрогеназы продуктом утилизации янтарной кислоты — оксалоацетатом.

Снижение запасов АТФ восполняется усилением захвата глюкозы и быстрым истощением запасов гликогена. На последующих этапах синтез АТФ происходит благодаря активации гликолиза. В результате накапливается лактат, разобщается окислительное фосфорилирование и развивается лактоацидоз. Лактоацидоз активирует фосфолипазу А₂, обуславливающую повреждение мембранных структур и инициирование процессов перекисного окисления липидов. В результате формируется гипоксический тип метаболизма.

Клинически кислородная (энергетическая) недостаточность на первых этапах проявляется учащением пульса и одышкой при незначительных физических нагрузках. В дальнейшем при более тяжелой степени тахикардия и одышка наблюдаются уже в покое. Происходит нарушение гемодинамики (гемодинамические признаки застоя крови в большом или малом круге кровообращения с нарушением функции органов). Развивается неспособность переносить любую физическую активность без дискомфорта, одышки и слабости в покое и при минимальной физической нагрузке, «сердечные» отеки и/или асцит. Появляются признаки нарушений микроциркуляции: бледность кожных покровов, мраморность, умеренный цианоз/акроцианоз, умеренная пастозность нижних конечностей. Выраженные нарушения микроциркуляции — диффузный цианоз. На этом фоне функции клеток иммунной системы резко снижаются. Прежде всего, это находит отражение в неадекватном иммунном ответе, отражающемся в нарушении миграции клеток иммунной системы, угнетается фагоцитоз, снижается киллерная активность NK-клеток и Т-клеток, угнетается синтез иммуноглобулинов и цитокинов. За счет угнетения энергетических процессов замедляются процессы пролиферации клеток. Все это находит отражение при лабораторных исследованиях. Согласно нашим исследованиям, сниженные энергетические процессы в клетках иммунной системы чаще всего наблюдаются при клеточно-эффекторных и макрофагально-фагоцитарных нарушениях.

Пластические метаболические нарушения

Пластические нарушения, прежде всего, связаны с нарушениями процессов пролиферации всех типов клеток иммунной системы. Помимо этого, страдает синтез иммуноглобулинов и цитокинов.

Клинические признаки данных нарушений проявляются в виде неадекватного иммунного ответа и нарушений процессов регенерации. Течение заболевания, как правило, протекает вяло, без высокой температуры и других признаков воспаления. Реабилитационный период протекает длительно, нередко после повреждения не происходит возмещения дефекта ткани, идентичной погибшей, с восстановлением структуры, и орган и/или система неспособны выполнять специализированную функцию. При лабораторных исследованиях регистрируется лейкопения практически любого ростка крови. Снижение пластических процессов чаще всего сопровождается гуморально-эффекторную недостаточность.

Метаболические нарушения, связанные с процессами утилизации

С интоксикацией приходится сталкиваться в самых разнообразных отраслях медицинской практики. Морфологической основой интоксикации является взаимодействие избыточного количества физиологических продуктов клеточного обмена (кетоновые тела, мочевины, креатинин, мочевая кислота, молочная кислота и пр.), а в некоторых случаях — токсических органических соединений (аммиак) с рецепторами клеток с последующим изменением различных внутри-

и внеклеточных регуляторных молекул. Следствием состоявшегося взаимодействия являются изменения тех или иных биохимических процессов и нарушение функционального состояния тканей и органов, которые также стимулируются биологически активными веществами и медиаторами (IL, IFN, TNF- α , кинины, серотонин, биогенные амины и пр.). При иммунных нарушениях значительная роль принадлежит и бактериальным эндотоксинам (липополисахариды), и иным бактериальным составляющим (тейхоевые кислоты, пептидогликаны, манноза и прочее), которые являются первичным биохимическим субстратом эндотоксико́за.

Условием развития интоксикации, которую понимают как динамический процесс, является доминирование токсинов над возможностями систем детоксикации их элиминировать.

Наиболее известными путями детоксикации являются:

- метаболические механизмы (утилизация кетоновых тел);
- экскреторные механизмы (выведение с мочой, выдыхаемым воздухом и содержимым желудочно-кишечного тракта);
- иммунные механизмы (поглощение токсинов клетками моноцитарно-макрофагальной системы, связывание нейтрализующими антителами и др.).

Помимо этого, на формирование интоксикационного синдрома и его клинических проявлений несомненное влияние оказывают развивающиеся водно-электролитные, осмотические и кислотно-основные нарушения.

Минимальная симптоматика интоксикации проявляется как легкое нарушение памяти, концентрации внимания, когнитивных функций, координации. Отмечаются незначительная диспепсия, сухость во рту, утомляемость, полидипсия, изостенурия, а при объективном осмотре — увеличение размеров печени (до 2 см). Суточный диурез, как правило, увеличен до 2–2,5 л. Лабораторные и функциональные показатели почек на фоне диуретической терапии — в пределах нормы или не превышают следующие значения: мочеви́на — не более 15 ммоль/л, креатинин — не более 0,30 ммоль/л, калий — не более 4,5 ммоль/л, билирубин — до 50 ммоль/л, АЛТ — до 60 Ед/л, отношение АСТ/АЛТ — 0,5–1,0.

Более тяжелые состояния сопровождаются расстройствами сна, нарушением ритма сна, эйфорией, раздражительностью. Замедлена способность к выполнению интеллектуальных заданий. Наблюдается снижение внимания, в дальнейшем развиваются летаргия или апатия, дезориентация, неадекватное поведение, невнятная речь, легкая дезориентация во времени и в пространстве. Больные жалуются на общую слабость, утомляемость, периодическое ухудшение аппетита, появление сухости во рту, жажды. Отмечается смена улучшения и ухудшения состояния больного. Содержание билирубина — до 200 ммоль/л, АЛТ >60 Ед/л, умеренно проявляются печеночная энцефалопатия и гепатоассоциированный геморрагический диатез, увеличивается размер печени (более чем на 3 см).

Периодически проявляется гиперазотемия, оставаясь в пределах 13–20 ммоль/л по мочеvine и 0,35–0,70 ммоль/л по креатинину. Отмечаются нарушения водно-электролитного баланса и кислотно-основного состояния.

Тяжелая степень сочетается с более глубоким поражением сознания, вплоть до комы. Нарастает общая слабость, отмечаются атрофия мышц, одутловатость лица, сухость кожных покровов с зудом, точечные кровоизлияния, сонливость, апатия, возможно развитие перикардита, миокардита, отека легких, кровотечения, вызванные патологией гемостаза, содержание билирубина — более 300 ммоль/л (при отсутствии препятствия оттоку желчи), АлАТ >10 ммоль/(ч·л), наблюдаются повышение билирубина (более 50 ммоль/л в сут), печеночная кома, кровотечение, концентрация мочевины плазмы крови возрастает до 25 ммоль/л и выше, креатинин — более 0,80 ммоль/л, калий — более 6,5 ммоль/л, нарастают дисэлектролитемия и нарушение всех видов обмена.

Учитывая, что большинство процессов иммунной недостаточности имеют определенное метаболическое обеспечение, на их течение и исход большое влияние оказывают витамины. Не вызывает сомнений, что недостаточность витаминов влечет за собой нарушения со стороны иммунной системы и усугубляет течение патологического процесса.

Клинические проявления витаминной недостаточности

Витаминная недостаточность — это группа патологических состояний, обусловленных снижением обеспечения организма одного или нескольких витаминов. Возникновение этих состояний обусловлено важностью витаминов для нормального функционирования многочисленных физиологических и метаболических процессов.

В зависимости от тяжести витаминной недостаточности выделяют следующие патологические состояния: авитаминоз, гиповитаминоз и субнормальная обеспеченность витаминами (называемая также маргинальной или биохимической формой витаминной недостаточности).

Под авитаминозами понимают состояние практически полного истощения витаминных ресурсов организма с возникновением специфического патологического симптомокомплекса, например рахита, цинги, пеллагры, бери-бери. Клинические проявления авитаминозов врачам известны давно. Так, бери-бери была описана в древнекитайском каноне медицины 2500 лет тому назад. В античной Греции и Египте была известна клиническая картина авитаминоза А. Цинга часто возникала среди мореплавателей в XVII–XVIII веках. В настоящее время классические авитаминозы встречаются весьма редко, в основном в условиях длительного голода, когда развивается алиментарная дистрофия, при вынужденном резком обеднении рациона питания, нерациональном питании. Также авитаминозы могут возникнуть при некоторых наследственных ферментопатиях и

тяжелых заболеваниях пищеварительной системы, в сочетании с синдромом мальабсорбции.

Гиповитаминозами считают состояния резкого (но не полного) снижения запасов витаминов в организме. Они проявляются в основном малоспецифическими и нерезко выраженными клиническими симптомами, нередко общими для различных видов гиповитаминозов (как, например, снижение аппетита и работоспособности, быстрая утомляемость и т. п.), а также некоторых более специфическими микросимптомами, характерными для недостаточности того или иного витамина. Гиповитаминозы более распространены в клинической практике, чем авитаминозы. Согласно данным Института питания РАМН, по результатам обследования трудоспособного населения различных регионов России (Москва, Екатеринбург, Оренбург, Кузбасс, Западная и Восточная Сибирь, Дальний Восток, Башкирия, Республика Марий Эл) выявлена недостаточная обеспеченность витаминами В1, В2, В6 и фолиевой кислотой у 60–95% взрослого населения России, в том числе у 20–75% — до степени глубокого дефицита. Недостаточная обеспеченность витамином В₁₂ выявлена у 30–65% обследованных. Характерной особенностью состояния обеспеченности населения витаминами является сочетанный недостаток (полигиповитаминоз) витаминов С, группы В и каротина независимо от времени года, места проживания и профессиональной принадлежности.

Субнормальная обеспеченность витаминами представляет собой доклиническую стадию дефицита витаминов, проявляющуюся в основном нарушениями метаболических и физиологических реакций, в которых участвует данный витамин, а также отдельными клиническими микросимптомами.

Выделяют три основные причины, приводящие к развитию витаминной недостаточности.

1. Недостаточность поступления витаминов:

- недостаточное содержание витаминов в суточном рационе;
- разрушение витаминов при неправильной кулинарной обработке и хранении пищи;
- действие антивитаминовых факторов, содержащихся в продуктах;
- нарушение соотношений между витаминами и другими нутриентами, а также между отдельными витаминами в рационе;
- анорексия;
- пищевые извращения, религиозные запреты на ряд продуктов.

Одной из основных причин гиповитаминоза на сегодняшний день остается алиментарная недостаточность витаминов. Изменения в образе жизни современного человека, переход от физического труда к интенсивному умственному, недостаточно подвижный образ жизни привели к снижению общего количества пищи, которое потребляет человек, и, естественно, уменьшению количества

поступающих с ней витаминов. Кроме того, необходимо отметить, что человек употребляет в основном пищу, которая подверглась кулинарной обработке, что также приводит к уменьшению содержания витаминов в ней. По данным ряда исследователей, овощи и фрукты, выращенные в теплицах, содержат на 40% меньше витаминов по сравнению с теми, которые выросли в естественных условиях. Достаточно большую роль в высоком распространении гиповитаминозов играют различные диеты, а также запреты, налагаемые на ряд продуктов у некоторых народностей и сторонников нетрадиционного питания.

2. Угнетение нормальной кишечной микрофлоры, продуцирующей витамины, и нарушения усвоения витаминов:

- заболевания желудочно-кишечного тракта;
- длительные курсы антибактериальной терапии;
- нарушение всасывания витаминов в желудочно-кишечном тракте: врожденные дефекты транспортных и ферментных механизмов всасывания; заболевания желудка, кишечника, гепатобилиарной системы; конкурентные отношения с всасыванием других витаминов и нутриентов;
- сокращение потребления липидов, приводящее к сбоям в абсорбции витаминов А, D, E, K;
- утилизация поступающих с пищей витаминов кишечными паразитами и патогенной кишечной микрофлорой;
- нарушение образования биологически активных и транспортных форм витаминов;
- наследственные аномалии; приобретенные заболевания; действие токсических и инфекционных агентов;
- антивитаминозное действие лекарственных веществ.

При заболеваниях желудочно-кишечного тракта развитие гиповитаминозов связано с нарушениями кишечной микрофлоры, продуцирующей ряд витаминов, а также в связи с нарушением процессов всасывания. К этой группе относятся пациенты, страдающие воспалительными заболеваниями желудка, кишечника, гепатобилиарной системы, а также пациенты, перенесшие хирургические вмешательства на желудочно-кишечном тракте. По данным статистики, нерациональное назначение антибиотиков составляет порядка 34% от общего количества назначений. Назначение антибиотиков при ОРВИ, по данным исследований, составляет 10% всех назначений антибактериальных средств. В результате нерациональной химиотерапии большое количество пациентов страдают нарушением микрофлоры кишечника и, как следствие, недостаточным синтезом витаминов группы В.

3. Увеличение потребности организма в витаминах:

- дети, подростки;
- беременные женщины и кормящие матери;

- интенсивная физическая нагрузка;
- стрессовые состояния;
- особые климатические условия;
- заболевания внутренних органов и желез внутренней секреции;
- инфекционные заболевания и интоксикации.

Ряд физиологических и патофизиологических состояний организма требуют повышенного количества витаминов. К этим состояниям относятся: инфекционные заболевания и интоксикации, заболевания внутренних органов и желез внутренней секреции, экстремальные климатические условия проживания, неблагоприятная экологическая обстановка, действие вредных факторов на производстве, повышенная физическая и умственная нагрузка, стресс.

Клиническая картина гиповитаминозов

Гиповитаминоз А. Наряду с универсальными причинами гиповитаминозов недостаточности ретинола способствуют длительное пребывание на солнце в условиях жары, воздействие рентгеновского излучения, снижающего резервы витамина А в печени, параллельный прием высоких доз минеральных масел, немочицина, витамина Е, уменьшающих абсорбцию ретинола. Частичной причиной возникновения гиповитаминоза А может служить и недостаточное поступление в организм его предшественника — β-каротина, либо жирных кислот, участвующих в превращении этого провитамина в ретинол.

Один из основных симптомов этого заболевания — «куриная слепота» (резкое ухудшение зрения в условиях пониженной освещенности). Он обусловлен тем, что ретинол участвует в синтезе родопсина, необходимого для зрительной адаптации в темноте. Ретинолу принадлежит важная роль в поддержании нормального состояния и обновлении кожи и эпителия слизистых оболочек, обеспечении нормальной дифференциации эпителиальной ткани, формировании и росте костей (стимулирует синтез коллагена), зубов (активный участник минерального обмена), сперматогенезе. Как следствие, при его недостатке возникают сухость и шелушение кожных покровов, гиперкератоз, перхоть, склонность к кожным заболеваниям, повышенная болевая чувствительность, гиперестезия зубной эмали, нарушения эрекции и эякуляции. Другими нарушениями при нехватке ретинола, связанными с его многовекторным воздействием на метаболические процессы в различных органах и тканях, являются истощение, бессонница, ослабление иммунитета.

Общепринятой классификации нарушений при гиповитаминозе А нет. Наиболее ранним клиническим проявлением является гемералопия («куриная слепота»). Характерно усиление процесса ороговения. Кожа сухая, иногда с желтоватым или сероватым оттенком. На разгибательных поверхностях коленных и локтевых суставов наблюдаются папулезная сыпь и мелкое шелушение, напоминающее припудривание. Иногда отмечается ксерофтальмия с появлением на

слизистой оболочке роговицы бляшек Бито (небольшие серые бляшки с пенистой структурой). Заживление ран медленное. Развитие грануляций недостаточное. Наблюдается предрасположенность к развитию пиодермии, стоматитов, инфекционных заболеваний.

Верификация диагноза проводится при биомикроскопии глаза (на слизистой оболочке конъюнктивы могут выявляться белесые и желтоватые мелкие бляшки), определении содержания в сыворотке крови витамина А или каротина (ниже 200 мкг/л). Также исследуют темновую адаптацию зрения, которая при недостаточности ретинола существенно снижается.

Гиповитаминоз В₁. Специфическими факторами развития тиаминовой недостаточности может служить употребление большого количества алкоголя и чая (снижают абсорбцию витамина). Потребность в витамине В₁ возрастает у пожилых людей (способность организма абсорбировать тиамин с возрастом уменьшается), пациентов с заболеваниями щитовидной железы.

При дефиците тиамина происходит разрушение ацетилхолина (основного медиатора при передаче нервных импульсов) под действием кетокислот. В тканях и крови накапливаются недоокисленные продукты: пировиноградная кислота, молочная кислота и др. При этом нарушается деятельность различных отделов нервной системы (особенно периферической нервной системы), скелетных мышц и миокарда, а также функция желудочно-кишечного тракта. Вследствие этого возникает комплекс психоневрологических расстройств: повышенная нервная возбудимость, тревога, депрессия, нарушение когнитивных функций, онемение рук и ног, боли, ухудшение координации и др. У больных хроническим алкоголизмом отчасти вследствие недостаточности тиамина, а также пиридоксина развивается энцефалопатия. Патологическое состояние, обусловленное дефицитом этого витамина в организме и проявляющееся нарушениями преимущественно со стороны нервной системы, сердца и кишечника, в тяжелых случаях характеризуется в виде бери-бери.

В клиническом течении бери-бери различают 3 формы:

- паралитическую (полиневритическую);
- сердечную;
- отечную.

В клинической симптоматике на предварительном этапе характерны ухудшение аппетита, тошнота, склонность к запорам, парестезии в ногах, боль в икроножных мышцах при ходьбе, ухудшение сна, раздражительность, плаксивость, снижение физической и психической работоспособности, иногда умеренное похудание, лабильность пульса на фоне общей психоэмоциональной лабильности. Язык суховат, живот нерезко вздут, умеренно снижена болевая и глубокая чувствительность в области стоп и голеней, нерезко ослаблены сухожильные рефлексы (больше на ногах). Дефицит тиамина часто сочетается с недостатком других витаминов группы В (рибофлавин, пиридоксин, никотиновая кислота и др.), поэтому симптоматика может быть разнообразной.

При паралитической форме бери-бери на первом плане определяются выраженное похудание и симптомы прогрессирующего полиневрита нижних конечностей, протекающего без болевого синдрома. Характерны разнообразные парестезии, снижение вначале болевой, а затем глубокой чувствительности, ослабление сухожильных рефлексов, атактические явления, мышечная слабость, гипотрофия мышц, их парезы и параличи по периферическому типу. Эти нервно-мышечные расстройства вначале развиваются на нижних конечностях, распространяясь затем на руки и туловище. В тяжелых случаях поражаются и черепные нервы.

Для сердечной формы бери-бери характерно поражение сердца, преимущественно правого желудочка, поэтому у больных нет цианоза. Больные жалуются на одышку, сердцебиение, часто на отеки. Выявляют тахикардию, набухание шейных вен, расширение границ сердца вправо, негрубый систолический шум у верхушки, увеличение печени, часто асцит, отеки на ногах. Нарушения гемодинамики обычно развиваются постепенно.

Для отечной формы, в отличие от «сухой», характерно раннее появление отеков, опережающих симптомы полиневрита. Вначале их отмечают над лодыжками, затем они распространяются вверх на голени, бедра; позднее присоединяется асцит.

Верификация диагноза. Диагноз гиповитаминоза В₁ подтверждается уменьшением содержания тиамина в крови (в сыворотке ниже 5 мкг/л, в эритроцитах ниже 30 мкг/л), резким повышением концентрации пировиноградной кислоты в крови (выше 0,01 г/л) и моче (выше 30 мг/сут), повышением содержания в крови молочной кислоты (выше 200 мг/л). В последнее время с этой целью используют также ряд более сложных современных методов.

Дифференциальный диагноз проводят с инфекционными полиневритами, хронической интоксикацией алкоголем или свинцом. Выявить интоксикацию свинцом, кроме анамнеза, помогают характерная кайма на деснах, анемия с базофильной пунктуацией эритроцитов, выделение свинца с мочой. При инфекционных полиневритах наблюдается четкая связь с инфекцией. Идентифицировать полиневритический или полиневралгический синдром у больных хроническим алкоголизмом довольно трудно, так как он нередко связан с дефицитом питания.

Гиповитаминоз В₂. Замедлению всасывания рибофлавина способствуют злоупотребление алкоголем, прием трициклических антидепрессантов, фенотиазинов, блокаторов кальциевых каналов.

Поскольку витамин В₂ проявляет выраженное многостороннее метаболическое действие на организм (участвует в тканевом дыхании, обмене белков, жиров и углеводов, синтезе гемоглобина и эритропоэтина), его дефицит приводит к общей слабости, головокружениям, гипотрофии, снижению аппетита. Подобно ретинолу, В₂ участвует в темновой адаптации зрительной системы; как следствие, его нехватка вызывает резь в глазах, притупление сумеречного зрения. Также при гиповитаминозе В₂ нарушается утилизация кислорода клетками кожи,

из-за чего возможны трещины и ранки в уголках рта, покраснение ротовой полости и неба, воспаление языка, дерматиты, алопеция.

Для гиповитаминозов витамина В₂ на первом этапе характерны неспецифические нарушения общего состояния с нарушением сумеречного зрения. В последующем развиваются ангулярный хейлит (мацерация кожи в уголках рта, приводящая в дальнейшем к возникновению поверхностных трещин, иногда оставляющих после себя рубцы, при инфицировании трещин *Candida albicans* возникают заеды), глоссит (язык приобретает ярко-красный цвет, его слизистая оболочка становится сухой), поражение кожи (шелушение, целлюлит, накопление в волосяных фолликулах секрета сальных желез, что обуславливает себорею). В редких случаях возможны конъюнктивит и васкуляризация роговицы с развитием кератита. На поздних стадиях присоединяются нарушения нервной системы: парестезии, повышение сухожильных рефлексов, атаксия, а также гипохромная анемия. При недостаточности витамина В₂, развившейся у беременных, возникают аномалии развития скелета плода.

Диагноз должен быть основан на характерных клинических признаках, биохимических исследованиях (доказательно снижение содержания рибофлавина в суточной моче ниже 100 мкг, в часовой моче — ниже 10 мкг, содержание в сыворотке крови — ниже 3 мкг/л, эритроцитах — ниже 100 мкг/л). Имеет значение снижение темновой адаптации.

Дифференциальный диагноз проводят с пеллагрой, авитаминозом А, рассеянным склерозом. В сомнительных случаях наиболее доказательны результаты исследований содержания витаминов в крови и моче.

Гиповитаминоз В₆. Потребность в пиридоксине повышают некоторые заболевания (гепатит, лучевая болезнь), злоупотребление алкоголем и табаком. Фактором риска гиповитаминоза В₆ можно считать недостаточное поступление в организм рибофлавина, который способствует превращению в организме пиридоксина в биоактивную форму.

Пиридоксин выступает, прежде всего, регулятором синтеза нейромедиаторов центральной нервной системы (ЦНС) и периферической нервной системы, в связи с чем его дефицит вызывает раздражительность, заторможенность, депрессии, судороги, бессонницу, нарушения координации. Сбои в обмене аминокислот, липидов, гистамина, полиненасыщенных жирных кислот и других веществ, вызванные недостатком В₆, чреваты диспептическими расстройствами, поражениями кожи.

Классификация недостаточности витамина В₆ не разработана.

При нерезко выраженных формах гиповитаминоза В₆ для диагностики имеют значение те же симптомы, что и при гипорибофлавинозе: хейлоз, глоссит, себорейный дерматит (преимущественно на лице), конъюнктивит. Отмечают также ухудшение аппетита, тошноту. Верификацию диагноза проводят лабораторными методами. При гиповитаминозе В₆ содержание 4-пиридоксиновой кислоты в суточной моче ниже 0,5 мг, выделение ксантуреновой кислоты (после

приема 10 г триптофана) превышает 50 мг. Содержание пиридоксина в цельной крови ниже 50 мкг/л или пиридоксальфосфата ниже 3,6 нг/мл. Эти четыре параметра подтверждают гиповитаминоз В₆.

Дифференциальная диагностика та же, что и при гипорибофлавинозе. Различить эти две формы гиповитаминозов можно только по результатам лабораторных исследований.

Гиповитаминоз фолиевой кислоты (В₉) Гиповитаминоз В₉ часто наблюдается у больных псориазом. Истощению запасов фолата в организме способствует злоупотребление алкоголем. Кроме того, потребность в витамине В₉ возрастает при длительном приеме анальгетиков, антиконвульсантов, эстрогенов, пероральных контрацептивов. К снижению абсорбции фолиевой кислоты приводит прием антацидов, сульфасалазина.

Фолиевая кислота играет большую роль при беременности. Недостаточное поступление ее в организм матери грозит плоду врожденными дефектами нервных волокон, анэнцефалией и расщеплением позвоночной трубки. В силу большого влияния фолатов на процессы нормального созревания мегалобластов, образования нормобластов, стимуляцию эритропоэза их дефицит приводит к различным нарушениям кроветворения (вплоть до макроцитарной гиперхромной анемии), иммунным нарушениям.

Угнетение нормального метаболизма нуклеиновых кислот, пуринов, пиримидинов, аминокислот, холина, гистидина и других соединений, наблюдаемое при гиповитаминозе В₉, не всегда проявляется видимыми симптомами. Но при этом исследования показали, что дефицит витамина В₉ наблюдается у 20–100% населения, в зависимости от региона. Это один из самых часто встречающихся дефицитов витаминов. При этом даже при отсутствии каких-либо клинических проявлений повышается риск инфарктов и инсультов, снижается иммунитет. Клинически недостаточный запас фолатов является частой причиной мегалобластной анемии. При этом виде анемии не только уменьшается количество эритроцитов, но и нарушается их функция, так как большинство из них выходят из костного мозга незрелыми. Если этот дефицит не скорректировать, возникают такие симптомы, как потеря аппетита, раздражительность, утомляемость, затем присоединяются рвота, диарея, выпадение волос. Могут появиться изменения кожи, болезненные язвочки во рту и в глотке. Возрастание потребности в фолиевой кислоте наблюдается при различных заболеваниях: лейкомии, гемолитической анемии, хронических инфекциях, карциноматозе.

Особенно важно не допустить недостаточность фолиевой кислоты при беременности. Поскольку фолиевая кислота имеет важное значение в процессах деления клеток, что особенно значимо для тканей, которые активно делятся и дифференцируются (а это в первую очередь нервная ткань плода), то недостаток этого витамина, прежде всего, затрагивает именно формирующуюся нервную систему. Так, при значительном дефиците фолиевой кислоты возможно формирование дефектов нервной трубки, гидроцефалии, анэнцефалии (отсутствия

головного мозга), мозговых грыж и т.п.; увеличивается риск задержки умственного развития ребенка. Дефицит фолиевой кислоты играет огромную роль и в ходе беременности, так как в это время происходит формирование не только органов и тканей плода, но и ткани плаценты, а также новых сосудов в матке. При недостатке фолиевой кислоты этот процесс может нарушиться, что повышает вероятность преждевременного прерывания беременности.

Дефицит фолиевой кислоты у беременных может проявиться уже на 1–4-й неделе беременности, в зависимости от особенностей питания и предшествующего запаса данного витамина в организме. Ранние симптомы этого состояния могут проявляться в виде утомляемости, раздражительности и потери аппетита. В этой связи особенно важно не забыть о дополнительном приеме фолиевой кислоты в период грудного вскармливания, так как молоко в любом случае содержит достаточное для развития малыша количество фолиевой кислоты, то есть при недостатке поступления витамина с пищей особенно велика вероятность появления вышеописанных симптомов, усугубления послеродовой депрессии.

В последние 10–15 лет накопилось немало убедительных данных, свидетельствующих о том, что недостаток фолиевой кислоты, нарушая обмен аминокислот, содержащих серу, ведет к накоплению в крови особого вещества — гомоцистеина, оказывающего повреждающее воздействие на стенку кровеносных сосудов, что способствует развитию атеросклероза и повышает частоту инфарктов и инсультов.

Гиповитаминоз В₁₂ Уменьшение абсорбции цианокобаламина и повышение потребности в нем вызывают аминокликозиды, салицилаты, противозипелитические препараты, колхицин, препараты калия. Повышена потребность в нем у пациентов с хронической диареей.

Всасывание и защита от разрушения цианокобаламина в желудочно-кишечном тракте контролируется внутренним фактором Касла (мукопротеидом, который вырабатывается специфическими клетками фундальной части желудка). Витамин В₁₂ необходим для нормального кроветворения, образования эпителиальных клеток, функционирования нервной системы (участвует в образовании миелина), процессов роста и регенерации. В₁₂-дефицитная анемия обычно развивается у лиц среднего и пожилого возраста. Отмечено учащение частоты этой болезни у людей, не употребляющих мясных и молочных продуктов. Среди групп населения, в которых нередко регистрируется инвазия широким лентецом (Карелия, некоторые районы Сибири и др.), обнаруживают случаи ботриоцефальной В₁₂-дефицитной анемии.

Недостаточность витамина В₁₂ проявляется поражением кроветворной ткани, пищеварительной и нервной систем. При авитаминозах развиваются В₁₂-дефицитная анемия (пернициозная, злокачественная анемия, анемия Аддисона–Бирмера) и фуникулярный миелоз. Последний синдром редко возникает самостоятельно, обычно он сочетается с мегалобластной анемией. Гиповитаминозы могут сопровождаться легкими парестезиями в конечностях, жжением в языке

(язык становится ярко-красным, гладким, высокочувствительным к химическим раздражителям, отмечаются атрофия слизистой оболочки желудка и ахилия), умеренной макроцитарной (гиперхромной) анемией. Развивается расстройство нервной системы (парестезии, болевые ощущения, нарушения походки).

Общепринятой классификации V_{12} -витаминной недостаточности нет. Практически обычно используют классификацию, основанную на патогенетическом и клиническом принципах. Соответственно, различают экзогенные (алиментарные) и эндогенные (от нарушения всасывания или повышенного потребления) виды недостаточности цианокобаламина. Из последней группы выделяют в качестве самостоятельной нозологической формы мегалобластную анемию, а иногда и фуникулярный миелоз. Остальные разновидности эндогенной недостаточности витамина V_{12} , развивающиеся в результате разнообразных тяжелых заболеваний желудка и кишечника или больших операций на этих органах, являются симптоматическими.

Предварительный диагноз V_{12} -дефицитной анемии базируется на выявлении трех основных синдромов: мегалобластной (гиперхромной) анемии, гистамин-устойчивой ахлоргидрии желудка, фуникулярного миелоза и полинейропатии. Характерен также глоссит. Нередко, однако, при авитаминозе V_{12} выраженных явлений фуникулярного миелоза не обнаруживают и неврологические расстройства ограничиваются лишь нерезкой полинейропатией нижних конечностей, что связано, по-видимому, с успехами заместительной терапии.

Диагностика гиповитаминоза V_{12} на основе лишь клинических критериев весьма затруднена. Его неспецифическими признаками могут быть: ухудшение аппетита, неустойчивый стул, бледность кожи и слизистых оболочек, ощущение легкого жжения в языке, покраснение его кончика, нерезкие парестезии ног. Диагностическое значение этих признаков усиливается, если имеются соответствующие анамнестические данные (алиментарные нарушения) или обнаруживается заболевание.

Диагностика развернутой стадии авитаминоза V_{12} особых трудностей не вызывает. Клиническая картина имеет определенное сходство с инфекционным эндокардитом и некоторыми формами приобретенных гемолитических анемий. Однако при этих заболеваниях не наблюдается признаков фуникулярного миелоза, а анемия бывает гипо- или нормохромной. К тому же каждая из болезней имеет свои специфические признаки (например, порок сердца при инфекционном эндокардите). В сомнительных случаях с целью дифференциальной диагностики проводят стерильную пункцию (или трепанобиопсию крыла подвздошной кости). Обнаружение в костном мозге мегалобластов и мегалоцитов окончательно верифицирует диагноз. Диагностические сомнения могут возникнуть, когда авитаминоз V_{12} развивается у лиц пожилого возраста с гипертонической болезнью и облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей. В этих случаях головокружения, обусловленные анемией, могут ошибочно оцениваться как гипертонические кризы, а парестезии в ногах — как проявления ишемии.

Врач должен помнить о возможности рассматриваемой сочетанной патологии и не пропустить признаки анемии, глоссита, изменений сухожильных рефлексов. Обязателен клинический анализ крови, что может решить диагноз.

После того как у больного клинически установлена недостаточность витамина В₁₂, следует провести дифференциальную диагностику между экзогенной (алиментарной) недостаточностью, В₁₂-дефицитной анемией, эндогенной симптоматической недостаточностью В₁₂, обусловленной опухолевым поражением желудка (рак или полипоз), и ботриоцефальной анемией. Очень редко встречающийся в наших условиях экзогенный вариант авитаминоза В₁₂ может диагностироваться при достоверном установлении продолжительного недостаточного поступления цианокобаламина с пищей и при исключении эндогенных нарушений всасывания витамина. При ботриоцефальной анемии практически не наблюдается признаков поражения спинного мозга; характерны симптомы гельминтозов (неприятные ощущения в животе, тошнота, зуд кожи, выраженная эозинофилия, отхождение члеников глистов, яйца глистов в кале). Для выявления или исключения опухоли желудка проводят его рентгенологическое исследование и гастроскопию. Во всех сомнительных случаях проводится стерильная пункция. У больных после травматических операций на желудке и кишечнике (гастрэктомия, субтотальная резекция желудка, резекция тонкой кишки и др.) при тяжелых заболеваниях тонкой кишки (спру, терминальный илеит) нужно внимательно выявлять клинические симптомы недостаточности витамина В₁₂, начиная с неспецифических ранних признаков (см. выше).

Вспомогательное значение в этих случаях имеет определение концентрации витамина В₁₂ и его метаболитов в крови и моче. При дефиците цианокобаламина его содержание в суточной моче ниже 20 нг, а метилмалоновой кислоты — выше 5 мг, в сыворотке крови концентрация витамина В₁₂ ниже 100 нг/мл. Эти лабораторные исследования проводятся и при подозрении на экзогенное (алиментарное) развитие дефицита витамина В₁₂ и во всех неясных случаях.

Гиповитаминоз С. К значительному повышению потребности организма в аскорбиновой кислоте приводят курение, частое употребление спиртных напитков, прием ацетилсалициловой кислоты (снижает абсорбцию витамина С на 30%), салицилатов, лекарств хинолинового ряда, хлористого кальция, длительное применение глюкокортикоидов.

Гиповитаминоз С приводит к нарушению окислительно-восстановительных процессов в организме, повышению проницаемости и ломкости сосудов, ослаблению сопротивляемости организма инфекциям. Клинически данное заболевание проявляется слабостью и раздражительностью, отечностью и кровоточивостью десен, носовыми кровотечениями, точечными кровоизлияниями на сгибах шеи и конечностей. Также отмечаются боли в конечностях (из-за нарушения синтеза коллагена и проколлагена, ослабления ингибирующего действия на простагландины), сухостью и шелушением кожи, микрогематурией.

Классические проявления гиповитаминоза С в виде цинги или скорбута в настоящее время не диагностируются. Время, необходимое для развития клинических признаков недостаточности при исключении витамина С из рациона питания, колеблется от 1 до 3 месяцев. Считается, что при этом пул витамина в организме истощается со скоростью около 4% в сутки.

Начальная форма недостаточности витамина проявляется снижением умственной и физической работоспособности, устойчивости к холоду, повышением частоты простудных заболеваний. Могут быть жалобы на сердцебиение, слабость и боли в ногах. Появляются сонливость, снижение аппетита, подавленность, раздражительность, общая слабость.

Объективно отмечается бледность кожных покровов с умеренным цианозом щек, губ и слизистой рта. Наблюдаются сухость и своеобразная шероховатость кожи, обусловленная выбуханием волосяных сосочков, появляются участки отрубевидного шелушения. Выявляются поражения десен (рыхлость, отечность сосочков и десневых краев, кровоточивость). Однако, вероятно, первые признаки гиповитаминоза С просто не диагностируются.

При дальнейшем развитии заболевание переходит в начальную стадию цинги с появлением петехиальных кровоизлияний вокруг волосяных фолликулов на разгибательных поверхностях голеней, предплечий, ягодицах и бедрах. Появляются артралгии. Усиливается кровоточивость десен.

В II стадии геморрагии приобретают распространенный характер. Отмечается геморрагический выпот в суставы, плевру. Гингивит и стоматит резко выражены; у больных повышается температура. Они нуждаются в стационарном лечении. III стадия характеризуется тяжелым общим состоянием больных, резким исхуданием, дальнейшим нарастанием кровоточивости, анемизации, возникновением долго не заживающих язв конечностей, развитием инфекционных осложнений (пневмонии, туберкулез, дизентерия, сепсис одонтогенный и др.).

Важное значение для верификации диагноза, особенно в I стадии заболевания, имеет определение экскреции аскорбиновой кислоты с мочой. В II и III стадиях цинги клиническая симптоматика (гингивит, стоматит, выпадение зубов, распространенные петехиальные сыпи и кровоизлияния под кожу в мышцы, суставы, остеопороз и др.) в сочетании с анамнестическими данными о неполноценном питании дает возможность установить правильный диагноз.

Дифференциальный диагноз проводят с геморрагическими диатезами. При цинге нет существенных изменений в системе свертывания крови. Для геморрагического васкулита нехарактерны массивные кровоизлияния в мышцы и суставы, а также тяжелый гингивит.

Гиповитаминоз D. Поскольку витамин D образуется в организме из эргостерина под действием ультрафиолетового облучения, одной из причин его дефицита может служить редкое пребывание на солнце. Заметим, что особенно важна «солнечная подпитка» для кормящих женщин, поскольку ультрафиолетовое облучение матери (1,5 минимальные эритемные дозы на все тело в течение

90 с) увеличивает содержание витамина D₃ в ее молоке в 10 раз. В течение последних лет установлено, что около 1 млрд людей на Земле имеют дефицит витамина D (40–92%) разной степени выраженности.

Основное проявление гиповитаминоза D у детей — рахит, заболевание, сопровождающееся деформацией костей черепа и грудной клетки, длинных трубчатых костей вследствие их размягчения, искривление позвоночника, задержка формирования статических и двигательных функций ребенка. Иногда наблюдается увеличение живота, обусловленное гипотонией мышечной мускулатуры. При гиповитаминозе D во время беременности повышается риск врожденного рахита у ребенка.

В клинике рахита детей раннего возраста на первый план в самом начале заболевания выступают функциональные изменения нервной системы. Дети становятся раздражительными, часто без видимой причины плачут, вздрагивают от звуков, сон их неглубокий и прерывистый. Появляется повышенная вазомоторная возбудимость: при легком надавливании на коже ребенка остаются красные пятна. Отмечаются дисфункции желудочно-кишечного тракта. Усиленная потливость является одним из ранних проявлений рахита. Нарушение минерального обмена, особенно обеднение организма фосфором, неблагоприятно сказывается на обмене веществ мозговой ткани. Развивающийся ацидоз также ухудшает этот обмен. Изменение функций органов пищеварения, частый неустойчивый стул создают предпосылки для развития других гиповитаминозов, к которым весьма чувствительна нервная ткань. Помимо биохимических сдвигов при рахите, по-видимому, развиваются и морфологические изменения в нервной системе, которые обуславливают функциональные нарушения, наблюдаемые уже в начальной стадии заболевания.

У взрослых недостаток витамина D, приводящий к нарушению усвоения кальция, также чреват размягчением костей (остеомаляция), увеличением опасности переломов. Среди других симптомов недостаточности витамина D можно назвать нарушения сна и зрения, ощущение жжения в ротовой полости.

Однако нехватка витамина D приводит не только к нарушению формирования и состояния костной и соединительной ткани. Установлено, что витамин D модулирует и контролирует функцию более 200 генов, контролирующих рост, апоптоз и ангиогенез. Дефицит этого витамина связан с развитием преэклампсии, гестационного диабета и неонатальной гипокальциемии, развитием диабета I типа, метаболического синдрома, заболеваний сердечно-сосудистой системы, повышением уровня воспалительных маркеров в крови. Поэтому имеет смысл гораздо чаще лабораторно выявлять концентрацию витамина D.

Для диагноза у взрослых основное значение имеют данные биохимических лабораторных исследований (снижение содержания неорганического фосфора в крови ниже 30 мг/л, повышение активности щелочной фосфатазы).

Гиповитаминоз E. Снижение всасывания и повышение потребности организма в витамине E вызывает лечебный прием минеральных масел.

«Токофероловое голодание» обостряется и при поступлении в организм большого количества железа, что приводит к усилению окислительных процессов, в которых активно задействован витамин Е.

Токоферол играет большую роль в нормальном функционировании скелетной мускулатуры, что обусловлено его участием в формировании коллагеновых и эластичных волокон межклеточного вещества. Поэтому первым и наиболее распространенным признаком его нехватки в организме служит мышечная дистрофия. Поскольку токоферол предупреждает гемолиз эритроцитов, в условиях его дефицита возможны нарушения кроветворения, клеточного дыхания, иммунитета, анемия, общая слабость. Пониженное содержание витамина Е снижает антиоксидантный потенциал организма, что может отозваться негативными функциональными изменениями со стороны миокарда. В силу заметного влияния токоферола на репродуктивные функции мужчины его недостаток таит угрозу расстройств эрекции и эякуляции.

Поскольку истощение запасов витамина Е в тканях происходит в течение длительного времени, никаких клинических симптомов недостаточности до настоящего времени не описаны. Даже экспериментальное исключение α -токоферола из диеты добровольцев не приводит к развитию клинических признаков недостаточности даже через несколько месяцев. Однако необходимо отметить, что витамин Е успешно применяется при лечении прогрессирующей нейромышечной болезни у детей с нарушениями функции печени или желчного пузыря, лечения тромботических болезней, иммунных дисфункций, профилактики рака и сердечно-сосудистых заболеваний.

Гиповитаминоз К. К специфическим факторам снижения филлохинона в организме относятся химиотерапия при онкологических заболеваниях, прием антиконвульсантов, салицилатов, некоторых антибиотиков и антикоагулянтов.

Основной симптом гиповитаминоза К — геморрагический синдром, возникающий вследствие нарушения синтеза протромбина, происходящего при активном участии витамина К. У новорожденных при тромбопении может иметь место желудочное кровотечение, кровотечение из носа, пупка, мочевых путей; у детей старше — внутрикожные, подкожные кровоизлияния, кишечные кровотечения. Недостаток витамина К, наряду с гиповитаминозом D, может служить предпосылкой остеопороза, так как филлохинон участвует в синтезе белка остеокальцина, на котором кристаллизуется кальций.

Гиповитаминоз никотиновой кислоты (витамина РР). Витамин РР — никотиновая кислота и никотинамид. Эндогенные формы гиповитаминоза РР чаще развиваются на фоне заболеваний органов пищеварения, невритов, отравлений свинцом, бензолом, таллием.

Симптоматика гиповитаминоза РР чаще всего проявляется дерматитом, диареей, деменцией. Характерен ярко-красный «лакированный» язык, возможны головокружение, головные боли, боли в конечностях (никотиновая кислота расширяет мелкие сосуды и улучшает микроциркуляцию крови), диспепсия,

бессонница, пониженное содержание сахара в крови, слабость мышц (нарушение синтетических процессов в организме). Никотиновая кислота (но не никотинамид) влияет также на липидный обмен, снижая содержание в крови холестерина и свободных жирных кислот.

При выраженном дефиците развивается пеллагра, в менее тяжелых случаях — гиповитаминоз РР, проявляющийся нарушениями функции нервной системы, кишечника, дистрофическими изменениями кожи.

Общепринятой классификации недостаточности витамина РР нет. Пеллагра подразделяется на легкие, средней тяжести и тяжелые формы. К легким относят формы с ограниченным дерматитом, нечастым поносом и умеренной астенией; к тяжелым — формы с кахексией, затянувшимися психозами, распространенными поражениями кожи. Между этими крайними вариантами — гиповитаминоз средней тяжести. При пеллагре в первую очередь вокруг губ, носа, на щеках, лбу, шее, на кистях и стопах появляется темно-красная эритема; в зоне эритемы возможны волдыри, которые затем лопаются; на слизистой оболочке губ наблюдаются трещины. Слизистая оболочка рта гиперемирована, на деснах возникают изъязвления. Язык ярко-красный отечный, приобретает характер «лакированного». В связи с развитием глоссита и стоматита больные жалуются на боль во рту, жжение в области языка. Стул водянистый 3–5 раз в сутки и более без тенезмов и крови. Развиваются признаки астенического, делириозного синдромов. В тяжелых случаях возникают судороги, атаксия, иногда развивается слабоумие. Весной под влиянием солнечного облучения обычно наблюдается обострение болезни, особенно кожных проявлений.

Гиповитаминоз РР может протекать с умеренной слабостью, ухудшением аппетита, небольшим похудением в сочетании с ограниченной эритемой на лице, кистях рук и неустойчивым стулом. Для подтверждения диагноза пеллагры и особенно гиповитаминоза РР необходимо определить содержание витамина и его метаболитов в крови и моче.

Дифференциальный диагноз проводят с системной красной волчанкой, спру, дизентерией, арибофлавинозом. Следует учитывать сочетание при пеллагре трех основных синдромов: дерматит, диарея, поражение ЦНС.

Недостаточность карнитина. Недостаточность карнитина может быть вызвана разными причинами. Первичный дефицит связан с генетически детерминированным аутосомно-рецессивным дефектом карнитина, что проявляется резкой мышечной слабостью и гипотонией, тяжелой кардиомиопатией, жировой дистрофией печени и почек.

Вторичный дефицит карнитина встречается гораздо чаще и может быть обусловлен:

- недостаточным поступлением карнитина с пищей (при нарушениях вскармливания, диетотерапии, парентеральном питании и др.);

- ограниченной способностью к биосинтезу карнитина (у детей раннего возраста, особенно недоношенных, с малой массой тела, страдающих гипотрофией);
- нарушением всасывания карнитина в желудочно-кишечном тракте, его потерей через почечные канальцы (при рахите, целиакии, муковисцидозе, болезнях почек);
- активным выведением с мочой конъюгатов карнитина с токсичными органическими кислотами (при наследственных органических ацидемиях, болезнях транспорта и окисления жирных кислот, энцефалопатии Рейе — после приема салицилатов, у больных с эпилептическими синдромами на фоне лечения препаратами вальпроевой кислоты);
- высокой потребностью в карнитине вследствие большой значимости β -окисления жирных кислот для обеспечения необходимого уровня синтеза АТФ (при кардиомиопатии, фиброэластозе и других заболеваниях сердца);
- расстройствами тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования (при митохондриальных болезнях — синдромах Кернса-Сейра, MELAS, прогрессирующей офтальмоплегии и др.).

Недостаточность карнитина выявлена и при ряде форм наследственной патологии (синдромы Ретта, Марфана, Элерса–Данло и др.), составивших группу так называемых вторичных митохондриальных заболеваний, при которых дисфункция митохондрий, по-видимому, имеет вторичный характер, сопровождая основной патологический процесс. При этих состояниях выявлены признаки снижения процессов клеточной биоэнергетики, на что указывают высокий уровень молочной и пировиноградной кислот в крови при высоком соотношении лактат/пируват, увеличение содержания продуктов ПОЛ в крови, снижение антиокислительной активности плазмы, низкие показатели активности ферментов энергетического обмена в лимфоцитах периферической крови, увеличение количества «рваных» красных мышечных волокон в биоптатах мышечной ткани. К клиническим эквивалентам нарушений процессов клеточного энергообмена могут быть отнесены низкая толерантность к физическим нагрузкам, мышечная гипотония и гипотрофия, снижение мышечной силы, мигреноподобная головная боль.

Причины низкого уровня карнитина в крови у детей, страдающих указанными заболеваниями, остаются неясными. Однако очевидно, что эти больные нуждаются в назначении препаратов карнитина, эффективность которых была подтверждена в серии исследований сотрудников МНИИ педиатрии и детской хирургии.

Свидетельствами купирования карнитиновой недостаточности при генетически детерминированных формах митохондриальной патологии у детей являются прекращение приступов гипогликемии, уменьшение выраженности миопатического синдрома, повышение уровня общего карнитина в крови и исчезновение дикарбоновой ацидурии. Данные клинические признаки сопровождаются

нормализацией показателей ПОЛ, снижением содержания лактата и пирувата в крови и почечной экскреции органических кислот — метаболитов цикла Кребса, кетонных тел, производных аминокислот. При этом необходимо учитывать, что наилучшие результаты лечения достигаются при применении комплекса средств, влияющих на разные этапы энергетического обмена (активаторов переноса электронов в дыхательной цепи — коэнзим Q₁₀, янтавит, цитохром С; кофакторов энергетического обмена — тиамин, рибофлавин, никотинамид, липоевая кислота и др.; антиоксидантов — витамины Е, С, димефосфон; трансмембранных переносчиков жирных кислот — L-карнитин).

Результаты клинических и экспериментальных исследований при сердечно-сосудистых заболеваниях свидетельствуют об эффективности применения карнитина. Назначение L-карнитина больным с острым инфарктом миокарда приводило к снижению аритмий и уменьшению зоны некроза, больным с кардиомиопатиями. При использовании L-карнитина восстанавливается содержание АТФ и креатинфосфата, снижается частота аритмий, улучшается потребление кислорода митохондриями и увеличивается сократительная способность миокарда без увеличения давления в левом желудочке. Это явилось основанием для применения препаратов карнитина у больных с инфарктом миокарда и нарушениями сердечного ритма.

В рандомизированных плацебо-контролируемых клинических исследованиях показано, что наряду с увеличением концентрации L-карнитина в плазме терапия карнитином способствует значимому увеличению качества жизни больных, что подтверждалось уменьшением симптомов утомляемости после 12 и 24 недель. Важным фактом можно считать и отсутствие даже при длительном использовании каких-либо побочных эффектов при хорошей переносимости препарата.

Известно, что у детей после перенесенных респираторных заболеваний с высокой частотой регистрируются различные астенические проявления. Доказано, что прием карнитина способствует улучшению состояния сердечно-сосудистой и дыхательной систем. У детей с астеническим синдромом после респираторного заболевания на фоне приема карнитина наблюдается улучшение переносимости физических нагрузок (по данным стресс-теста). У детей основной группы увеличилась толерантность к физической нагрузке и субъективная оценка переносимости теста. По данным экспертной оценки, улучшение показателей стресс-теста отмечено у 64% детей основной группы. Прием L-карнитина в течение 30 дней не сопровождался какими-либо нежелательными побочными явлениями.

Клинические проявления гиповитаминозов появляются не сразу, а после более или менее длительного дефицита витаминов в организме. Важно обращать внимание на микросимптоматику и не допускать клинически выраженных проявлений гиповитаминозов.

В заключение данного раздела представляется таблица, в которой приводятся наиболее часто встречающиеся симптомы гиповитаминозов (табл. 41). Знание причин развития того или иного вида витаминной недостаточности — основа их профилактики и основание для увеличения дозировки соответствующих витаминов. Важным является и то, что в некоторых случаях имеет смысл назначения больших доз витаминов с лечебной целью.

Таблица 41

Наиболее часто встречающиеся симптомы гиповитаминоза

Симптомы	Недостаточность витамина
Ангулярный стоматит, хейлоз	Рибофлавин, пиридоксин
Глоссит	Рибофлавин, пиридоксин, цианокобаламин, никотиновая кислота, фолиевая кислота
Бледность кожи и слизистых оболочек	Аскорбиновая кислота, цианокобаламин, никотиновая кислота, фолиевая кислота, биотин, ретинол
Сухость кожи	Аскорбиновая кислота, пиридоксин, биотин, ретинол
Себорейное шелушение кожи	Рибофлавин, пиридоксин, биотин, ретинол
Угри, фурункулы	Пиридоксин, никотиновая кислота, ретинол
Сухость, волос, выпадение, перхоть	Пиридоксин, биотин, ретинол
Диспептические расстройства, диарея, нарушения моторики кишечника	Цианокобаламин, никотиновая кислота, фолиевая кислота, ретинол
Конъюнктивит	Рибофлавин, пиридоксин, ретинол
Микроцитарная гипохромная анемия	Пиридоксин
Микроцитарная гиперхромная анемия	Цианокобаламин, фолиевая кислота
Парестезии	Тиамин, цианокобаламин
Периферические полиневриты	Тиамин, пиридоксин
Повышенная восприимчивость к инфекциям	Аскорбиновая кислота, ретинол
Астенический синдром	Аскорбиновая кислота, тиамин, рибофлавин, цианокобаламин, ретинол, токоферол
Раздражительность, беспокойство	Аскорбиновая кислота, тиамин, пиридоксин, цианокобаламин, никотиновая кислота, биотин
Бессонница	Пиридоксин, никотиновая кислота
Светобоязнь, нарушение сумеречного зрения	Ретинол, рибофлавин
Склонность к геморрагиям	Аскорбиновая кислота, токоферол
Тошнота	Тиамин, пиридоксин

Глава 8. Лабораторная диагностика иммунометаболических нарушений



Помимо клинических исследований, большое значение имеет лабораторная диагностика, основной целью которой является подтверждение и/или идентификация иммунных нарушений. В идеале иммунодиагностика строится на определенном алгоритме тестов, подбираемом строго индивидуально для каждого больного на основании клинической картины и предполагаемого диагноза. В практике используется большое количество лабораторных методов исследования иммунной системы человека, еще больше методов используется при проведении научных исследований. Нередко рекомендуемые методы являются дорогостоящими и сложными, поэтому лабораторную диагностику необходимо проводить с учетом клинических данных. Также не следует пренебрегать общеклиническими исследованиями (развернутый анализ крови, биохимические исследования), которые часто несут большой объем информации. Для уточнения клинического диагноза имеет смысл выделить количественные и качественные тесты оценки клеточного и гуморального звена врожденного и адаптивного иммунитета. Общепринято исследования иммунной системы разделить на несколько этапов. На первом этапе в практике проводится комплекс исследований, характеризующих фагоцитоз, цитокиновое звено, субпопуляционный состав лимфоцитов, гуморальный и клеточный иммунитет, т.е. практически всю иммунную систему, сравнивая это с нормативными показателями. Это исследование получило название «иммунный статус».

Изначально такая диагностика показала свою эффективность при диагностике первичных иммунодефицитов. И действительно, при наличии клинической картины первичных иммунодефицитов морфологические изменения заболеваний самой иммунной системы возможно и необходимо выявлять. Подобная же диагностика эффективна и при других заболеваниях иммунной системы (лимфопролиферативные, ВИЧ-инфекция и пр.). Аналогичные исследования оказались полезными при изучении иммуноотропных препаратов, при определении тяжести, продолжительности и исхода заболевания, при экологических и других научно-исследовательских работах.

Гораздо сложнее с диагностикой вторичной иммунологической недостаточности. Минимальный набор тестов, как правило, недостаточен для выявления их причин, поэтому традиционно как за рубежом, так и в России, учитывая сложность и высокие материальные затраты, исследования иммунитета является

этапными. На первом этапе проводятся исследования, направленные на идентификацию грубых поломок иммунной системы. В последующем углубленно оценивается функциональное состояние иммунной системы, определяются механизмы поломок в иммунной системе, ведущие к развитию заболевания (Петров Р.В. и соавт., 2009). Однако многолетние поиски конкретных поломок в иммунной системе в виде дефицитов или других дефектов компонентов при различных хронических, рецидивирующих, затяжных воспалительных процессах, да и при онкологических и других тяжелых заболеваниях успехом так и не увенчались. Это дало основание сделать вывод, что определение иммунологических показателей (иммунного статуса) не имеет диагностического значения и может применяться для оценки тяжести течения заболевания и эффективности его лечения, а также в научно-исследовательских целях. Подобные выводы поставили задачу о необходимости разработки методов диагностики по выявлению определенных дефектов иммунитета при заболеваниях внутренних органов, т.е. диагностики не заболеваний, а дисфункций иммунной системы.

С патогенетических позиций А.Н. Чередеев и Л.В. Ковальчук предлагают в процессе развития иммунного ответа выделить этапы (распознавание, активация, пролиферация, дифференцировка и регуляция) и характеризовать именно их, предлагая для оценки определенные методы. Подобные лабораторные тесты предлагают и другие авторы. Так, Р.В. Петров и соавт. (2009) с позиций системно-функционального подхода к иммунодиагностике заболеваний иммунной системы предлагают оценивать способность каждого звена иммунной системы. Фагоцитоз — по способности поглощения, внутриклеточного киллинга и переваривания микробов, гуморальный иммунитет — по тому, как синтезируется нормальное количество основных классов иммуноглобулинов, способных осуществлять свои эффекторные функции. Главный показатель клеточного иммунитета — способность антигенспецифических Т-лимфоцитов распознавать и уничтожать чужеродные клетки.

В последние годы в связи с развитием молекулярно-генетических исследованиях активно развиваются методы исследования по изучению апоптоза, субпопуляций лимфоцитов, экспрессии и функциональной активности TLR- и NOD-рецепторов, адапторных белков, киназ и транскрипционных факторов, передающих сигнал с поверхности в ядро клетки, и т.д.

Все эти показатели сравниваются с данными, полученными у здоровых людей. Это вполне естественно, поскольку отклонения от нормы сигнализируют о наличии патологии. Однако при иммунологических исследованиях отмечены три разновидности изменений:

1) клинически выявленные иммунные нарушения сопровождались лабораторными данными, полученными при исследовании иммунной системы. Показатели отклонялись от нормы. Аналогичные изменения характерны для болезней иммунной системы;

2) при клинических признаках иммунных нарушений лабораторные показатели не отличались от нормы;

3) выявленные лабораторные показатели с отклонениями от нормы при полном отсутствии клинических признаков иммунологической недостаточности.

Однако иммунный ответ — это реакция организма на патологический фактор, направленная на нейтрализацию и элиминацию его из организма, сопровождающаяся метаболической активацией клеток иммунной системы, увеличением их количества и синтезом ими биологически активных молекул (антител, цитокинов и пр.). Если патоген по своим патогенным свойствам не выходит за пределы защитных возможностей иммунной системы, то заболевание не развивается и показатели иммунной системы после реагирования стремятся к норме.

При иммуноопосредованных заболеваниях, с которыми встречается клиницист, все гораздо сложнее. Заболевание — неадекватная адаптация иммунной системы к патогену, т.е. неадекватное реагирование на патоген. И наличие нормальных показателей, прежде всего эффекторных, при клинически выраженной дисфункции отдельных звеньев иммунной системы будут свидетельствовать об отсутствии адекватного ответа, т.е. о нарушении. При этом резервы иммунной системы — очень мощные и отдельные ее звенья могут компенсировать недостаточность других, поэтому дефект какого-то определенного звена иммунной системы может долго не проявляться, а иногда и в течение всей жизни.

Учитывая, что в основе реакций иммунной системы лежат эффекторные, деструктивные реакции, они также не всегда адекватны. И тогда альтерация органов и тканей происходит за счет иммунных реакций, что лежит в основе патогенеза аутоиммунных, аллергических и хронических инфекционно-воспалительных заболеваний. Эти же реакции, несмотря на их функциональную целесообразность, например при сепсисе, могут ухудшать состояние больного.

Несмотря на то что все лимфоциты, а особенно Т-клетки, постоянно циркулируют и срок жизни у всех клеток разный (от 5–10 дней у NK-клеток до 30 лет у Т-клеток памяти), численность клеток каждого типа в различных органах и тканях, и в том числе и в периферической крови, строго контролируется гомеостатическими механизмами. Это происходит за счет лимфоцитарных ниш — микроанатомических структур периферического отдела иммунной системы, способных привлекать мигрирующие лимфоциты и обеспечивать их выживание за счет необходимых питательных и энергетических ресурсов. Замещение отмирающих клеток происходит за счет лимфопоэза и в меньшей степени — за счет спонтанной (фоновой) пролиферации клеток (не более 1%). Снижение числа клеток после иммунной активации, происходит за счет, запрограммированной гибели — апоптоза.

Понимание природы и механизмов гомеостатического контроля численности лимфоцитов в популяциях и субпопуляциях очень важно для правильного истолкования ее изменений при патологиях и разработке путей ее коррекции,

поэтому определение общего количества различных популяций клеток иммунной системы является весьма важным.

В количественных тестах определяются общее число различных видов клеток и концентрация гуморальных факторов иммунной системы (иммуноглобулины, цитокины и т.д.). В качественных исследованиях оцениваются функциональная активность и адаптационные резервы иммунной системы. При этом необходимо помнить, что при гипореактивных нарушениях функции иммунной системы лабораторные показатели в пределах среднестатистических показателей здоровых людей подтверждают наличие патологии, т.е. свидетельствуют о ареактивности пациента на антиген-чужеродный агент. Так, сниженные или «нормальные» показатели абсолютного числа лейкоцитов и лимфоцитов и их популяций и субпопуляций при различных инфекциях служат подтверждением наличия у пациента нарушения функции иммунной системы.

Необходимо учитывать также, что система иммунитета — сложнейшая многоуровневая и многокомпонентная структура, постоянно находящаяся в изменении, ее параметры значительно меняются в течение нескольких часов, поэтому клинические проявления имеют приоритетное значение. Лабораторные показатели обычно служат подтверждением ранее установленного клинического диагноза, во избежание ложных выводов желательно проводить исследования иммунной системы в динамике. Такой подход позволит индивидуально подойти к лечению больных с иммунными нарушениями.

Оценка показателей клеточного иммунитета

Первым этапом лабораторной диагностики является количественная оценка клеток периферической крови и их морфологических элементов — подсчет лейкоцитарной формулы. При этом анализе следует обращать внимание не только на относительное, но и на абсолютное число клеток крови. При определении нормальных показателей формулы крови в относительных значениях пересчет в абсолютные значения может выявлять патологию, и наоборот.

Количество лейкоцитов и других клеток крови зависит от скорости выхода клеток из костного мозга и притока их в ткани. Число лейкоцитов в периферической крови выше 10×10^9 клеток/л определяется как лейкоцитоз, ниже 4×10^9 клеток/л — как лейкопения. Основные причины лейкоцитоза — все виды инфекций, воспалительные состояния, злокачественные новообразования, травмы, лейкозы, уремия, действия адреналина и стероидных гормонов. Лейкопения встречается при аплазии и гипоплазии красного костного мозга, гиперспленизме, острых лейкозах, миелофиброзах, плазмцитоммах, метастазах новообразования в костный мозг, тяжелых инфекциях, коллагенозах (неблагоприятный признак), под действием лекарственных средств.

Известны различные отклонения лейкоцитарной формулы, которые могут свидетельствовать в комплексе с другими лабораторными данными о различных патологических состояниях.

Лейкоцитоз со сдвигом влево может наблюдаться при бактериальных инфекциях (неспецифических и специфических), интоксикациях (отравление угарным газом, грибами и пр.), коматозных состояниях (уремия, диабетическая, печеночная и др.), после острых кровопотерь, во время гемолитического криза. Также выявляется на ранних этапах послеоперационного периода, после больших хирургических вмешательств, во время и после родов, при злокачественных новообразованиях, лейкозах, лучевой болезни.

Лейкоцитоз со сдвигом вправо может наблюдаться при вирусных и хронических бактериальных инфекциях, дефиците фолиевой кислоты, лучевой болезни, сепсисе.

Нейтропения обычно сочетается с лейкопенией при тяжелых и вирусных инфекциях, аутоиммунных и лекарственных лейкопениях, В₁₂-дефицитных анемиях, гипоксии, голодании, авитаминозе.

Эозинофилия выявляется при аллергических заболеваниях, глистной инвазии, кожных, аутоиммунных и инфекционных заболеваниях в период развития клинической картины и на этапе выздоровления, при злокачественных новообразованиях, при лимфогранулематозе.

Эозинопения имеет место при стрессовых ситуациях, острых инфекциях, интоксикациях, шоке, инфаркте миокарда.

Базофилия встречается при лечении гепарином, введении сыворотки, диабете, микседеме, нефрозе, при аутоиммунной тромбоцитопении, хроническом миелолейкозе, миелофиброзе, эритремии.

Абсолютный лимфоцитоз наблюдается у детей до 4 лет как физиологическое состояние. У взрослых увеличение числа лимфоцитов наблюдается при инфекционных заболеваниях вирусной этиологии, при хроническом лейкозе.

Лимфопения обнаруживается при COVID-19, лучевой болезни, СПИДе, хроническом алейкемическом миелолейкозе.

Моноцитопения встречается при тяжелых формах инфекционных заболеваний и является одним из признаков нарушения процессов регенерации.

Моноцитоз обнаруживается при ревматизме, особенно в период обострения, бруцеллезе, сифилисе, туберкулезе, инфекционном мононуклеозе, может наблюдаться у новорожденных детей.

Появление в периферической крови плазматических клеток свидетельствует о напряженности иммунного процесса, например, при детских инфекциях (корь, краснуха, паротит, инфекционный мононуклеоз), у взрослых — при ОРВИ, гриппе, лучевой болезни, лейкозах, гепатите.

Для оценки состояния иммунной системы в практике активно используются различные коэффициенты взаимоотношения между клетками крови — так называемые лейкоцитарные индексы (табл. 42).

Анализируя данные клинического анализа крови, возможно определить тип и характер иммунного ответа.

Таблица 42

Основные лейкоцитарные индексы

Наименование	Формула расчета	Референсные значения
Лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) Кальф-Калифа	$= \frac{(4 \times \text{Мл}\% + 3 \times \text{Юн}\% + 2 \times \text{ПЯ}\% + 1 \times \text{СЯ}\%) \times (\text{Пл}\% + 1)}{(\text{Лф}\% + \text{Мон}\%) \times (\text{Эф}\% + 1)}$	0,3–1,5
ЛИИ Островского	$= \frac{(\text{Мл}\% + \text{Юн}\% + \text{ПЯ}\% + \text{СЯ}\% + \text{Пл}\%)}{(\text{Лф}\% + \text{Мон}\% + \text{Эф}\% + \text{Бф}\%)}$	0,1–1,1
Нейтрофильно-лимфоцитарный индекс NLR	$= \frac{\text{СЯ}\% + \text{ПЯ}\%}{\text{Лф}\%}$	1,7–1,9
Индекс ядерного сдвига	$= \frac{\text{Мл}\% + \text{Юн}\% + \text{ПЯ}\%}{\text{СЯ}\%}$	0,06–0,08
Индекс иммунореактивности	$= \frac{\text{Лф}\% + \text{Эф}\%}{\text{Мон}\%}$	18,1–37,4
Индекс аллергизации	$= \frac{(\text{Лф}\% + 10 \times (\text{Эф}\% + 1))}{(\text{Нф}\% + \text{Мон}\% + \text{Бф}\%)}$	0,79–1,08
Индекс сдвига лейкоцитов	$= \frac{(\text{ПЯ}\% + \text{СЯ}\% + \text{Эф}\% + \text{Бф}\%)}{(\text{Лф}\% + \text{Мон}\%)}$	до 2,0
Индекс Гаркави	$= \frac{\text{Лф}\%}{\text{СЯ}\%}$	0,29–0,51
Соотношение лимфоцитов к моноцитам	$= \frac{\text{Лф}\%}{\text{Мон}\%}$	более 3,1
Соотношение нейтрофилов к моноцитам	$= \frac{\text{Нф аб.}}{\text{Мон аб.}}$	11,5–13,1
Тромбоцитарно-лимфоцитарный индекс (TLR)	$= \frac{\text{Тр аб.}}{\text{Лф аб.}}$	106–150
Системный индекс иммунного воспаления (SII)	$= \frac{\text{Нф аб.} \times \text{Тр аб.}}{\text{Лф аб.}}$	450–890

Примечание: Мл — миелоциты, Ю — юные (метамиелоциты), ПЯ — палочкоядерные нейтрофилы (Нф), СЯ — сегментоядерные нейтрофилы, Пл — плазмциты, Лф — лимфоциты, Мон — моноциты, ЭФ — эозинофилы, БФ — базофилы, Тр — тромбоциты.

Тип реакции иммунной системы рассчитывается из соотношения абсолютного количества гранулоцитов и лимфоцитов и характеризует состояние врожденного и адаптивного иммунитета (табл. 43).

Таблица 43

Определение типа реакции иммунитета по развернутому анализу крови

Показатели		Лимфоциты, абс.		
		понижены	норма	повышены
Лейкоциты, абс.	повышены	Активация врожденного иммунитета	Активация врожденного иммунитета	Активация адаптивного иммунитета
	норма	Угнетение иммунитета	Ареактивность иммунитета	Активация адаптивного иммунитета
	понижены	Угнетение иммунитета	Угнетение иммунитета	Активация адаптивного иммунитета

Определение характера типа реакции рассчитывается из соотношения процентного и абсолютного количества лимфоцитов в крови пациента и характеризует механизм реакции костного мозга, формирующей соответствующее состояние иммунной системы (табл. 44).

Таблица 44

Характер реакции иммунитета по развернутому анализу крови

Показатели		Лимфоциты,%		
		понижены	норма	повышены
Лимфоциты, абс.	повышены	Ассиметричная стимуляция лейкопоэза	Активация лимфопоэза	Активация лимфопоэза
	норма	Ассиметричная стимуляция лейкопоэза	Нормореакция	Недостаточная активация лимфопоэза
	понижены	Декомпенсированный лейкопоэз	Недостаточная активация лимфопоэза	Недостаточная активация лимфопоэза

Помимо данных лейкоцитарной формулы, важным является определение концентрации гемоглобина, количества тромбоцитов и эритроцитов, величины гематокрита и эритроцитарных индексов (MCV, RDW, MCH, MCHC).

Исследование клеточного звена иммунитета

Более подробно оценить клеточный состав можно при дополнительных исследованиях, и прежде всего, используя методы проточной лазерной цитометрии. Это технология быстрого измерения различных характеристик клеток или их органелл. Клеточная суспензия, предварительно меченная флуоресцирующими моноклональными антителами или флуоресцентными красителями, подается к потоковому элементу. Клетки идут одна за другой, где в проточной ячейке их пересекает лазерный луч, под действием которого окрашенные клетки флуоресцируют. Далее через оптическую систему излучение попадает на регистрирующее устройство, где в дальнейшем обрабатывается. С помощью проточной цитометрии можно определить размеры клетки, соотношение ядра и цитоплазмы, степень асимметричности и интенсивность флуоресценции.

Область применения проточной цитометрии весьма разнообразна. Помимо морфологических характеристик клеток, с помощью моноклональных антител можно достоверно определять популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов, выявлять стадию дифференцировки и активации клеток, оценивать уровень функциональной активности лимфоцитов, определять внутриклеточные и секретируемые цитокины, проводить исследования фагоцитоза, анализировать клеточный цикл, оценивать апоптоз и пролиферацию. Основные популяции лимфоцитов периферической крови здоровых лиц представлены в табл. 45. Эти показатели можно считать нормативными при проведении иммунологических исследований.

Снижение абсолютного количества Т-лимфоцитов свидетельствует о недостаточности клеточного иммунитета (недостаточность клеточно-эффекторного звена иммунитета). Встречается довольно часто при различных инфекциях, неспецифических воспалительных процессах, злокачественных опухолях, в постоперационный период, при инфаркте и т.д. Повышение числа Т-лимфоцитов в динамике заболевания — клинически благоприятный признак. Полное завершение болезни обычно сопровождается нормализацией количества Т-лимфоцитов.

Увеличение абсолютного числа CD4⁺ Т-лимфоцитов свидетельствует о стимуляции иммунной системы на какой-либо антиген и служит подтверждением гиперреактивных синдромов. Однако необходимо иметь в виду, что их увеличение — чаще всего не что иное, как нормальная физиологическая реакция на антиген, что мы и наблюдаем при специфических и неспецифических инфекционных заболеваниях. Пролиферация CD4⁺ Т-лимфоцитов продолжается 3–5 сут после активации. Она обеспечивает умножение численности клеток в клонах, вовлекаемых в иммунный ответ — пролиферативную экспансию клонов. Т-клетки проходят 6–8 делений, что обеспечивает увеличение их числа примерно в 100–200 раз. Так, если исходную численность Т-клеток в клоне можно оценить у человека примерно в 2×10^3 (исходя из оценки общего числа Т-хелперов — в

7×10^{10} и возможного числа клонов — в 3×10^7), то после пролиферации их число может превысить 10^6 . Это обеспечивает должную эффективность иммунного ответа, поскольку формирование активных Т-хелперов необходимо для успешной реализации практически всех его ветвей. Снижение числа Т-хелперов свидетельствует о гипореактивном синдроме с нарушением регуляторного звена иммунитета. Особенно наглядно это определяется при ВИЧ-инфекции.

Таблица 45

Интервалы распределения основных и малых популяций лимфоцитов в периферической крови практически здоровых лиц

(Хайдуков С.В. и др., 2009)

Популяции и субпопуляции лимфоцитов	Содержание	
	%	$\times 10^9/\text{л}$
В-клетки (CD3 ⁻ CD19 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺)	7,0–17,0	0,111–0,376
В1-клетки (CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁻ CD45 ⁺)	0,5–2,1	0,022–0,115
В2-клетки (CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁺ CD45 ⁺)	6,5–14,9	0,081–0,323
В-клетки памяти (CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁺ CD45 ⁺)	1,8–6,8	0,012–0,040
НК-клетки (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺)	8,0–18,0	0,123–0,369
НК-клетки цитолитические (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ^{dim} CD45 ⁺)	0,2–1,0	0,003–0,022
НК-клетки цитокин-продуцирующие (CD3 ⁻ CD16 ⁻ CD56 ^{bright} CD45 ⁺)	7,8–17,0	0,120–0,347
TNK-клетки (CD16 ⁻ CD56 ⁺ CD3 ⁺ CD45 ⁺)	0,5–6,0	0,007–0,165
Т-клетки (CD3 ⁺ CD19 ⁻ CD45 ⁺)	61,0–85,0	0,946–2,079
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD45 ⁺)	35,0–55,0	0,576–1,336
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁻ CD45 ⁺)	19,0–35,0	0,372–0,974
Т-хелперы активированные/памяти (CD4 ⁺ CD45R0 ⁺ CD45RA ⁺ CD45 ⁺)	5,0–25,0	0,068–0,702
Т-хелперы нативные (CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45R0 ⁻ CD45 ⁺)	20,0–40,0	0,272–1,123
Т-лимфоциты активированные (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ CD25 ⁺ CD45 ⁺)	0,5–6,0	0,007–0,165
Регуляторные Т-лимфоциты (CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ⁻ CD45 ⁺)	1,6–5,8	0,009–0,078
Индекс соотношения (Т-хелперы/Т-цитотоксические)	1,5–2,6	

Повышение количества цитотоксических Т-лимфоцитов определяется практически при всех вирусных, бактериальных, протозойных инфекциях. Относительное увеличение числа CD8+ Т-клеток обычно обусловлено уменьшением количества Т-хелперов, хотя такую закономерность наблюдают не всегда. Это связано с тем, что цитотоксические Т-лимфоциты синтезируют IFN- γ , который угнетает пролиферацию Th2-клеток, и с тем, что ранее CD8+ Т-лимфоциты рассценивались как Т-супрессоры. Уменьшение количества цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов служит подтверждением недостаточности клеточно-эффекторного звена иммунитета, что особенно важно при лечении хронических вирусных инфекций (вирусные гепатиты, герпес и пр.).

Количество В-лимфоцитов в периферической крови определяется с помощью CD19-маркера, который присутствует на всех В-клетках периферической крови, но отсутствует на плазматических клетках.

НК-лимфоциты с диагностической точки зрения имеют два важных CD-маркера — CD16 и CD56. Общее количество их в крови составляет: CD16+клеток — 6–26%, CD56+клеток — 7–31% (0,09–0,6 \times 10⁹/л). Снижение количества этих клеток — патогномичный признак клеточно-эффекторного иммунодефицита, обусловленный тяжестью течения онкологических и вирусных инфекций, наблюдается и при приеме иммунодепрессантов. Увеличение количества НК-клеток связано с активацией антитрансплантационного иммунитета, в некоторых случаях отмечается при бронхиальной астме, т.е. является патогномичным признаком клеточно-опосредованной цитотоксичности.

На сегодняшний день теряет свой клинический смысл так называемый ранее регуляторный (дифференцировочный) индекс — соотношение CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов. Считается, что значение этого индекса ниже 1,0 соответствует иммунодефициту, более 2,5 — гиперактивности. С современных позиций интерпретировать этот показатель таким образом в настоящее время будет неправильно. Более информативным для таких выводов служат абсолютное число субпопуляций Т-лимфоцитов и маркеры активации.

Проявлением активации служит экспрессия на клетках различных маркеров активации. Так, на Т-лимфоцитах после действия стимуляции уже через 2–3 ч на поверхности появляется CD69 — самый ранний активационный антиген, частично мобилизуемый из внутриклеточных депо, а частично экспрессируемый *de novo*. Его экспрессия продолжается немногим более суток. Вскоре после CD69 на поверхности клетки появляется другой ранний маркер активации — CD25. Следующие проявления активации наблюдают через сутки после действия стимулятора, когда экспрессируется молекула рецептора для трансферрина (CD71). В последующие дни (3–6 сут) экспрессируются молекулы МНС-II, относимые к поздним маркерам активации Т-клеток, а затем — интегрины, обозначаемые как очень поздние активационные антигены VLA (Very late activation

antigens), и секретируются хемокины. Эти поздние проявления активации клеток совмещаются с пролиферативным процессом.

О функциональном состоянии Т-лимфоцитов свидетельствует количество клеток, экспрессирующих рецепторы к IL-2 (CD25+-лимфоциты). В норме в крови их относительное число составляет 13–24%. При гиперреактивных синдромах количество этих клеток возрастает, при иммунодефицитах снижается. Показателем гиперреактивности иммунитета является также количество лимфоцитов, несущих два рецептора — CD3 и HLA-DR. В норме их должно быть не более 12%.

В настоящее время типизируются и другие маркеры, их сейчас насчитывается около 360 разновидностей. Особенно это важно в онкогематологии для уточнения диагноза.

Помимо определения количественного состава клеток иммунной системы, очень важно дать качественную характеристику их функциональной активности. Благодаря применяемой в последнее время многоцветной проточной цитометрии по наличию тех или иных рецепторов можно оценить функциональную активность клеток. С клинической точки зрения наиболее важны следующие рецепторы:

CD5 — молекула адгезии, регулирует активацию клеток. Определяется на Т-лимфоцитах, тимоцитах, В1-клоне В-клеток;

CD11b — относится к наиболее важным для миграции клеток интегринам, которые определяют активность фагоцитоза, клеточной цитотоксичности, хемотаксиса и клеточной активации Т-эффекторов, НК-клеток, макрофагов и гранулоцитов;

CD16 — является рецептором Fc-фрагмента IgG, опосредует фагоцитоз и антителозависимую клеточную цитотоксичность, при его активации усиливается цитотоксичность НК-клеток, стимулируется секреция IFN и TNF- α ;

CD23 — экспрессируется на активированных В-клетках, макрофагах, клетках тимического эпителия, эозинофилах, тромбоцитах. Показатель активности В-клеток;

CD25 — α -цепь рецептора IL-2. Экспрессируется на различных типах клеток периферической крови: CD4+-, CD8+-, НК-лимфоцитах, НКТ-клетках, В-лимфоцитах, моноцитах. Маркер ранней активации Т-лимфоцитов. Повышение их количества, так же как и общей популяции CD25-позитивных лимфоцитов, может свидетельствовать о воспалительном процессе любой природы (инфекционный, аутоиммунный);

CD27 — дополнительный маркер В2-лимфоцитов. Указывает на переход В-лимфоцитов из наивных клеток в клетки памяти;

CD28 — экспрессируется на большинстве активированных Т-лимфоцитах, наивных Т-клетках и Т-клетках памяти. Необходим как костимулирующий фактор для индукции иммунного ответа (пролиферации и активации клеток);

CD38 — циклическая АДФ-рибозилгидролаза, находится на поверхности лимфоцитов, обеспечивает адгезию, передачу сигнала, является также маркером активации клеток (метаболический маркер). Понижается при ВИЧ-инфекции, лейкемии, миеломе, солидных опухолях, сахарном диабете II типа;

CD50 — межклеточная молекула адгезии (ICAM-3), помимо этого, является мощной сигнальной молекулой. Представлена на всех лейкоцитах, эндотелиальных и дендритных клетках. Обеспечивает костимуляторные сигналы для Т-клеток и регулирует адгезию клеток путем взаимодействия с интегринами. Показано снижение количества CD50+-клеток при опухолевых заболеваниях;

CD57 — экспрессируется на субпопуляциях 15–20% мононуклеарных клеток периферической крови, у 60% NK- и Т-клеток. Повышение показателей определяется у онкологических больных, больных после трансплантации, у пациентов с ВИЧ, а также с ревматоидным артритом и синдромом Фелти. Снижение патогномично при хронизации болезни Лайма;

CD62L — представитель семейства молекул клеточной адгезии (L-селектин), находящийся на клеточной поверхности лейкоцитов (Т- и NK-клетки, моноциты, гранулоциты), обеспечивает транслокацию лейкоцитов из крови в лимфоидную ткань, где они взаимодействуют с антигеном;

CD64 — посредник антителозависимой клеточной цитотоксичности (функциональный маркер);

CD158a — важный функциональный маркер NK-активности;

HLA-DR — экспрессируется различными клетками периферической крови. Определяется на всех В-лимфоцитах и моноцитах, на активированных Т-лимфоцитах (маркер поздней активации). Уровень экспрессии HLA-DR-рецептора на моноцитах менее 50% является неблагоприятным патогномичным признаком развития тяжелой бактериальной инфекции (сепсис, перитонит).

Для характеристики клеточного звена иммунной системы является важным определением концентрации цитокинов. Их идентификация в ряде случаев позволит более точно установить диагноз и механизм иммунного нарушения. Большое значение имеет определение таких провоспалительных цитокинов, как TNF- α , IL-1 и IFN- γ , особенно в этиопатогенезе различных острых и хронических воспалительных процессов как инфекционной, так и аутоиммунной природы. Их повышенное образование — главная причина септического шока. При сепсисе уровень TNF- α в крови может достигать 1 нг/мл. Накапливаются данные о роли провоспалительных цитокинов в этиопатогенезе неспецифического язвенного колита, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, инсулинозависимого диабета и др. Существенным является их определение у больных с

соответствующим врожденным иммунодефицитом. И если раньше тесты на определение цитокинов были полезны только в научно-исследовательских целях, в настоящее время они становятся важными показателями для выявления течения заболевания и тактики лечения (особенно при применении методов цитокинотерапии).

Таким образом, лабораторное исследование состояния клеточного звена иммунной системы позволяет уточнить уровень нарушения иммунитета и в последующем проводить эффективную иммуноактивную терапию.

Как альтернатива исследований иммунной системы при отсутствии необходимого оборудования (проточного цитометра) вместе с развернутым анализом крови возможно проводить определения TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Эти показатели отражают степень дифференцировки Т- и В-лимфоцитов. В процессе созревания Т- и В- лимфоцитов в тимусе и костном мозге происходит формирование клеточных рецепторов посредством рекомбинации генов в цепи эписомальной ДНК с целью создания уникального участка, распознающего антиген. Во время каждой такой рекомбинации из цепи вырезается небольшой фрагмент, образующий эксцизионное кольцо. Эти кольца получили названия TREC (T-cell Receptor Excision Circle) и KREC (Kappa-deleting Recombination Excision Circle). TREC сопровождают созревание практически всех Т-лимфоцитов, а KREC — всех В-лимфоцитов и, таким образом, служат маркерами их количества (рис. 105). Материалом для исследования может служить цельная кровь, и сухое пятно крови (в том числе собираемое в ходе национальной программы скрининга новорожденных).

Снижение количества TREC и/или KREC свидетельствует о нарушениях клеточного и/или гуморального звена иммунитета. Особого внимания заслуживают взрослые с отсутствием TREC и KREC, т.к., согласно нашим исследованиям, в этой группе очень высокий риск развития смертельных исходов в острый период заболеваний. Как предварительную оценку определения нарушения дифференцировки Т- и В-лимфоцитов при отсутствии необходимого оборудования (проточного цитометра) вместе с развернутым анализом крови можно проводить определение TREC и KREC (табл. 46).

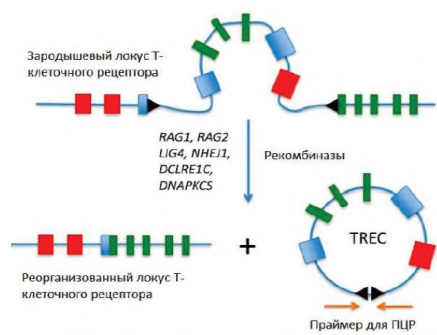


Рис. 105. Молекулярные основы диагностики дифференцировки Т- и В-лимфоцитов используя ПЦР

Таблица 46

Нормативные показатели TREC и KREC у взрослых

Показатель		Возраст (лет)			
		18–24	25–45	45–60	старше 60
TREC	кровь	35,35	11,21	0,18	0,21
	сухие пятна	15,6	3,8	0,26	0,18
KREC	кровь	16,77	12,57		5,67
	сухие пятна	2,25			

В настоящий момент в России разработаны и зарегистрированы отечественные тест-системы «ИММУНО-БИТ» - для количественного определения ДНК TREC и KREC у детей до 18 лет, и «ТК-SMA» - с дополнительным каналом качественного выявления делеции SMN1 гена, ассоциированной со спинальной мышечной атрофией (применяется в рамках расширенного неонатального скрининга). Параллельно в России и в мире проводятся пилотные исследования по возможному применению данного метода у взрослых. Накопленные данные позволяют утверждать, что TREC и KREC могут быть новыми биомаркерами тяжести течения и исхода, а также мониторинга эффективности лечения таких патологических состояний, как COVID-19, туберкулез, злокачественные новообразования, аутоиммунные заболевания и др.

Оценка показателей гуморального иммунитета

Определение уровня иммуноглобулинов — это по-прежнему важный и надежный метод оценки гуморального иммунитета. Его можно считать главным методом диагностики всех форм иммунодефицитов, связанных с недостаточностью биосинтеза антител, т.е. с пластическим звеном метаболизма В-клеток. Изменения концентрации иммуноглобулинов служат подтверждением гуморально-ассоциированной иммунопатологии. Снижение такой концентрации в сыворотке крови больных может свидетельствовать о различных патологиях — от генетических дефектов синтеза иммуноглобулинов до транзиторных состояний, связанных с потерей белка организмом (гуморально-эффекторный иммунодефицит). Повышение концентраций относительно нормативных значений свидетельствует о наличии аллергических, аутоиммунных процессов (антителозависимая цитотоксичность), оно характерно для инфекционных заболеваний на определенных этапах их развития (увеличение IgM в острый период заболевания и/или обострения хронической инфекции, IgG в стадии разрешения и/или формирования хронической инфекции). Кроме того, указанный метод является критерием эффективности проводимого лечения, в том числе заместительной терапии иммуноглобулин-содержащими препаратами.

Определение подклассов IgG представляет диагностическую ценность, так как при нормальном его уровне могут быть дефициты по подклассам иммуноглобулинов. У таких людей в ряде случаев наблюдаются иммунодефицитные состояния, проявляющиеся в повышенной частоте инфекционной заболеваемости. Так, IgG2-субкласс иммуноглобулина G преимущественно содержит антитела против полисахаридов инкапсулированных бактерий (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*), поэтому дефицит, связанный с IgG2, а также с IgA, ведет к повышенной заболеваемости респираторными инфекциями. Нарушения в соотношении подклассов IgA и в соотношении κ - и λ -цепей также могут быть причиной иммунодефицитных состояний.

Уровни сывороточных иммуноглобулинов, характерные для взрослых (IgM, IgG1, IgG3), достигают нормальных значений уже в раннем постнатальном периоде. Концентрации IgG2, IgG4, IgA не достигают нормы даже в период полового созревания. Распределение подклассов IgG в сыворотке крови взрослого человека следующее: IgG1 — 60–65%, IgG2 — 20–25%, IgG3 — 10–20%, IgG4 — 10–20%. Наиболее часто у больных имеются ассоциации дефицитов IgG2, IgG4, IgA и IgE. Определение уровня подклассов IgG существенно при повышенной чувствительности к бактериальным инфекциям. Дефициты установлены практически для всех иммуноглобулинов. Наиболее значим дефицит IgG2, который часто сочетается с полным отсутствием IgA.

Важную информацию о состоянии гуморального иммунитета дает определение специфических антител к различным антигенам, так как степень защиты организма от данной конкретной инфекции зависит не от общего уровня иммуноглобулинов, а от количества специфических антител к ее возбудителю. В настоящее время существует большое количество тест-систем по распознаванию уровня антител к бактериальным, вирусным, грибковым инфекциям и инвазиям. Нет необходимости их перечислять.

Определение общего уровня IgE существенно для дифференциальной диагностики атопических заболеваний наряду с IgG4. Высокий уровень IgE в пуповинной крови может быть полезен как индикатор высокого риска атопических заболеваний.

Аутоиммунный процесс может диагностироваться у больных при обнаружении в сыворотке крови тех или иных аутоантител. В противном случае аутоиммунный генез заболеваний может быть исключен, что окажет существенное влияние на ход дальнейших исследований и тактику лечения. Нахождение в сыворотке крови антител к нативной и денатурированной ДНК проводится также методом ИФА на твердофазном носителе. ДНК как антиген сорбирована на пластике, с этим антигеном специфически взаимодействуют аутоантитела к ДНК, содержащиеся в исследуемой сыворотке. Выявление аутоантител к нативной и денатурированной ДНК имеет диагностическое значение при системных заболеваниях соединительной ткани, активных воспалительных процессах, хронических гепатитах, инфекционном эндокардите и других заболеваниях,

сопровождающихся аутоиммунными процессами. Наличие аутоантител к ДНК при различных заболеваниях наряду с клиническими проявлениями может служить доказательством аутоиммунного процесса.

Метод ИФА позволяет находить органоспецифические аутоантитела к антигенам тканей сердца, легких, почек, печени, толстой и тонкой кишки, а также к органонеспецифическим антигенам, таким как эластин и коллаген.

Лабораторная диагностика иммунометаболических нарушений

История развития лабораторных методов исследования метаболических показателей клеток иммунной системы насчитывает уже несколько десятилетий. Одними из первых методов, которые стали применяться при диагностике, оценке характера течения и осуществления прогноза исхода иммунопатологических состояний, были гистохимические и цитохимические методы.

Цитохимический анализ основан на применении специфических химических реакций, продуктом которых является либо изменение цвета цитоплазмы, либо формирование гранул в клетках. Анализ может проводиться на мазках крови, мазках, полученных с культуры клеток, а также отпечатков органов. Так, при цитохимическом анализе с изменением цвета результат исследования выражается в виде полуколичественной оценки, с использованием принципа Астальди, основанного на выявлении различной степени интенсивности специфической

окраски. В этом случае исследуемые элементы делят на 4 группы: с отрицательной реакцией (-), слабopоложительной (+), положительной (++) и резко положительной (+++) (рис. 106). Для количественного выражения результатов подсчитывают 100 клеток определенного вида, дифференцируя их по указанному принципу. Затем число клеток с одинаковой интенсивностью окраски умножают на соответствующее данной группе число плюсов, сумма этих произведений составляет условные единицы. Также для оценки изменения интенсивности (цвета) специфической окраски был разработан

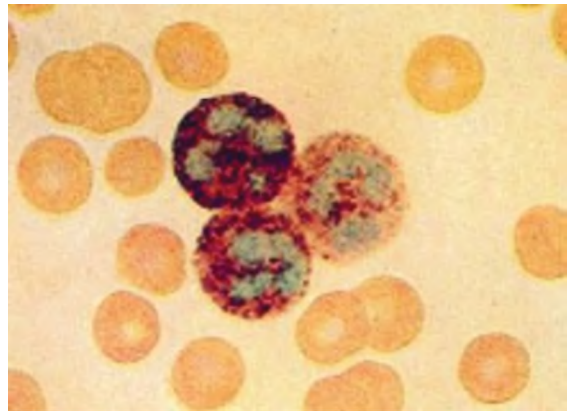


Рис. 106. Активность щелочной фосфатазы в нейтрофилах крови

(Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983).

Примечание: Окраска методом азосочетания с прочным гранатовым в качестве диазониевой соли. Активность реакции в трех клетках оценивается как ++, +++ и ++++.

метод с подсчетом среднего цитохимического коэффициента (СЦК) по L. Karlow (Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983). По данному методу подсчета результатов 100 клеток в препарате также дифференцируются на 4 группы по интенсивности окраски (как описано выше). Полученный процент клеток в каждой из групп умножают на соответствующее данной группе число плюсов. Сумма этих величин, деленная на 100, представляет собой СЦК для одной клетки.

В тех случаях, когда специфическая цитохимическая реакция на активность внутриклеточного фермента или метаболит реализуется в виде гранулы, результат оценивается в виде подсчета процента клеток с положительной реакцией и среднего количества гранул в клетках с положительной реакцией (рис. 107).

Все методы полуколичественной оценки результатов цитохимического анализа являются ориентировочными, но позволяют сравнивать распределение исследуемых метаболитов или уровней

активности ферментов в разных клетках иммунной системы при физиологических или иммунопатологических состояниях организма, а также в зависимости от течения заболевания, степени его тяжести и в связи с проводимой терапией.

В исследовании Dolgushin M.V. (2020) представлена цитохимическая оценка токсического действия комбинированных противотуберкулезных веществ на метаболическое состояние лимфоцитов крови. Автором установлено, что основное токсическое действие веществ было связано с ингибированием митохондриальных дегидрогеназ – СДГ и α -глицерофосфатдегидрогеназы — α ГФДГ), обычно с последующим подавлением активности гидролитических ферментов (кислой фосфатазы и неспецифической эстеразы). Разнонаправленные изменения активности ЛДГ отражали особенности интоксикации (Dolgushin M.V., 2020).

В работе Niedźwiedzka-Rystwej P. et al. (2020) для оценки реактивности врожденного иммунитета применялись цитохимические и гистохимические методы. Так, с помощью цитохимического метода исследовалась функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов по их способности восстанавливать нитросиний тетразолий (НСТ). С помощью гистохимического окрашивания в нейтрофилах исследовали активность миелопероксидазы. Применение данных

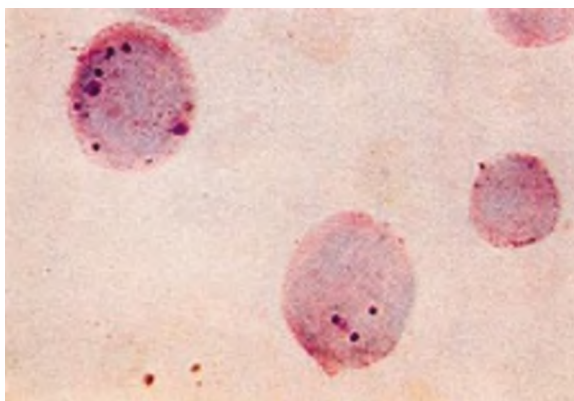


Рис. 107. Умеренно положительная реакция на лактатдегидрогеназу в лейкозных миелобластах (Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983)

методов анализа позволило авторам проследить динамику изменения функциональной активности фагоцитирующих клеток после заражения животных штаммом G1.1 *Lagovirus europaeus* (Niedźwiedzka-Rystwej P. et al., 2020).

С помощью цитохимического анализа исследована продукция свободных радикалов синовиальными Т-лимфоцитами у больных ревматоидным артритом (Remans P.H. et al., 2005). Метод цитохимического анализа окисления 3,3'-диаминобензидина- Mn^{2+} под действием свободных радикалов и осаждения окисленной формы в виде гранул. Было установлено, что хронический окислительный стресс, наблюдаемый в синовиальных Т-лимфоцитах, не является вторичным по отношению к воздействию свободных радикалов из окружающей среды, а возникает из-за внутриклеточно продуцируемых АФК. При этом предполагается, что одной из внутриклеточно генерируемых АФК является H_2O_2 , хотя в настоящее время оксидаза, которая синтезирует данный тип АФК, не обнаружена. В исследовании Modiano J.F. et al. (1998) было показано, что комплекс методов цитохимического (прокрашивание на N-бутиратэстеразу, хлорацетатэстеразу и пероксидазу) и цитометрического анализа позволил подробно охарактеризовать онтогенез монобластного лейкоза.

В настоящее время разработаны компьютерные технологии для повышения «количественности» результатов цитохимического анализа. Объект исследования в этом случае характеризуется оптическими и геометрическими признаками. В результате исследования в качестве выходных данных получают морфоденситометрические параметры. Для проведения измерений сначала вводится изображение, то есть осуществляется вывод исходного изображения с телевизионной камеры или фотокамеры, соединенной с микроскопом, на монитор. При этом получается оцифрованное исходное изображение анализируемого препарата — массив чисел, полученный по яркости исходного изображения. Изображение представляется в компьютер в виде первичной матрицы распределения интенсивностей. Матрица имеет размерность 256×256 элементов (пикселей). Каждый элемент матрицы представляет собой усредненную на площади 1 пиксель величину интенсивности. При этом интенсивность каждого ее элемента лежит в пределах от 0 до 255, то есть всего 256 градаций полутонов серого при квантовании по интенсивности от 0 — черное до 255 — белое (байт на точку). Из введенного фрагмента препарата выделяется интересующий объект, то есть клетка с черными гранулами диформаза. В результате последовательного повторения этой операции составляется фотоархив препарата (рис. 108).

Затем проводятся операции, в результате которых одно изображение преобразуется в другое. Возможно преобразование полутонового изображения в оверлейное (бинарное). Оверлейное изображение имеет такую же пространственную размерность, как и само изображение, — 256×256 , но каждый элемент оверлея может принимать только два значения — 0 или 1 (бит на точку). На

следующем этапе изображение подвергается процессу обработки. К наиболее важным операциям преобразования изображения относятся оцифровывание,

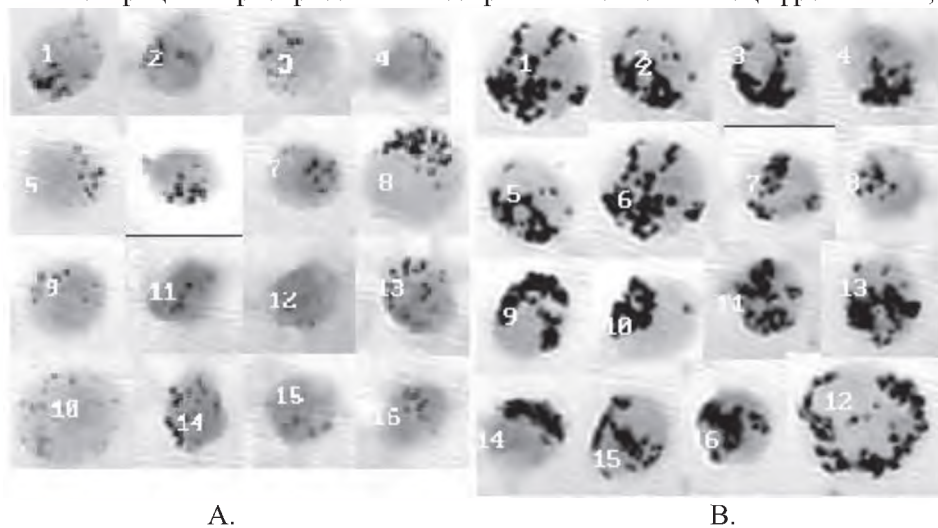


Рис. 108. Фотоархивы: А — лимфоциты с гранулами диформаза при реакции на α -глицерофосфатдегидрогеназу; В — лимфоциты с гранулами диформаза при определении СДГ

кодирование и сжатие данных, улучшение качества и восстановление, сегментация, анализ изображений. Для улучшения качества изображения проводятся цифровая фильтрация изображения (включает свыше 20 стандартных фильтров) и редактирование изображения (рис. 109).

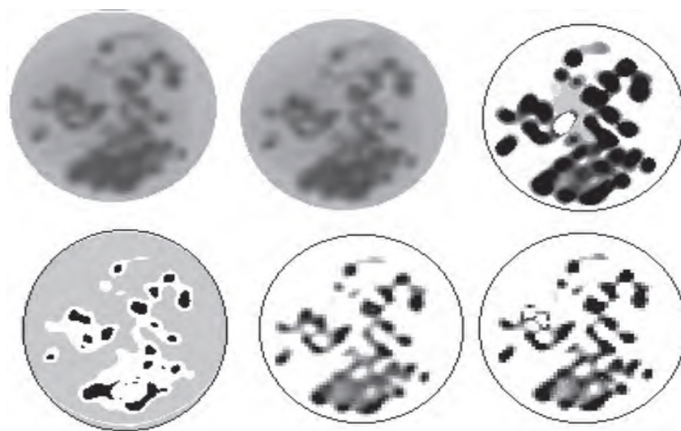


Рис. 109. Последовательный компьютерный анализ активности (по цитохимическому препарату) сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови

Далее проводятся измерения заданных параметров. Полученные количественные данные сохраняются в файле. После этого на экран дисплея компьютера выводятся данные, содержащие результаты измерения данного объекта. Таким образом, ферментативная реакция оценивается количественно. При стандартном микроскопическом увеличении пиксели переводятся в миллиметры, что позволило морфологические параметры результатов цитохимического анализа выражать в метрических величинах.

В работе Грицинской В.Л. и соавт. (2003) продемонстрировано применение компьютерного морфоденситометрического анализа активности СДГ и α ГФДГ в лимфоцитах с целью изучения метаболизма лимфоцитов крови у первоклассников в период адаптации к школе. Было установлено, что у детей в конце первого учебного года в лимфоцитах снижен уровень аэробных энергетических процессов, что проявляется на фоне преобладания симпатикотонического типа регуляции вегетативной нервной системы.

С помощью метода компьютерной морфоденситометрии также были исследованы уровни активности неспецифической эстеразы и α ГФДГ в лимфоцитах крови у больных аутоиммунным тиреоидитом (Кадричева С.Г. и соавт., 2003). Было обнаружено, что в лимфоцитах у больных повышается активность α ГФДГ (по увеличению оптической плотности гранул диформаза). Однако в связи с тем, что отсутствовало значимое повышение площади гранул, сформированных за счет специфической цитохимической реакции на α ГФДГ, было сделано заключение об отсутствии повышения активности митохондрий. Кроме того, за счет увеличения значений оптических и морфологических характеристик гранул диформаза, сформированных при реакции на неспецифическую эстеразу, авторы сделали вывод об увеличении активности данного фермента, что отражает повышение деструктивных реакций лимфоцитов при аутоиммунном тиреоидите.

Эффективность гистохимических исследований для характеристики иммунометаболических процессов продемонстрировано в исследовании Arslan C. et al. (2022). Авторы изучали влияние инкапсулированной смеси эфирных масел на метаболический профиль сыворотки крови и лимфоцитов у кур. С помощью гистохимического анализа в лимфоцитах была исследована активность α -нафтилацетатэстеразы и кислой фосфатазы. С помощью указанных методических приемов было установлено, что смесь эфирных масел улучшала метаболический профиль сыворотки крови и повышала количество лимфоцитов, положительных по α -нафтилацетатэстеразе и кислой фосфатазе (Arslan C. et al., 2022).

В работе Botman D. et al. (2014) на примере исследования активности фосфат-активируемой глутаминазы [(PAG), phosphate-activated glutaminase] предложен метод количественной гистохимии. PAG (EC 3.5.1.2) катализирует

превращение глутамина в глутамат — первый этап глутаминолиза. Вторым этапом — превращение глутамата в α -кетоглутарат — осуществляется под действием глутаматдегидрогеназы. Глутаминолиз стал потенциальной терапевтической мишенью при некоторых видах опухолей различной локализации (Andersen J.V., Schousboe A., 2023; Jin H. et al., 2020). PAG считается митохондриальным, но активность данного фермента также была обнаружена в клеточных ядрах (Molenaar R.J. et al., 2018).

Глутаминолиз участвует в ряде клеточных процессов (рис. 110). α -Кетоглутарат, полученный из глутамина, может быть использован в ТСА, анаплеротический процесс, который субстратно стимулирует основные обменные реакции в клетке, включая синтез АТФ в дыхательной цепи митохондрий (Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012; Савченко А.А. и соавт., 2018).

С помощью изоцитратдегидрогеназ и аконитазы α -кетоглутарат может быть преобразован в цитрат, а затем в ацетил-коэнзим А (ацетил-КоА) для дальнейшего синтеза липидов (Коленчукова О.А. и соавт., 2008; Савченко А.А. и соавт., 1997, 2018). Глутамин может превращаться в пируват, а затем в малат с сопутствующим образованием НАДФН, который может использоваться для защиты клеток от стресса и в анаболизме липидов (Савченко А.А. и соавт., 2016, 2018; Wetzel T.J. et al., 2023). Глутамат, продуцируемый PAG, также является

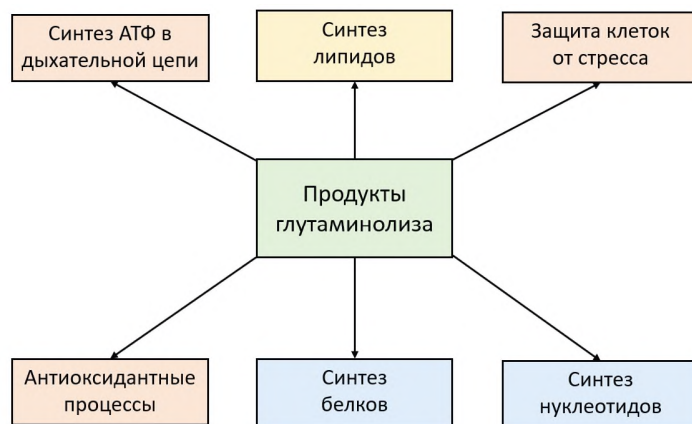


Рис. 110. Внутриклеточные процессы, активность которых стимулируется продуктами глутаминолиза

предшественником глутатиона, который востребован в антиоксидантных процессах (Савченко А.А. и соавт., 2015, 2018). Аммиак, полученный в результате превращения глутамина, служит источником азота для синтеза нуклеотидов и белков (Jin J. et al., 2023). Следовательно, активность PAG важна для реализации пролиферативных процессов клеток иммунной системы.

Метод количественной гистохимии реализован на принципе метаболического картирования активности РАГ в нефиксированных криостатных срезах тканей и может быть использован на любом типе нефиксированных клеток (рис. 111). Между секцией криостата и предметным стеклом присутствует пленка экзогенной глутаматдегидрогеназы, которая непосредственно превращает глутамат, генерируемый РАГ, в α -кетоглутарат. Одновременно глутаматдегидрогеназа восстанавливает в реакционной среде НАД^+ до НАДН . НАДН восстанавливает переносчик электронов феназинметосульфат, который в свою очередь восстанавливает водорастворимый желтый нитросиний тетразолий в нерастворимый в воде синий формазановый осадок (Botman D. et al., 2014).

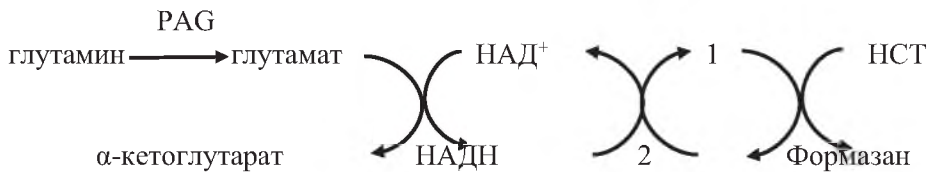


Рис. 111. Принцип метаболического картирования РАГ с использованием соли тетразолия в качестве конечного акцептора электронов (Botman D. et al., 2014): 1 — восстановленный феназинметосульфат; 2 — окисленный феназинметосульфат; НСТ — нитросиний тетразолий

В представленной методике для определения активности фермента в интактном клеточном микроокружении используются незафиксированные криостатные срезы без какой-либо химической фиксации, которая могла бы повлиять (обычно ингибировать) активность фермента. При избытке глутаматдегидрогеназы под секцией криостата формазан образуется внутри секции в местах, где активна РАГ. Для обеспечения точной локализации ферментативной активности в инкубационную среду добавляют водорастворимый полимер — поливиниловый спирт, чтобы ограничить диффузию крупных молекул, таких как ферменты, из секции в среду. Напротив, небольшие молекулы, такие как коферменты, субстраты и соли тетразолия, могут свободно диффундировать в эту среду, содержащую поливиниловый спирт. Еще одним преимуществом указанного спирта является сохранение морфологии ткани. Все посттрансляционные модификации РАГ и тканеспецифические условия остаются нетронутыми, что приводит к подлинному представлению активности фермента в его собственном клеточном окружении в конкретной ткани. Авторами данного метода было показано, что высокий уровень активности РАГ выявляется в почках, головном мозге и печени мышей и демонстрирует различную кинетику в зависимости от того, какой тип РАГ экспрессируется в данной ткани (Botman D. et al., 2014).

Спектроскопия на протяжении вот уже десятков лет используется для структурных исследований и изучения химических превращений. Главное преимущество спектральных методов состоит в том, что возможно исследовать широкий спектр веществ как биологического происхождения, так и неорганической природы. Кроме того, методику исследований легко модифицировать и автоматизировать. Такие свойства спектроскопических методов делают их незаменимыми при исследовании, в том числе и биологических объектов. Спектроскопические методы позволяют обнаруживать незначительные количества вещества даже в довольно сложных системах.

При прохождении света через равномерно поглощающую среду его интенсивность I_0 уменьшается до величины I . Отношение интенсивностей прошедшего и падающего света I/I_0 называется **пропусканием Т**. **Поглощение А** или **экстинкция Е** — это величина, равная $\lg I_0/I$. Согласно закону Ламберта-Бэра, экстинкция пропорциональна концентрации поглощающего вещества и толщине образца, то есть

$$E = \epsilon cd,$$

где ϵ — коэффициент молярной экстинкции поглощающего вещества при длине волны λ , c — молярная концентрация раствора, d — оптический путь, или толщина образца в см.

Пропускание обычно измеряется в процентах и меняется от 0 до 100%. Экстинкция — величина безразмерная и изменяется от 0 до ∞ . **Спектр поглощения**, или, более корректно, **абсолютный спектр поглощения вещества** представляет собой зависимость количества поглощенного света от длины волны. Такие спектры для красителей в видимой области (400–700 нм) имеют иногда несколько максимумов. Спектры поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм) и видимой областях отражают переходы связанных и несвязанных электронов в молекуле. Это обычно делокализованные π -электроны двойных $C=C$ связей и неподеленные пары азота и кислорода. Поскольку, как правило, электроны в молекуле при комнатной температуре находятся на нижнем энергетическом уровне, спектры в этой области дают информацию об основном и первом возбужденном электронных состояниях молекулы. Ввиду того что длина волны поглощенного света соответствует определенному переходу, пики на спектрах поглощения вещества обусловлены присутствием в нем известных структур. Группа в молекуле, которая дает вклад в спектр ее поглощения, называется хромофором. Такой группой является, например, карбонильная группа $>C=O$.

Исследуемое вещество растворяют в соответствующем растворе и помещают в кювету. Для определения поглощения только исследуемого вещества используется кювета сравнения, идентичная кювете с образцом; в нее наливают только растворитель. Перед проведением измерений кюветы сравнивают.

Поскольку стекло поглощает ультрафиолетовый свет, для проведения измерений необходимо использовать кварцевые кюветы.

Основное применение спектрофотометрии — точная колориметрия, то есть измерение количества хромофора, уже имеющегося в исследуемой пробе или образующегося в ходе реакции. Многие соединения, слабо поглощающие в видимой области, после реакции с другими веществами дают окрашенные продукты, количество которых однозначно связано с концентрацией исходного вещества. Такую цветную реакцию используют для обнаружения этих веществ. При некоторых стандартных условиях и определенных концентрациях вещества проводят реакцию, а затем измеряют поглощение смеси. В качестве сравнения используют ту же смесь, но без исследуемого вещества. После ряда измерений строят график зависимости поглощения образца от концентрации исследуемого вещества. Теперь, когда нужно определить количество вещества, в стандартных условиях проводят реакцию, измеряют поглощение образца и по градуировочной кривой определяют концентрацию исходного вещества. В биохимии этот способ применяется довольно часто, поскольку во многих случаях удается подобрать такие реакции, когда незначительные количества вещества дают сильное окрашивание.

При проведении цветных реакций необходимо помнить следующее:

1) исследовать цветную реакцию лучше всего в максимуме поглощения — этим достигается наибольшая чувствительность. Если положение максимума неизвестно, его следует определить. Такие предосторожности гарантируют получение хороших результатов даже на малочувствительном приборе;

2) в кювете с контрольным раствором обязательно должны содержаться все компоненты, кроме исследуемого вещества;

3) контрольный раствор должен быть приготовлен очень тщательно, поскольку от этого зависит получение правильного результата;

4) измерение концентрации необходимо проводить несколько раз и на кривую наносить все значения, а не их среднюю величину. Такой способ построения наглядно показывает точность определения концентрации по полученной градуировочной кривой. Кроме того, он позволяет сразу обнаружить неправильные измерения по их сильному отклонению от кривой;

5) калибровочные кривые, полученные с реагентами разных партий, как правило, не совпадают. Поэтому при смене реагента градуировочную кривую надо получить заново;

6) если поглощение образца лежит за пределами градуировочной кривой, надо заново приготовить раствор такой концентрации, чтобы попасть на градуировочную кривую. Можно поступить проще: разбавить образец, приготовленный для первого определения, одновременно разбавить точно так же и контрольную смесь. Эти операции правомочны, однако лишь в том случае, если поглощение образца подчиняется закону Ламберта–Бера.

Наиболее часто спектрофотометрические методы используются для определения концентрации окисленной и восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺ и НАДН соответственно) и его фосфорилированной формы — никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ⁺ и НАДФН соответственно). НАД⁺/НАДН и НАДФ⁺/НАДФН представляют собой две молекулы, присутствующие в каждой клетке и во всех организмах, и они играют ключевую роль в качестве кофакторов в фундаментальных катаболических и анаболических процессах соответственно (Савченко А.А. и соавт., 1996, 2012, 2017, 2020; Navas L.E., Carnero A., 2022). При этом данные молекулы являются коферментами для очень широкого класса ферментов — оксидоредуктаз (НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы). НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы являются ключевыми в биоэнергетических процессах и участвуют в направленной координации сопряженных метаболических потоков, что в значительной степени обуславливает адаптивные изменения клеточного обмена веществ (Инжеваткин Е.В., Савченко А.А., 2019; Куртасова Л.М. и соавт., 2002; Савченко А.А. и соавт., 2012).

Окисление НАДН с образованием НАД⁺ инициирует каскад реакций, в которых участвует сеть молекул коферментов и ферментов, как представлено на рис. 112. На схеме показаны два наиболее изученных пути, ведущих к синтезу НАД⁺.

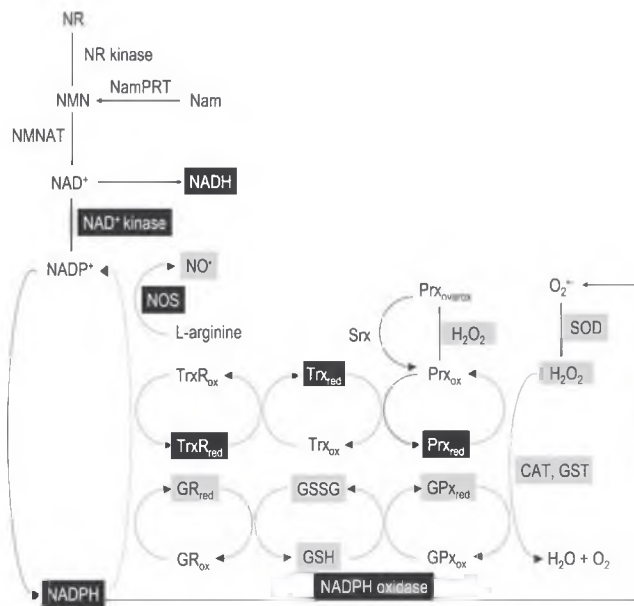


Рис. 112. Окислительно-восстановительная сеть, связанная с восстановленным никотинамидадениндинуклеотидфосфатом (по Veskoukis A.S. et al., 2018)

Примечание: черные прямоугольники обозначают биомаркеры, представленные в тексте; серые прямоугольники обозначают биомаркеры, представленные в работе Veskoukis A.S. et al. (2016)

Первый путь биосинтеза включает две стадии: первая представляет собой фосфорилирование никотинамида (Nam) в никотинамидмононуклеотид (NMN), катализируемое ферментом никотинамидфосфорибозилтрансферазой (NamPRT), а вторая — аденилирование NMN в НАД⁺ ферментом NMN-аденилтрансферазой (NMNAT), который использует АТФ в качестве донора аде-нила (Савченко А.А. и соавт., 2012; Veskoukis A.S. et al., 2018). Второй путь био-синтеза НАД⁺ начинается с предшественника витамина В3 (никотинамидари-бозид) (NR), с последующим его фосфорилированием до NMN с помощью АТФ-зависимой NR-киназы и аденилированием образовавшегося NMN до НАД⁺ с по-мощью NMNAT (Bieganowski P., Brenner C., 2004; Veskoukis A.S. et al., 2018). НАД⁺ последовательно фосфорилируется НАД⁺-киназа и превращается в НАДФ⁺. Затем НАД⁺ и НАДФ⁺ могут восстанавливаться с образованием НАДН и НАДФН соответственно. Окисление НАДФН является реакцией, подтвержда-ющей центральную роль этой молекулы в фундаментальных окислительно-вос-становительных и метаболических путях. На рис. 113 показаны три основных окислительно-восстановительных пути, инициируемых реакцией восстано-вления с помощью трех ферментов, а именно: синтазы оксида азота (NOS), тио-редоксинредуктазы (TrxR) и глутатионредуктазы (ГР), с сопутствующим окис-лением НАДФН. НАДФН является необходимым донором электронов для NOS, которая образует оксид азота. Окисление НАДФН обеспечивает электроны для образования активной восстановленной формы TrxR из неактивной окисленной формы TrxR.

NADH — восстановленный никотинамидадениндинуклеотид, NAD⁺ — окисленный никотинамидадениндинуклеотид, NADPH — восстановленный ни-котинамидадениндинуклеотидфосфат, NADP⁺ — окисленный никотинамидаде-ниндинуклеотидфосфат, NR — никотинамидарибозид, NR-киназа — никотина-мидрибозидкиназа, NMN — никотинамидмононуклеотид, NamPRT — никоти-намидфосфорибозилтрансфераза, Nam — никотинамид, NMNAT — никотина-мидмононуклеотидаденилтрансфераза, GR_{red} — восстановленная форма глута-тионредуктазы, GR_{ox} — окисленная форма глутатионредуктазы, GPx_{red} — вос-становленная форма глутатионпероксидазы, GPx_{ox} — окисленная форма глута-тионпероксидазы, GST — глутатионтрансфераза, CAT — каталаза, SOD — супе-роксиддисмутаза, GSH — восстановленный глутатион, GSSG — глутатионди-сульфид, Prx_{red} — восстановленная форма пероксиредоксина, Prx_{ox} — окислен-ная форма пероксиредоксина, Prx_{overx} — сверхокисленная форма пероксиредок-сина, Trx_{red} — восстановленная форма тиоредоксина, Trx_{ox} — окисленная форма тиоредоксина, TrxR_{red} — восстановленная форма тиоредоксинредуктазы, TrxR_{ox} — окисленная форма тиоредоксинредуктазы, Srx — сульфиредоксин, NO — оксид азота, NOS — синтаза оксида азота.

Таким образом, НАДФН может восстанавливать (активировать) перокси-редоксин, чтобы нейтрализовать пероксиды и способствовать индуцированному сульфиредоксином восстановлению пероксиредоксина из его неактивного переокисленного состояния. Кроме того, окисление НАДФН также способствует трансформации ГР в восстановленное состояние, придавая клеткам высокий восстановительный потенциал. ГР индуцирует восстановление дисульфида глутатиона (GSSG) обратно до глутатиона (GSH), который в свою очередь активирует GPx — важный антиоксидантный фермент (Савченко А.А. и соавт., 2012). Соответственно, в настоящее время разработан широкий протокол для спектрофотометрического определения количества НАДН и НАДФН, как в клетках, так и во внеклеточных средах, а также содержания различных соединений и активности ферментов, непосредственно связанных с данными молекулами: НАД⁺-киназа, НАДФН-оксидаза, пероксиредоксины, сульфиредоксины, тиоредоксины, TrxR и NOS.

В частности, для определения концентрации НАДФН наиболее широко используется протокол Wagner T.C., Scott M.D. (1994). НАДФ⁺ и НАДФН экстрагируются из лизата ткани, клеток или биологических жидкостей. Затем большая часть НАДФ⁺ разрушается при нагревании экстрактов при 60°C. Следовательно, экстракты содержат в основном НАДФН, а также следы НАДФ⁺, который остается стабильным, поскольку НАДФН может снова окисляться до НАДФ⁺ *ex vivo*. Принцип анализа основан на превращении глюкозо-6-фосфата (Г6Ф) в 6-фосфоглюконат в реакции, катализируемой Г6ФДГ, с одновременным восстановлением оставшегося количества НАДФ⁺ до НАДФН (Wagner T.C., Scott M.D., 1994). В экстракты, содержащие НАДФН, добавляется НСТ. Смесь инкубируют в темноте при 37 °С и измеряют поглощение на спектрофотометре при 570 нм (длина волны максимального поглощения диформаза). Концентрация НАДФН рассчитывается по закону Ламберта–Бера с использованием миллимолярного коэффициента экстинкции диформаза (13 л/ммоль/см). Аналогичным методом с помощью спектрофотометрического анализа определяют содержание НАДН. В данной методике в качестве фермента, осуществляющего восстановление НАД⁺ до НАДН, используется алкогольдегидрогеназа (Wagner T.C., Scott M.D., 1994).

Разработаны протоколы для определения активности ферментов, участвующих в метаболизме НАД⁺/НАДН и НАДФ⁺/НАДФН. В частности, разработан метод определения активности НАД⁺-киназы. НАД⁺-киназа катализирует производство НАДФ⁺ посредством фосфорилирования НАД⁺ (Tedeschi P.M. et al., 2016) (рис. 113).

В цитозоле НАД⁺ может фосфорилироваться до НАДФ⁺ с помощью НАД⁺-киназы. Образовавшийся НАДФ⁺ затем превращается в НАДФН ферментами пентозофосфатного пути (PPP). Редуктазы, требующие НАДФН (например, TrxR

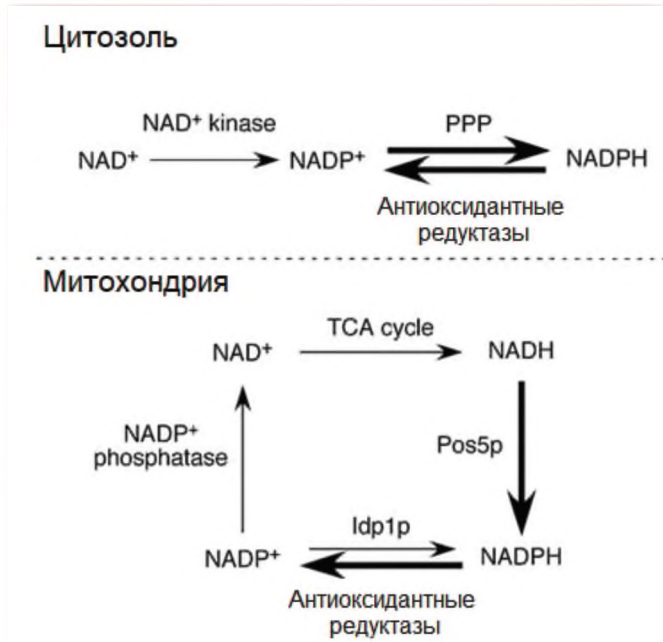


Рис. 113. Схема образования восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата в цитоплазме и митохондриях (по Outten С.Е., Culotta V.С., 2003)

Примечание: стрелки, выделенные жирным шрифтом, указывают на ферментативные реакции, которые имеют решающее значение для устойчивости к окислительному стрессу

и ГР), затем могут использовать НАДФН в качестве кофактора, тем самым регенерируя НАДФ⁺ для пентозофосфатного цикла. В митохондриях существует другой путь первичной генерации НАДФН. НАДН, образующийся в ТСА, может фосфорилироваться НАДН-киназой (Pos5p) с образованием НАДФН. После потребления НАДФН через антиоксидантные редуктазы НАДФ⁺-фосфатаза регенерирует НАД⁺ для рециркуляции обратно в цикл ТСА. Также НАДФ⁺-зависимая изоцитратдегидрогеназа (Idp1p) может регенерировать уровень НАДФН. Таким образом, НАД⁺-киназа является ключевым ферментом для регуляции внутриклеточных концентраций НАД⁺ и НАДФ⁺, осуществляя модуляцию метаболизма и функциональной активности клеток (рис. 114).

Активность НАД⁺-киназы регулируется окислительно-восстановительным состоянием клетки, поскольку она может модулировать клеточный и тканевой ответ на окислительный стресс, контролируя продукцию НАДФ⁺ и НАДФН. Outten С.Е. и Culotta V.С. (2003) предложили следующий протокол по определению активности НАД⁺-киназы с помощью спектрофотометрического анализа. Тканевой или клеточный лизат добавляют к реакционной смеси, содержащей буфер трис-НСl (рН 7,8), НАД⁺ и АТФ, инкубируют в течение 5 минут при 30 °С.

Количество продуцируемого НАДФ⁺ определяют с помощью циклического анализа путем добавления НСТ, глюкозо-6-фосфата и Г6ФДГ. Измеряют поглощение на спектрофотометре при 570 нм. Активность НАД⁺-киназы рассчитывают путем вычитания количества НАДФ⁺, продуцируемого в результате реакции, из количества НАДФ⁺, продуцируемого без добавления лизата. Одна единица НАД⁺-киназы определяется как количество фермента, продуцирующего 1 мкмоль НАДФ⁺ за 1 минуту.

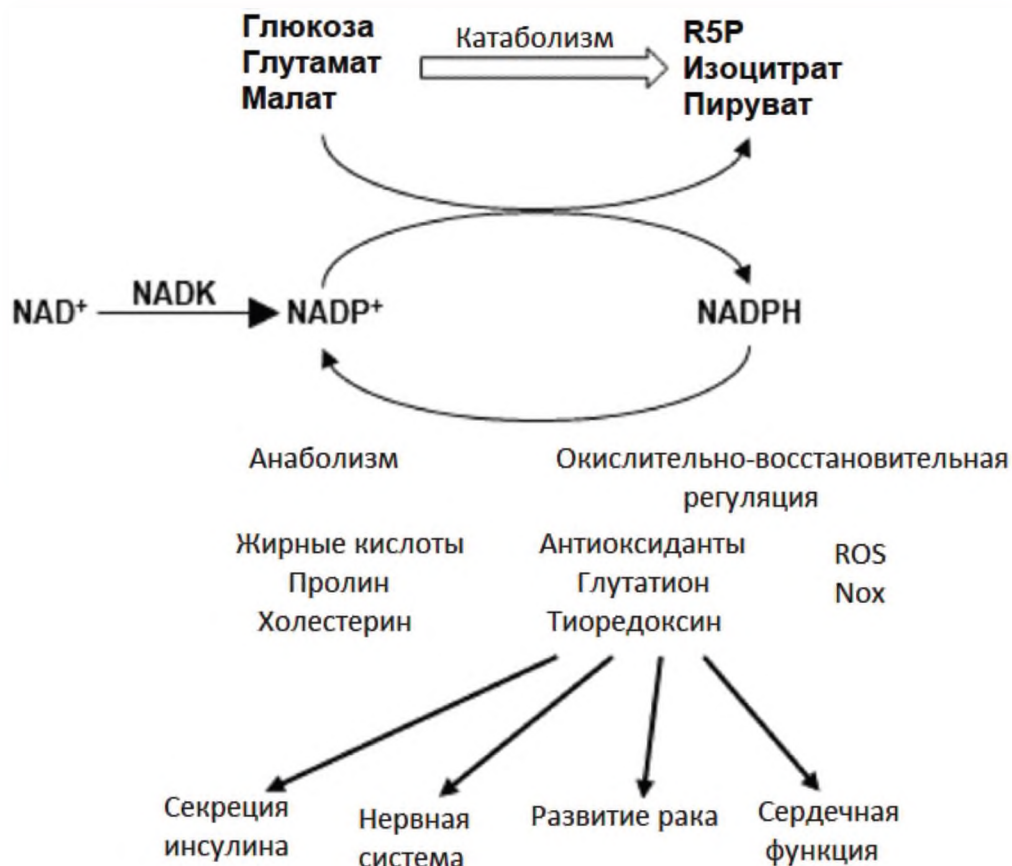


Рис. 114. Клеточные эффекты и патофизиологическая роль никотинамидадениндинуклеотид⁺-киназы (по Ока S.I. et al., 2023)

Другим ферментом, принимающим участие в обмене НАДФ⁺/НАДФН, является НАДФН-оксидаза. НАДФН-оксидаза представляет собой ферментативный комплекс, который переносит электрон от НАДФН молекулярному кислороду с образованием супероксид-радикала (O₂^{•-}) (Каспаров Э.В. и соавт., 2022). НАДФН-оксидаза, присутствующая в фагоцитирующих клетках, инициирует

респираторный (окислительный) взрыв, генерируя супероксид-радикал. Это воспалительно-опосредованный процесс, опосредует механизмы завершеного фагоцитоза (Савченко А.А. и соавт., 2013, 2019, 2020). Супероксид-радикал может трансформироваться в перекись водорода (H_2O_2), что в дальнейшем может дать начало другим активным формам кислорода (АФК), способным регулировать метаболические и физиологические процессы (Савченко А.А. и соавт., 2012, 2014; Серебрякова М.К. и соавт., 2015). Комплекс НАДФН-оксидазы макрофагов был первой идентифицированной системой, которая генерирует АФК не как побочный продукт, а в рамках реализации своей функции (Чучалин А.Г. и соавт., 2023; Bedard K., Krause K.N., 2007). Открытие других членов семейства НАДФН-оксидаз пролило свет на участие этих ферментов в широком спектре физиологических и биологических процессов (например, клеточная передача сигналов и экспрессия генов), а также в некоторых патологических состояниях и заболеваниях (Козлов В.А. и соавт., 2021; Waghela B.N. et al., 2021) (рис. 115).



Рис. 115. Вовлеченность никотинамидадениндинуклеотид-оксидазы в различных патофизиологических процессах (по Waghela B.N. et al., 2021)

Измерение активности НАДФН-оксидазы основано на протоколе Someya A. et al. (1997). Принцип анализа заключается в том, что супероксид-радикал, генерируемый НАДФН-оксидазой, окисляет цитохром C, в присутствии СОД супероксид-радикал превращается в перекись водорода, и, таким образом, окисление цитохрома C ингибируется (рис. 116). Активность НАДФН-оксидазы рассчитывают по закону Ламберта–Бера с использованием миллимолярного коэффициента экстинкции окисленного цитохрома C (21 л/ммоль/см).

Тиоредоксинредуктаза (TrxR) является единственным известным ферментом, который катализирует восстановление тиоредоксина с помощью НАДФН и,

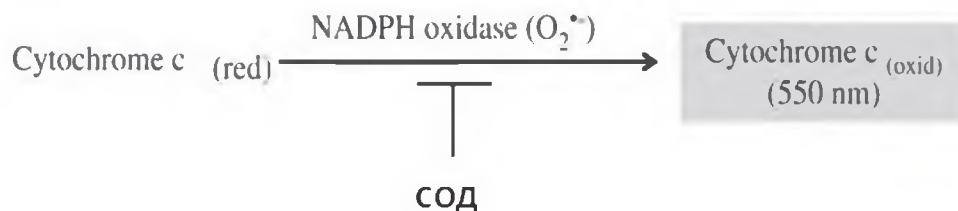


Рис. 116. Принцип метода определения активности никотинамидадениндинуклеотидфосфат -оксидазы (по Someya A. et al., 1997)

следовательно, его вклад в поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза клеток и тканей имеет первостепенное значение (Тихонова Е.П. и соавт., 20214; Черданцев Д.В. и соавт., 2016; Liu Z., 2023). Данный фермент представляет собой гомодимерный флавопротеин, где каждый мономер содержит простетическую группу ФАД, домен связывания НАДФН и сайт, содержащий редокс-активную дисульфидную связь. TrxR, помимо работы в качестве мощной системы восстановления, связанной с НАДФН, также действует как донор водорода для рибонуклеотидредуктазы — ключевого фермента в синтезе ДНК (Liu Z., 2023). Функциональный комплекс, включающий тиоредоксин, TrxR, НАДФН и отрицательный регулятор, взаимодействующий с тиоредоксином, белок (TXNIP, также известный как белок 1, активируемый витамином D3, кодируемый геном TXNIP), называется тиоредоксиновой системой. Тиоредоксиновая система представляет собой механизм защиты от окислительного повреждения вследствие метаболизма кислорода и реализации окислительно-восстановительных сигналов от перекиси водорода и радикалов азота (Савченко А.А. и соавт., 2014; Liu Z., 2023; Katturajan R. et al., 2022). TXNIP связывается с восстановленным тиоредоксином посредством межмолекулярных дисульфидных взаимодействий и блокирует его активность. TrxR — это селенофермент, обладающий уникальной способностью использовать восстанавливающие эквиваленты НАДФН, генерируемые пентозофосфатным путем, для поддержания тиоредоксина (TRX) в восстановленном состоянии (рис. 117).

Тиоредоксиновая система регулирует несколько процессов, включая экспрессию генов, антиоксидантный ответ, апоптоз и пролиферацию клеток. Например, тиоредоксиновая система модулирует активность таких факторов транскрипции, как NF-kB, REF1 и HIF1 α ; отдает восстанавливающие эквиваленты на антиоксидантные процессы: пероксиредоксинам и метионинсульфоксидредуктазам; поддерживает биосинтез нуклеотидов с помощью рибонуклеотидредуктазы; регулирует апоптоз, подавляя активность киназы, регулирующей сигнал к апоптозу, тип 1 (ASK1) (Muri J., Kopf M., 2022).

Измерение активности TrxR основано на протоколе Kumar S., Holmgren A. (1999). В присутствии тканевого TrxR происходит окисление НАДФН и

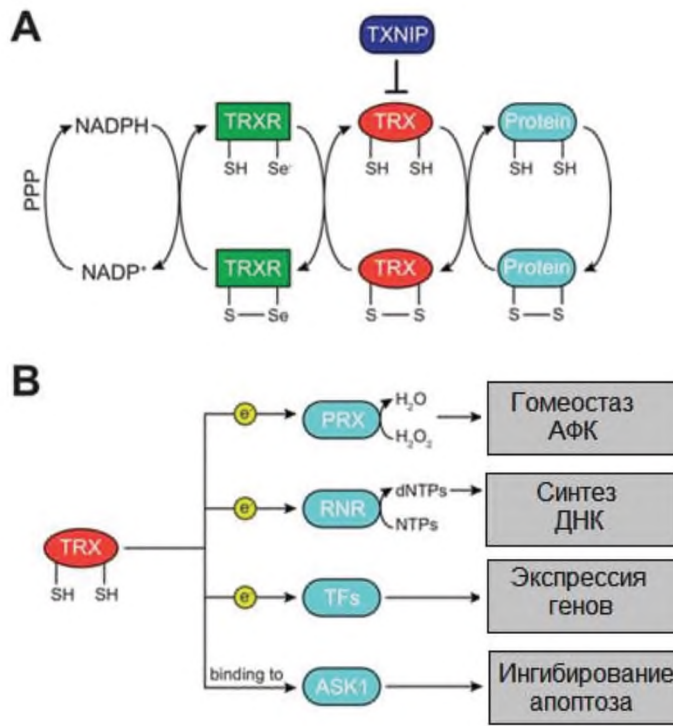


Рис. 117. Компоненты системы TRX и ее клеточные функции (по Muri J., Kopf M., 2022)

Примечание: (А) Пентозофосфатный путь продуцирует НАДФН, который действует как донор электронов системы TRX. НАДФН поддерживает редуктазу TrxR в восстановленном состоянии. Восстановленный TRX может в конечном итоге отдавать электроны нескольким клеточным белкам. Активность тиоредоксиновой системы регулируется белком, взаимодействующим с TRX (TXNIP), который связывается с TRX и ингибирует его функцию. (В) Клеточные функции восстановленного TRX. Отдавая электроны, TRX поддерживает функциональность клеточных пероксиредоксинов (PRX удаляют перекись водорода), активность рибонуклеотидредуктазы (RNR генерирует 2'-деоксирибонуклеотиды для синтеза ДНК) и многочисленных факторов транскрипции (TF), регулирующих экспрессию генов. Связываясь с ASK1 и ингибируя ее активность, восстановленный TRX предотвращает апоптоз.

одновременное восстановление инсулина за счет образования тиоловых соединений на его молекуле. Тиоловые соединения конъюгируют с DTNB [реактив Элмана — 5,5'-дителиобис-(2-нитробензойная кислота)], образуя TNB (тионитробензойная кислота), который имеет максимальное поглощение при 412 нм (рис. 118). Активность TrxR рассчитывается по закону Ламберта–Бера с использованием молярного коэффициента экстинкции TNB (13,6 л/ммоль/см).

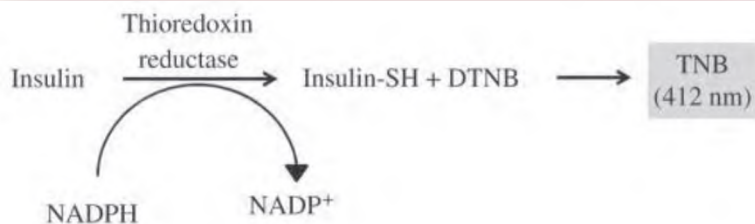


Рис. 118. Принцип метода определения активности тиоредоксинредуктазы (по Kumar S., Holmgren A., 1999)

В обзоре Zhou Y. et al. (2022) обобщены важность (в том числе клиническая) и принципы различных (включая и спектрофотометрический) методов детекции лактатдегидрогеназы (ЛДГ), авторы подробно обсуждают преимущества и ограничения представленных методов определения активности ЛДГ. ЛДГ (ЕС 1.1.1.27) является одним из наиболее распространенных ферментов в клетках человека. Фермент структурно характеризуется как сложный тетрамерный белок, который состоит из двух субъединиц — ЛДГ-А и ЛДГ-В, две субъединицы кодируются двумя независимыми генами (Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012). Две субъединицы ЛДГ могут формировать в организме человека пять различных форм фермента (изоформ) с образованием гомомеров или гетеротетрамеров, включая ЛДГ-1, ЛДГ-2, ЛДГ-3, ЛДГ-4 и ЛДГ-5. Наиболее важной реакцией, в которой участвует ЛДГ в организме, является превращение молочной кислоты (лактата) и NAD^+ в пировиноградную кислоту (пируват) и НАДН соответственно. Стоит отметить, что ЛДГ-А имеет более высокое сродство к пирувату и, соответственно, преимущественно превращает пируват в лактат, окисляя NADH до NAD^+ . И наоборот, ЛДГ-В имеет более высокое сродство к лактату и, соответственно, преимущественно превращает лактат в пируват, восстанавливая при этом NAD^+ до НАДН (Борисов С.А. и соавт., 2021; Валутите Д.Э. и соавт., 2021; Zhou Y. et al., 2022).

Синтезируемый ЛДГ в нормальных клетках (включая клетки иммунной системы) в основном поставляется на внутреннюю мембрану митохондрий, где окисляется пируватдегидрогеназным комплексом до ацетил-КоА, затем ацетил-КоА входит в цикл трикарбоновых кислот, где он подвергается окислительному фосфорилированию для обеспечения клетки энергией. В опухолевых клетках из-за резко увеличенной интенсивности гликолиза количество лактата возрастает, он не попадает в митохондрии, но при этом выводится из клеток, что определяет значительное повышение концентрации лактата в плазме крови онкологических больных (Борисов А.Г. и соавт., 2016; Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012; Савченко А.А. и соавт., 2013).

В сыворотке крови здорового человека активность ЛДГ не превышает 200 ЕД/л. Повышенная активность ЛДГ в крови у онкологических больных связана с выходом фермента из некротических клеток опухоли. Причем активность фермента у данной категории больных может сохраняться и после удаления опухоли в течение 1–2 недель после операции (Comandatore A. et al., 2022). В то же время низкая активность ЛДГ после полного удаления опухоли связана с хорошим прогнозом (Dang C.V., 2012). Таким образом, активность ЛДГ является признанным биомаркером роста опухоли в организме, играет важную роль в качестве прогностического показателя и в ряде случаев определяет тактику медикаментозного лечения онкологических больных. Например, сообщается, что активность ЛДГ в крови является прогностическим биомаркером исхода колоректального рака (Ma Y. et al., 2021), рака легких (Tjokrowidjaja A. et al., 2022), меланомы (Agarwala S.S. et al., 2009), почечноклеточного рака (Zhang N. et al., 2020) и гепатоклеточной карциномы (Cui Z. et al., 2020). Более того, уровень активности ЛДГ является важным клиническим ориентиром при выборе химиотерапии и помогает определить, является ли плевральный выпот доброкачественным или злокачественным (Zhang F. et al., 2017). Кроме того, в исследовании Kelderman S. et al. (2014) показано, что ипилимумаб был менее эффективен, когда уровень ЛДГ в сыворотке превышал норму более чем в два раза, тогда как в работе Diem S. et al. (2016) уровень активности ЛДГ определяется прогностическим фактором для больных меланомой с анти-PD-1-иммунотерапией.

Активность ЛДГ в крови меняется также и при инфекционных заболеваниях. Так, высокая активность ЛДГ в сыворотке обнаружена у больных малярией (de la Serna E. et al., 2021). Установлено, что повышенный уровень ЛДГ связан с риском тяжелого течения COVID-19, соответственно, данный показатель можно использовать в качестве прогноза исхода инфекционного процесса (Lazar Neto F. et al., 2021).

Наиболее важной реакцией, в которой участвует ЛДГ, является превращение лактата и НАД⁺ в пируват и НАДН. Наиболее распространенным методом спектрофотометрии для определения активности ЛДГ является ультрафиолетовая спектрофотометрия. НАДН имеет один пик поглощения при 260 нм и один при 340 нм, в то время как НАД имеет только один пик поглощения при 260 нм. Это важное свойство отличает их друг от друга, а также является физической основой для измерения скорости метаболизма во многих метаболических тестах (Zhou Y. et al., 2022). Разработан простой спектроскопический анализ для обнаружения ЛДГ в слюне, где анализ основан на взаимном превращении каталитического пирувата и лактата в присутствии ЛДГ, а снижение поглощения при 340 нм, вызванное НАДН, пропорционально активности ЛДГ в слюне (de la Serna E. et al., 2021). Кроме того, в работе Lee W.S. et al. (2020) сообщается об иммуноанализе на основе микрофлюидных микропланшетов, который требует лишь

небольшого количества антител для более быстрого обнаружения ЛДГ по сравнению с традиционным ИФА. Весь корпус этого микропланшета состоит из 96-луночного планшета, который имеет входное отверстие для пипеточной инъекции, выходное отверстие, открытое в сторону впитывающей прокладки, и микрожидкостный канал между ними. Микрофлюидный микропланшет представляет собой спиральный микрофлюидный канал с в 1,5 раза большей площадью поверхности и в 50 раз большим отношением площади поверхности к объему по сравнению с обычными планшетами для ИФА (рис. 119). Предел обнаружения составляет всего $6,25 \times 10^{-3}$ Ед/л (Lee W.S. et al., 2020).

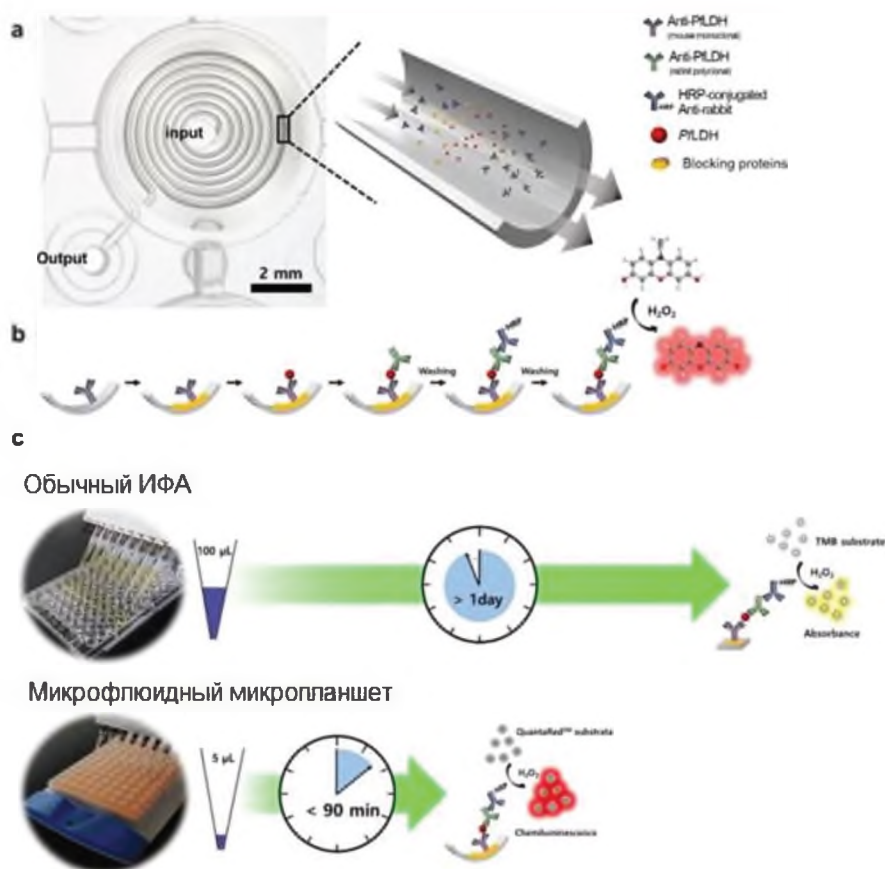


Рис. 119. Схема определения активности лактатдегидрогеназы с использованием микрофлюидного микропланшета (по Lee W.S. et al., 2020)

Примечание: а — оптическое изображение микрофлюидного микропланшета. Микрофлюидный микропланшет позволяет проводить небольшой объем и быстрый иммуноанализ благодаря микрофлюидному каналу; б — последовательность ИФА-процессов для определения активности лактатдегидрогеназы; в — сравнение метода определения активности лактатдегидрогеназы использованием обычного ИФА и микрофлюидного микропланшета

Также разработан колориметрический способ определения активности ЛДГ. Колориметр — это лабораторный прибор, который по изменению цвета исследуемой пробы определяет концентрацию вещества или активность фермента. Подобные приборы широко используются для рутинного измерения из-за таких преимуществ, как доступность, портативность и прямое визуальное наблюдение за результатами анализа (Zhou Y. et al., 2022). На рис. 120. представлен разработанный Kannan V. et al. (2015) высокостабильный и массовый колориметрический биосенсор для определения активности ЛДГ, одно измерение на котором длится менее чем 5 минут и имеет предел обнаружения всего 13 ЕД/л. В основу датчика был положен принцип фиксации пуллулана (полисахаридный полимер, состоящий из мальтотриозных единиц, также известный как α -1,4-; α -1,6-глюкан) на бумаге. Для проведения анализа на бумагу, зафиксированную пуллуланом, добавляют образец, содержащий ЛДГ. Изменение цвета после добавления исследуемого образца можно увидеть невооруженным глазом, активность фермента оценивается с помощью цифровой камеры и программного обеспечения для обработки изображений (Kannan V. et al., 2015). Датчик можно напечатать на бумажных носителях с помощью автоматизированной системы печати, что позволяет производить датчики в соответствии с высокоскоростным автоматизированным производством. Сенсор использует очень малый объем реагентов, что значительно снижает затраты, связанные с анализом. Это снимает необходимость в сложном лабораторном оборудовании, дорогостоящей транспортировке и хранении реагентов, а также в сложном обращении с образцами. Датчик можно использовать для быстрого и недорогого скрининга большого количества образцов.

Arias-Alpizar K. et al. (2022) сообщили об аналогичном датчике, который основан на одноэтапном магнитном иммуноанализе и может быть выполнен менее чем за 20 мин на недорогом и простом одноразовом устройстве на бумажной основе. Тест состоит из однократной инкубации образца лизированных клеток со смесью реагентов в течение 5 мин. Затем смесь пипеткой переносится непосредственно на датчик. Предел обнаружения 0,39 ЕД/л может быть достигнут с помощью визуальной колориметрии (Arias-Alpizar K. et al., 2022). Кроме того, Papanophytou C. et al. (2021) показали, что активность ЛДГ можно определять по взаимодействию НАДН с НСТ и феназинметилсульфатом, что приводит к изменению цвета смеси с последующим образованием сине-фиолетовых гранул.

Halvorsen C.P. et al. (2019) сообщили о прототипе изготовленного вручную быстрого бумажного теста, который требовал небольшого количества биологического образца и использовал камеру смартфона для обеспечения колориметрических измерений активности ЛДГ менее чем за 4 мин. При анализе образца цельной крови устройство включало разделение цельной крови на плазму на наборе фильтровальной бумаги, колориметрическую мембрану с использованием сухой химической реакции на фильтрующей мембране и анализ активности фермента с помощью программного обеспечения на смартфоне (Halvorsen C.P. et al., 2019).

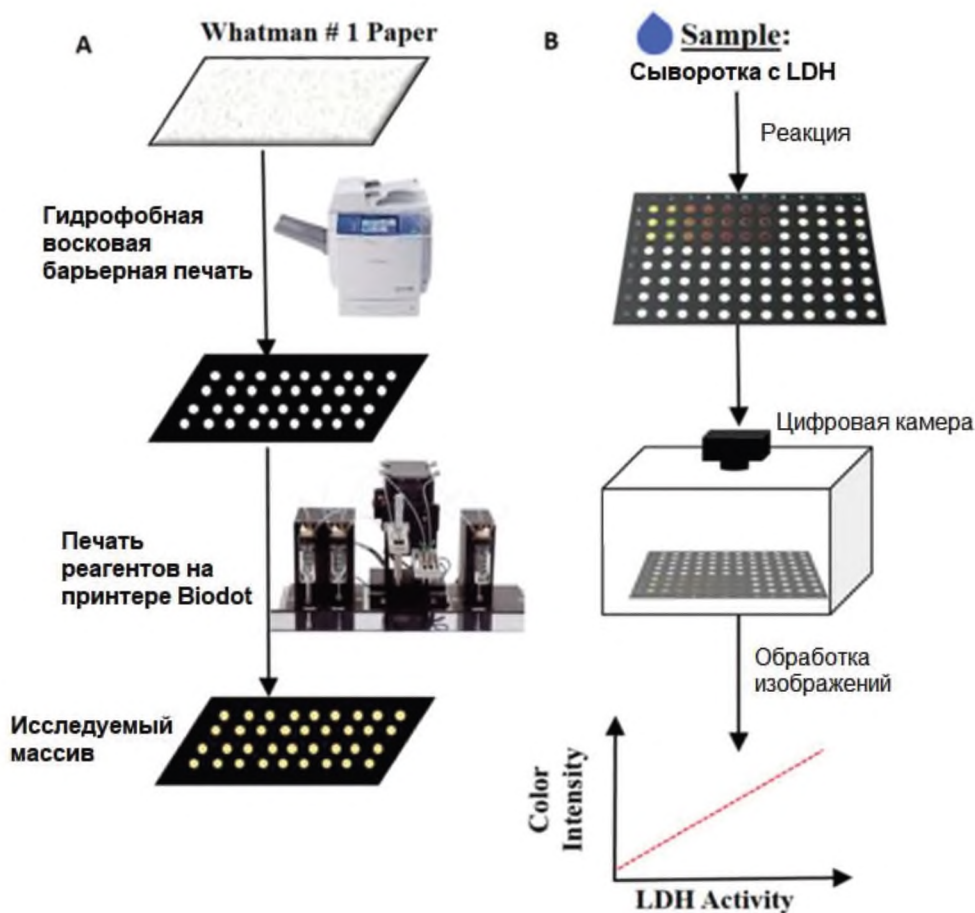


Рис. 120. Колориметрический биосенсор на бумажном носителе для определения активности лактатдегидрогеназы: А — подготовка датчиков лактатдегидрогеназы на бумажной основе. В — анализ активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови (по Zhou Y. et al., 2022)

Разработан флуориметрический метод определения активности ЛДГ (Zhou Y. et al., 2022). Известно, что при облучении флуоресцентного вещества падающим светом с определенной длиной волны (обычно в диапазоне ультрафиолетового света) вещество поглощает световую энергию, переходит в возбужденное состояние с последующим испусканием квантов света с большей длиной волны, чем длина волны падающего света (обычно уже в видимом диапазоне). По сравнению с предыдущими методами детекции флуоресцентный анализ имеет преимущества высокой чувствительности, высокой пропускной способности, широкого

диапазона линейности, что делает его хорошим выбором для детекции активности ЛДГ.

В 2010 году Ren X. et al. (2010) сообщили об обнаружении активности ЛДГ на основе квантовых точек CdTe/CdS. Как показано на рис. 121, при данном подходе флуоресценция QD сначала гасится NAD^+ , вызванным хемосорбцией или электростатической диффузией NAD^+ на поверхность QD, что влияет на их химические связи. Затем флуоресценция постепенно восстанавливалась при добавлении ЛДГ, что связывало с восстановлением NAD^+ до NADH в реакции, катализируемой ЛДГ, расходуя таким образом NAD^+ и ослабляя ингибирующее действие NAD^+ на флуоресценцию QD. Предел обнаружения этого метода составил 75 ЕД/л, он имеет хорошую линейность в диапазоне 150–1500 ЕД/л с коэффициентом корреляции 0,996 (Ren X. et al., 2010).

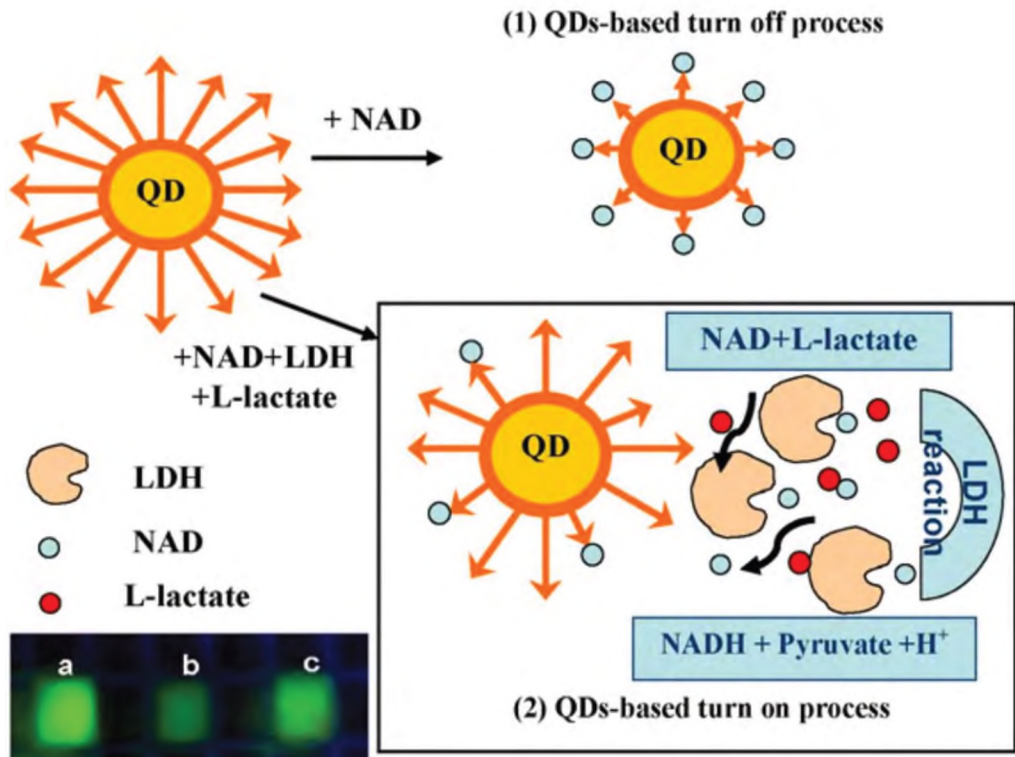


Рис. 121. Схема флуоресцентного метода определения активности лактатдегидрогеназы (по Ren X. et al., 2010): а) при отсутствии окисленной и восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида и лактатдегидрогеназы; б) в присутствии окисленной и восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида и отсутствии лактатдегидрогеназы; в) при добавлении окисленной и восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида и лактатдегидрогеназы

Разработан другой флуоресцентный метод определения активности ЛДГ на основе квантовых точек кремния (SiQD) и квантовых точек серы (SQD) (Fan S.N. et al., 2022). Как показано на рис. 122, при длине волны возбуждения 350 нм синтезированные SiQD имеют пик излучения при 450 нм. Было обнаружено, что при смешивании SiQD с NAD^+ не достигается значительного эффекта тушения флуоресценции. Наоборот, НАДН оказывает значительное гасящее действие на SiQD. Соответственно, принцип тушения флуоресценции связан с диффузией НАДН на поверхность SiQD, что приводило к процессу переноса электрона на SiQD. Предел обнаружения активности ЛДГ составлял 970 ЕД/л. Чтобы проверить возможность детекции активности ЛДГ с помощью SiQD, было проведено несколько контрольных экспериментов. Когда к раствору SiQD добавляли НАДН, интенсивность флуоресценции SiQD значительно снижалась. После добавления ЛДГ и пирувата интенсивность флуоресценции восстанавливалась. Однако, когда SiQD реагировали только с ЛДГ, интенсивность флуоресценции существенно не менялась. Кроме того, также были исследованы тушение интенсивности флуоресценции SiQD под действием NAD^+ и восстановление флуоресценции при добавлении ЛДГ. Хотя NAD^+ также может тушить флуоресценцию SiQD, эффект тушения не был таким значительным, как у НАДН. Чувствительность метода для ЛДГ была намного выше, чем для других веществ, что свидетельствует о высокой селективности метода для обнаружения ЛДГ (Fan S.N. et al., 2022).

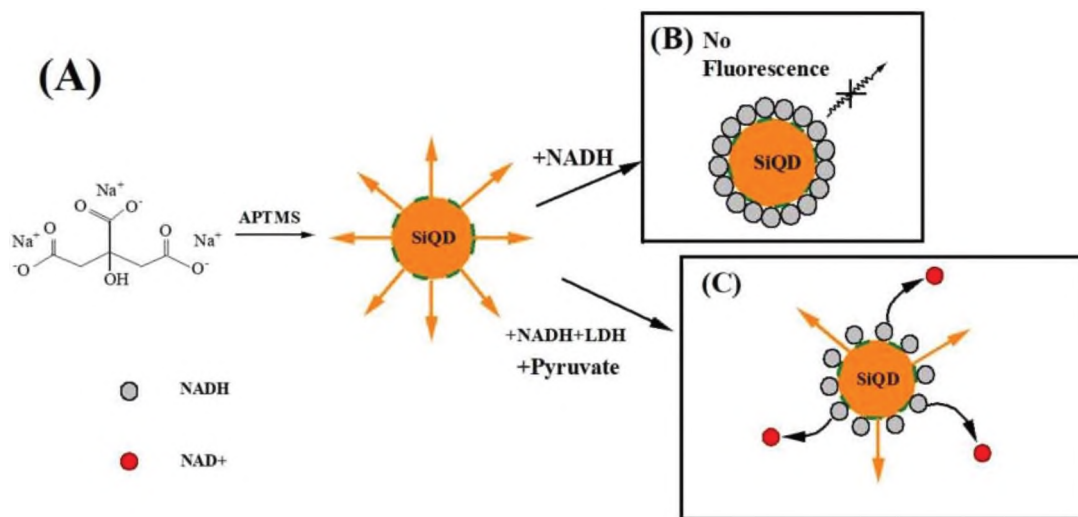


Рис. 122. Принцип флуоресцентного метода определения активности лактатдегидрогеназы на основе квантовых точек кремния
(по Fan S.N. et al., 2022)

Параметры клеточного метаболизма играют огромную роль в большинстве физиологических процессов и при возникновении патологии. Развитие иммунного ответа, проявление различных заболеваний, созревание и репрограммирование клеток имеют под собой единую фундаментальную основу, а именно изменение показателей клеточного метаболизма. Используя технологию Seahorse, можно просто и быстро получить данные о функциональных параметрах клеточного метаболизма, расширить и дополнить проводимые эксперименты и глубже взглянуть на исследуемую проблему в ее фундаментальной основе. В частности, в работе Schild Y. et al. (2023) обсуждается, что снижение накопления HIF-1 α при геморрагической телеангиэктазии приводит к клинически наблюдаемому иммунодефициту. Исследование HIF-1 α и его генов-мишеней в свежeweделенных мононуклеарных клетках периферической крови пациентов с геморрагической телеангиэктазией выявило снижение экспрессии генов и уровней белка HIF-1 α и HIF-1 α -регулируемых гликолитических ферментов. Обработка этих клеток роксадустатом (ингибитор HIF-пролилгидроксилазы) восстановила их способность накапливать белок HIF-1 α . Функциональный анализ метаболического потока с использованием анализатора внеклеточного потока Seahorse FX показал, что скорость внеклеточного закисления (показатель гликолитического обмена) после лечения роксадустатом была сопоставима с контролем без геморрагической телеангиэктазии, в то время как потребление кислорода (показатель митохондриального дыхания) было немного снижено (Schild Y. et al., 2023).

В исследовании Desousa B.R. et al. (2023) констатируется, что окислительное фосфорилирование и гликолиз являются доминирующими путями генерации АТФ в клеточном метаболизме. Баланс между этими двумя путями часто смещается для выполнения специфичных для клеток функций в ответ на стимулы, которые способствуют активации, пролиферации или дифференцировке. Авторы представляют в своей работе метод расчета скорости производства АТФ в результате окислительного фосфорилирования и гликолиза с использованием данных анализатора Seahorse XF и эмпирических коэффициентов пересчета (Desousa B.R. et al., 2023). Количественно оцениваются биоэнергетические изменения, наблюдаемые во время поляризации макрофагов, а также адаптации раковых клеток *in vitro* к условиям культуры. Показано, что скорость внеклеточного ацидоза [(ECAR), extracellular acidification rates] может количественно отражать отток лактата после поправки на буферную способность экспериментальной среды, респираторное подкисление и сенсорное покрытие измерительной лунки (рис. 123). Этот подход позволяет количественно оценить изменения АТФ, образующиеся в результате окислительного фосфорилирования (определяется по измерению скорости потребления кислорода [(OCR), oxygen consumption rate] и гликолиза в ответ на физиологически значимые стимулы. Стратегия преобразования показаний OCR и ECAR в уровень АТФ, вырабатываемой в результате окислительного фосфорилирования и гликолиза, включает три основных этапа:

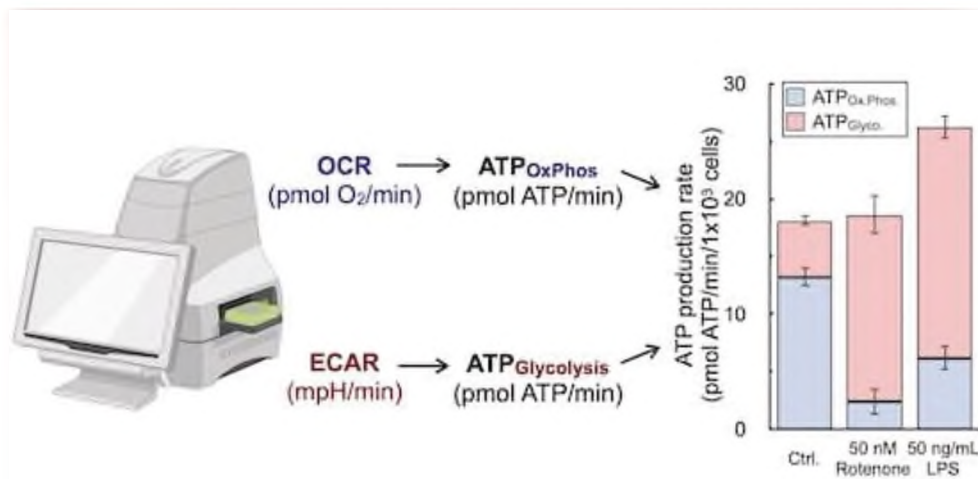


Рис. 123. Метод расчета скорости производства аденозинтрифосфата с использованием данных скорости потребления кислорода и скорости внеклеточного ацидоза, полученных с помощью анализатора Seahorse XF (по Desousa B.R. et al., 2023)

1. Преобразование ECAR (милль в час/мин) в скорость образования протонов (пмоль H^+ /мин), чтобы можно было напрямую сравнивать скорость подкисления среды со скоростью потребления кислорода (пмоль O_2 /мин) или оттока лактата (пмоль лактат/мин) с помощью аналогичных агрегатов.

$$\text{милль в час/мин} \rightarrow \text{пмоль } H^+/\text{мин}$$

2. Учет источников ацидоза, не связанных с гликолизом и брожением. Следовательно, изменения продукции H^+ количественно отражают отток лактата.

$$\text{пмоль } H^+/\text{мин} \rightarrow \text{пмоль } H^+_{\text{лактат}}/\text{мин}$$

3. Преобразование скорости потребления кислорода и оттока лактата в АТФ, полученную в результате окислительного фосфорилирования и гликолиза с использованием установленной стехиометрии.

$$1. \text{ пмоль } O_2/\text{мин} \rightarrow \text{пмоль АТФ}_{\text{OxPhos}}/\text{мин.}$$

$$2. \text{ пмоль } H^+_{\text{лактат}}/\text{мин} \rightarrow \text{пмоль АТФ}_{\text{глико}}/\text{мин.}$$

$$3. \text{ пмоль АТФ}/\text{мин} = \text{пмоль АТФ}_{\text{OxPhos}}/\text{мин} + \text{пмоль АТФ}_{\text{глико}}/\text{мин.}$$

В представленной работе используется 96-луночная платформа анализатора Seahorse XF с реализацией разработанной технологии с целью уменьшения ошибки исследования (рис. 124). Установлены существенные изменения в использовании АТФ при деполяризации нейронов и активации рецепторов Т-клеток, которые неочевидны при измерениях АТФ в стационарном состоянии.

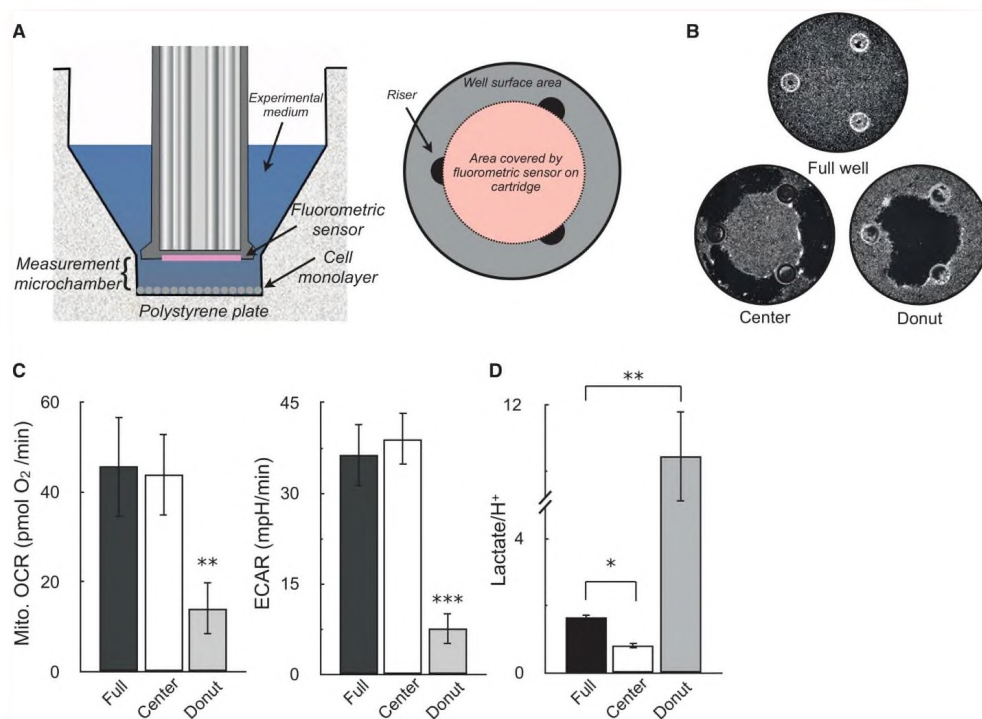


Рис. 124. Влияние сенсорного покрытия луночного планшета анализатора Seahorse XF на ошибку эксперимента

(по Desousa B.R. et al., 2023)

Примечание: А — слева. Изображение микропланшета Seahorse XF и измерительного датчика в разрезе, показывающее расположение измерительной микрокамеры, клеточного монослоя и флуорометрического датчика, прикрепленных к измерительному картриджу; А — справа. Диаграмма лунки микропланшета XF, где сливающийся монослой показан серым цветом, три выпора планшета, поддерживающие одинаковый объем измерительной микрокамеры, нарисованы черным цветом, а площадь, охваченная флуорометрическим датчиком, показана в розовом цвете; В — репрезентативные изображения лунок, подвергнутых анализу с непрерывным монослоем клеток («Полная лунка» — Full well), лунок с клетками, соскобленными с внешнего края («Центр» — Center), и лунок с клетками, соскобленными с внутренней части лунки («Пончик» — Donut); С — OCR и ECAR в клетках A549 для условий соскабливания, описанных в В; D — отношение лактата (измеренного ферментативным анализом) к H⁺ (измеренного с помощью анализатора XF) для условий, описанных в А и В

Представлен метод расчета показателей, которые позволяют напрямую сравнивать АТФ, полученный в результате окислительного фосфорилирования и гликолиза в живых клетках. Кроме того, описанные в исследовании технологии обеспечивают основу для адаптации расчетов к конкретным клеточным системам или экспериментальным условиям.

В работе Agliano F. et al. (2022) представлен пошаговый протокол, оптимизированный для эффективной генерации и выделения эффекторных антиген-специфичных CD8⁺ Т-клеток *ex vivo* с использованием костимуляции. Подробно описана методика по оценке их метаболической активности с использованием технологии Seahorse. Этот протокол можно использовать для измерения гликолитического потенциала эффекторных Т-клеток в ответ на различные экспериментальные манипуляции, такие как инфекции, введение адьювантов, редактирование генов или добавки метаболитов. В частности, на рис. 125 представлен результат стресс-теста гликолиза в CD8⁺ Т-клетках.

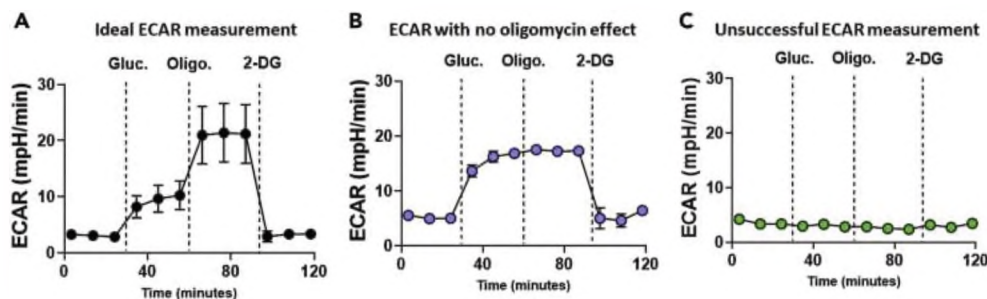


Рис. 125. Результат стресс-теста гликолиза в CD8⁺ Т-клетках
(по Agliano F. et al., 2022)

Примечание: (А) Измерение ECAR в эффекторных CD8⁺ Т-клетках: ECAR увеличивается при инъекции глюкозы (гликолиз); ECAR достигает максимума после инъекции олигомицина (максимальная гликолитическая способность); ECAR возвращается к базальному уровню после инъекции 2-Deoxy-D-glucose. (В) Измерение ECAR, при котором олигомицин не оказал эффекта. (С) Неизменное измерение ECAR из-за недостаточного количества клеток или неправильной загрузки соединения в порты для инъекций

Таким образом, стресс-тест гликолиза оптимизирован для CD8⁺ Т-клеток *ex vivo* (Agliano F. et al., 2022). Авторы заключают, что корректировки протокола могут потребоваться при работе с другими лимфоцитами или при активации CD8⁺ Т-клеток *in vitro*. Более того, стресс-тест гликолиза также учитывает подкисление из-за митохондриальных окислительных реакций. Если необходимо измерить внеклеточное подкисление только за счет гликолиза, более подходящим может оказаться анализ скорости гликолиза.

В исследовании Schank M. et al. (2023) предпринята попытка установить механизмы митохондриальной дисфункции CD4⁺ Т-клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов, находящихся под контролем антиретровирусной терапии (АРТ). Было обнаружено увеличение клеточных и митохондриальных уровней АФК в Т-хелперах (по сравнению с контрольными значениями). При этом активность супероксиддисмутазы-1 (СОД1) и уровень АФК-опосредованного восстановления повреждений ДНК [апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE1)] в лимфоцитах у данных больных была снижена. Авторы обнаружили, что

CRISPR/Cas9-опосредованный нокдаун СОД1 или APE1 в CD4⁺ Т-клетках у лиц контрольной группы подтвердил их роль в поддержании нормального митохондриального дыхания через р53-опосредованный путь. Восстановление СОД1 или APE1 в CD4⁺ Т-клетках ВИЧ-инфицированных больных успешно стимулировало митохондриальную функцию, о чем свидетельствует анализ Seahorse. Эти результаты показывают, что АФК вызывают митохондриальную дисфункцию, что приводит к преждевременному старению Т-клеток из-за нарушения регуляции СОД1 и APE1 во время латентной ВИЧ-инфекции (Schank M. et al., 2023).

Как уже было отмечено выше, производство эффективных CAR Т-клеток представляет собой серьезную проблему клеточной терапии. CAR Т-клетки имеют тенденцию принимать различные метаболические профили в зависимости от состояния их дифференцировки и уровня стимуляции. Поэтому ожидается, что введение синтетической молекулы, такой как CAR, активирующей эндогенные сигнальные пути, повлияет на метаболизм (рис. 126). Кроме того, при лечении пациента микроокружение опухоли может влиять на метаболизм CAR-Т-клеток, подвергая риску энергетические ресурсы.

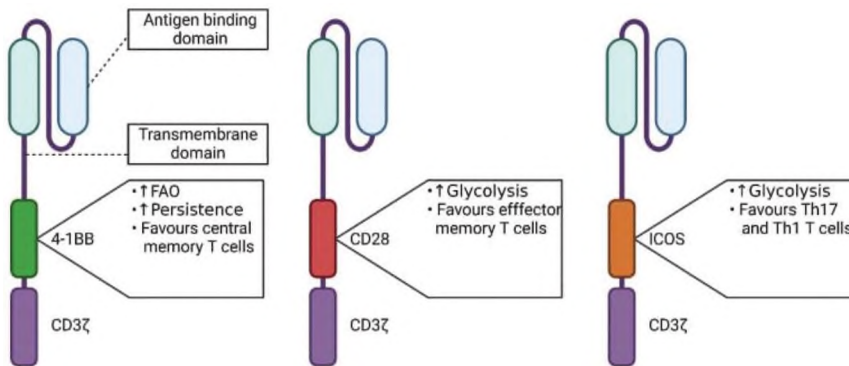


Рис. 126. Схематическое изображение молекул химерного рецептора антигена второго поколения и метаболические последствия различных костимулирующих доменов: слева направо: 4-1BB (CD137), CD28 и костимулирующие домены ICOS

Доступ к новым технологиям с более высокой производительностью и меньшими затратами привел к повышению интереса к изучению метаболизма. Действительно, методы количественной оценки гликолиза и митохондриального дыхания были доступны на протяжении десятилетий, но редко применялись в контексте CAR-Т-клеточной терапии до выпуска аппарата Seahorse XF. В обзоре Forcados C. et al. (2022) акцент делается на использовании инструмента Seahorse в контексте исследований, описывающих влияние CAR на метаболизм Т-клеток, а также стратегий (рис. 127), позволяющих сделать CAR Т-клетки более метаболически приспособленными.

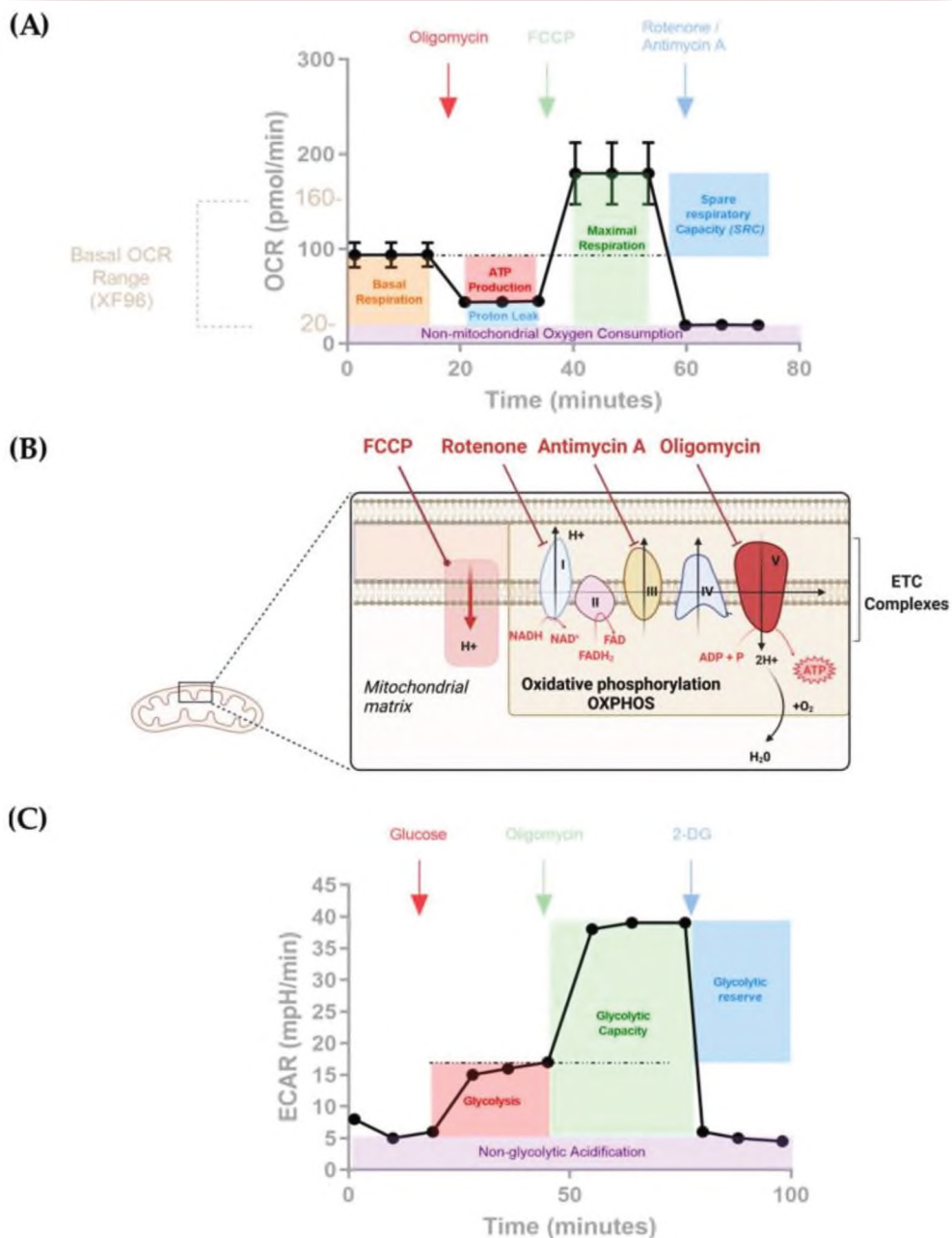


Рис. 127. Измерение ключевых параметров функции митохондрий посредством изменений скорости потребления кислорода (базальное дыхание, дыхание, связанное с синтезом аденозинтрифосфата, и утечка протонов) и запасной дыхательной способности (по Forcados C. et al., 2022)

Используя набор для стресса Seahorse XF Cell, биоэнергетическую функцию митохондрий оценивают путем измерения OCR. Во-первых, базальное значение OCR записывается в трех экземплярах, что отражает митохондриальную активность в устойчивом состоянии. Затем последовательно применяют препараты для воздействия на компоненты митохондриальной дыхательной цепи по мере измерения OCR: 1 = ингибитор олиго-АТФ-синтазы, 2 = FCCP-разобщитель митохондриального окислительного фосфорилирования и 3 = ротенон/антимидин А, ингибиторы комплекса I и III дыхательной цепи соответственно. (B) Представление мишеней для препаратов, используемых в стресс-наборе XF Cell Mito. (C) Набор для стресс-тестирования гликолиза Seahorse XF. Гликолитическую функцию оценивают посредством измерения ECAR. Сначала клетки инкубируют в среде стресс-теста без глюкозы или пирувата и измеряют ECAR. Затем первая инъекция представляет собой насыщающую концентрацию глюкозы; измерения, проведенные за это время, указывают на гликолиз в базальных условиях. Вторая инъекция олигомицина (ингибитор АТФ-синтазы) позволяет путем измерения ECAR оценить максимальную гликолитическую способность. Затем, вводят 2-дезоксиглюкозу (2-ДГ — аналог глюкозы, который конкурентно связывается с глюкозогексокиназой, первым ферментом гликолитического пути).

Применение биолюминесцентного анализа для оценки функциональной активности клеток иммунной системы

Активность ферментов в клетках иммунной системы может быть исследована широким спектром аналитических методов. Однако наиболее перспективными являются методы, реализуемые с помощью люминесцентного анализа.

В целом под люминесценцией понимается широкий ряд реакций, в которых возбужденные молекулы переходят в основное состояние с испусканием кванта света. Возбуждение молекулы и испускание кванта света электронно-возбужденной молекулой описывается законами квантовой физики и определяется изменением конфигурации ее электронных орбиталей.

Изменение конфигураций электронных орбиталей может быть вызвано рядом факторов:

- 1) возбужденное состояние электронных уровней может возникать за счет электрического, теплового или светового воздействия, то есть при физической передаче энергии молекуле, находящейся в состоянии относительного покоя;
- 2) изменение электронных уровней при химическом воздействии молекул, энергетические уровни которых различны.

В результате взаимодействия электроны молекул основного вещества переходят на другие энергетические уровни и происходит появление люминесцентного комплекса. Длительность люминесценции составляет от 10^{-10} секунд

до нескольких часов. Люминесценция наблюдается в видимой, ультрафиолетовой и инфракрасной областях. В соответствии с типом источника выделяют различные типы люминесценции, включая биолюминесценцию (возбужденные молекулы возникают в биологических объектах, преимущественно за счет ферментативных реакций) и хемилюминесценцию (возбужденные молекулы возникают в результате химической реакции). Эффективность любой люминесцентной реакции характеризуется квантовым выходом. При этом квантовый выход в биолюминесцентной реакции достигает 1 (или 100%), что обозначает испускание кванта света каждой возбужденной молекулой, которая формируется в биологической системе. Квантовый выход хемилюминесцентной реакции значительно ниже и редко превышает 0,1 (или 10%). Данная особенность хемилюминесцентной реакции связана с тем, что возбужденная молекула эмиттера не всегда дезактивируется испусканием кванта света, а может реализовать механизм безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения, в частности, в виде выделения тепла (Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012; Савченко А.А. и соавт., 2016).

Определение активности широкого спектра внутриклеточных ферментов и метаболитов (субстратов и коферментов) осуществляется с помощью биолюминесцентного анализа. **Биолюминесценция — процесс свечения живых организмов, связанный с процессами их жизнедеятельности и происходящий почти без выделения тепла.** Способностью к биолюминесценции обладают организмы, принадлежащие к самым разным систематическим группам. Наиболее широко биолюминесценция распространена в морях и океанах, там нет ни одной крупной систематической группы, в которой не было бы светящихся видов. Светятся многие бактерии, водоросли, кишечнополостные, морские черви, моллюски, рачки. Известен факт, что около 97% видов глубоководных рыб способны излучать свет в собственных тканях или культивируя светящихся бактерий в специфических органах — фотофорах. На суше этот феномен встречается у бактерий, грибов, червей и насекомых. Около 17 типов и 700 родов содержат светящиеся виды. В основе лежит катализируемая специфическим ферментом реакция светоизлучения.

Механизм реакций, сопровождающихся выделением квантов света, весьма различен у разных видов организмов, однако обычно включает в себя окисление низкомолекулярного субстрата, называемого люциферинном, в присутствии фермента люциферазы (А). Место люциферазы у некоторых организмов занимает фотопротеин (В). Люцифераза (или фотопротеин) играет роль катализатора или матрицы, на которой протекает высокоспецифичное окисление молекулы люциферина с последующим формированием в электронно-возбужденного продукта, который переходит в основное (низкоэнергетическое состояние) с испусканием квантов света (рис. 128).

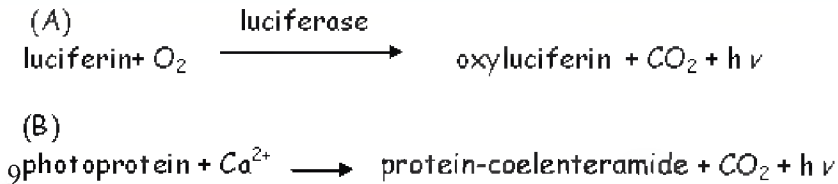


Рис. 128. Схема биолюминесцентной реакции

Реакция А типична для большинства известных люциферин-люциферазных систем, хотя у бактерий она не сопровождается выделением углекислого газа. Фотопротеиновым типом биолюминесценции (В) обладают около 30 видов морских кишечнополостных. Специфические Ca^{2+} активируемые фотопротеины (~22 кДа) генерируют кванты света с максимумом люминесценции при 480 нм. В механизме окисления люциферина рачков *Cypridina* участвует кислород воздуха, привнося один атом в продукт реакции CO_2 . Хорошо изучены акворин (мономер 35 кДа) и обелин, выделенные из медуз *Aequorea* и гидроидного полипа *Obelia* соответственно. Данные фотопротеины представляют собой фермент-субстратный комплекс белка и люциферина (целентеразина) с кислородом, находящийся в неактивном состоянии. Реакция светоизлучения здесь не требует присутствия каких-либо кофакторов и органических субстратов, а инициируется ионами кальция.

Все известные биолюминесцентные системы содержат от трех до шести компонентов. Кроме уже перечисленных, в процессе могут участвовать специфические кофакторы, катионы, а также так называемые переизлучатели (соединения, поглощающие энергию молекул, перешедших в электронно-возбужденное состояние и преобразующие эту энергию в кванты света более низкой частоты). Известно около 30 разновидностей биолюминесцентных систем, из них более-менее детально изучены менее десяти, для шести типов организмов уже секвенирован ген люциферазы (фотопротеина). Большое разнообразие структур люциферинов, ферментов и кодирующих их генов, особенностей и регуляторных механизмов люминесценции указывает на то, что у разных организмов биолюминесцентные системы в процессе эволюции возникли независимо. Следует отметить, что у светящихся организмов, принадлежащих к различным таксонам высокого ранга (начиная с класса), структура люциферинов сильно различается, видовая же специфичность в строении люциферинов отсутствует. Например, у бактерий, медуз, насекомых структура этих молекул имеет мало сходства, а у всех изученных видов светлячков содержится один и тот же люциферин.

Перспективность применения биолюминесцентного анализа определяется тем, что, во-первых, конечным продуктом люциферазной реакции является свет, который легко и с большой точностью измеряется при помощи современной

электронно-оптической техники. В связи с этим биолюминесцентные реакции чрезвычайно чувствительны. Пределы обнаружения АТФ и НАДН составляют соответственно 10^{-17} и 10^{-19} моль/л. Биолюминесцентный метод анализа НАДН обладает в 25 000 раз более высокой чувствительностью по сравнению со спектрофотометрией. Во-вторых, в основе светоизлучения лежат ферментативные реакции, что определяет высокую специфичность метода. В-третьих, около 20% всех известных ферментов являются АТФ- и НАД(Ф)-зависимыми. Это позволяет определять концентрацию различных метаболитов и широкого спектра ферментов, характеризующих самые разные метаболические процессы. В-четвертых, экспрессность и высокая чувствительность метода позволяют проводить исследования в микрообразцах биологического материала с минимальным количеством реактивов и времени.

Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины на сегодняшний день обнаружены более чем у 25 различных кишечнорастворимых (Haddock S.H. et al., 2010). Среди них наиболее изучены акворин и обелин, ДНК, кодирующая эти белки, была клонирована и с высоким выходом экспрессирована в бактериальных клетках (Frank L.A., 2010). Рекомбинантные фотопротеины всесторонне изучены по биохимическим и биофизическим свойствам, третичной структуре и механизму биолюминесценции. В частности, описана разработка твердофазного биолюминесцентного иммуноанализа гормонов щитовидной железы (Frank L.A. et al., 2004). В качестве биолюминесцентной метки используется рекомбинантный обелин. Для получения конъюгатов обелина с иммуноглобулинами, специфичными к тиреотропному гормону (ТТГ) и тироксину (Т4), в молекулу фотопротеина вводили дополнительные SH-группы, а затем конъюгировали обелин с сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат-активированными молекулами специфических иммуноглобулинов. Общий выход конъюгатов обелина, определенный по люминесцентной активности, после всех химических процедур и процедур очистки составлял 60–65%. Полученные конъюгаты были устойчивы к лиофилизации и в растворе не менее 9 мес при температуре 4 °С, потеря активности не превышала 10%. Применение конъюгатов обелина для определения ТТГ, общего Т4 и свободного Т4 в стандартных, контрольных и в сыворотках пациентов показывала высокую чувствительность и воспроизводимость результатов (Frank L.A. et al., 2004).

Hallett M.V. и Campbell A.K. (1983) с помощью обелина провели прямое измерение внутриклеточного свободного Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах крыс. Было установлено, что макрофаги, нагруженные фотопротеином, в состоянии покоя имели внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в $0,24 \pm 0,02$ мкМ. Ионифор кальция А23187 вызывал длительное повышение внутриклеточного Ca^{2+} , а также стимулировал выработку кислородных радикалов, что контролировалось с помощью люминолзависимой хемилюминесценции. Хемотаксический пептид

(N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин) в концентрации 1 мкМ вызывал временное увеличение цитоплазматического Ca^{2+} , которое достигало плато на уровне $1,2 \pm 0,64$ мкМ и снижалось с периодом полувыведения примерно в 40 с. Неопсонизированные латексные частицы (диаметром в 1 мкм) не вызывали какого-либо заметного повышения внутриклеточного Ca^{2+} . Включение хелатора кальция EGTA-ethylene-glycol-bis-(aminoethylether) tetra-acetate в цитоплазму устраняло транзиторное внутриклеточное повышение Ca^{2+} , индуцированное хемотаксическим пептидом. Также было прекращено производство кислородных радикалов. Однако внутриклеточная ЭГТА не влияла на продукцию кислородных радикалов, индуцированную неопсонизированными частицами. Был сделан вывод, что выработка кислородных радикалов, обнаруженная с помощью хемилюминесценции, может быть вызвана повышением внутриклеточного Ca^{2+} .

Люцифераза светляков представляет собой мономер с молекулярной массой около 60 кДа, который способен димеризоваться при высокой концентрации. Утверждается, что люцифераза светляков, кроме люминесцентной, способна проявлять и другие многочисленные ферментативные функции, но любая ее функция всегда реализуется за счет активации АТФ-связывающего сайта (Thorne N. et al., 2010). В состав люциферазы *Photinus pyralis* входит большое число гидрофобных аминокислот. Это объясняет высокую склонность фермента к образованию агрегатов, особенно при низких значениях ионной силы. Так, подобно белкам мембран, люцифераза может образовывать ассоциаты с фосфолипидами. SH-группа, играющая роль в катализе, имеет гидрофобное окружение и находится вблизи люциферин-связывающего участка. Многие гидрофобные соединения являются ингибиторами люциферазы, конкурентными по отношению к люциферину, а аналоги АТФ — неконкурентными (Haubrich V.A. et al., 2020).

Методы определения АТФ с использованием люциферин-люциферазной системы светляков широко используются во многих областях медицины и биологии. Чувствительность метода достигает 10^{-17} моля АТФ в образце. На основе иммобилизованной люциферазы светляков разработаны методы определения таких ферментов, как креатинфосфокиназа, пируваткиназа, АТФаза, АТФ-сульфгидролаза (Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012; Lomakina G.Y., Ugarova N.N., 2022).

В работе Yu. Lomakina G., Ugarova N.N. (2022) показано влияние мембраноактивного антибиотика колистина на живые клетки, для чего были использованы рекомбинантные клетки *Escherichia coli*, экспрессирующие термостабильную люциферазу светлячка *Luciola mingrelica*. АТФ-зависимая люцифераза оказалась информативным белковым маркером для выявления необратимых изменений проницаемости клеточных мембран. Изучение кинетики внутри- и внеклеточной концентрации АТФ при различном содержании колистина показало, что скорость снижения внутриклеточной концентрации АТФ значительно

превышала скорость накопления внеклеточной концентрации АТФ. Этот факт нельзя было объяснить только высвобождением АТФ из клетки с увеличением проницаемости наружной клеточной мембраны под действием колистина. Авторами предположено, что потеря значительной части внутриклеточного АТФ в присутствии колистина обусловлена снижением активности ферментов дыхательной цепи и АТФ-синтазы, приводящие к снижению скорости синтеза АТФ или даже до его остановки (Yu. Lomakina G., Ugarova N.N., 2022).

В работе Lomakina G.Y., Ugarova N.N. (2022) рассмотрены возможности использования люциферин-люциферазной реакции, основанной на окислении D-люциферина кислородом в присутствии АТФ и ионов магния, для изучения влияния внешних эффекторов физической и химической природы (температурное воздействие, добавки лекарственных препаратов, мембраноактивных соединений и др.) на живые клетки (прокариоты и эукариоты). В исследовании представлено применение разработанного на базе химического факультета МГУ (Москва, Россия) набора реактивов, содержащего все необходимые компоненты для регистрации стабильного сигнала биolumинесценции, пропорционального АТФ в широком диапазоне концентраций АТФ (коэффициент корреляции 0,99, предел обнаружения $\sim 10^{-12}$ М АТФ) и подходит для повторных, долгосрочных измерений АТФ в живых системах.

С помощью биolumинесцентной визуализации (использовали люциферазу светлячков) были изучены защитные эффекты мезенхимальных стволовых клеток, праймирующих ПГЕ₂ (PGE2-MSC), при остром повреждении легких, вызванном липополисахаридами бактериального происхождения (Hezam K. et al., 2023). Установлено, что PGE2-MSC эффективно уменьшают повреждение легких и снижают общее количество клеток, нейтрофилов, макрофагов и уровень белка в жидкости бронхоальвеолярного лаважа. Лечение приводило к резкому уменьшению гистопатологические изменений и количества провоспалительных цитокинов, одновременно увеличивая количество противовоспалительных цитокинов (рис. 129). Кроме того, результаты подтверждали, что праймирование ПГЕ₂ улучшало терапевтическую эффективность мезенхимальных стволовых клеток за счет поляризации макрофагов M2.

В исследовании Cao X. et al. (2022) представлена создание мышинной модели гепатоцеллюлярной карциномы путем одновременного нокаута генов-супрессоров Pten и p53 и сверхэкспрессии протоонкогенов c-Met и $\Delta 90$ - β -катенина. Мутации были введены с помощью транспозонных систем CRISPR/Cas9 и «Спящая красавица» (Sleeping Beauty transposon system — https://wiki5.ru/wiki/Sleeping_Beauty_transposon_system). При этом были использованы макрофаги,

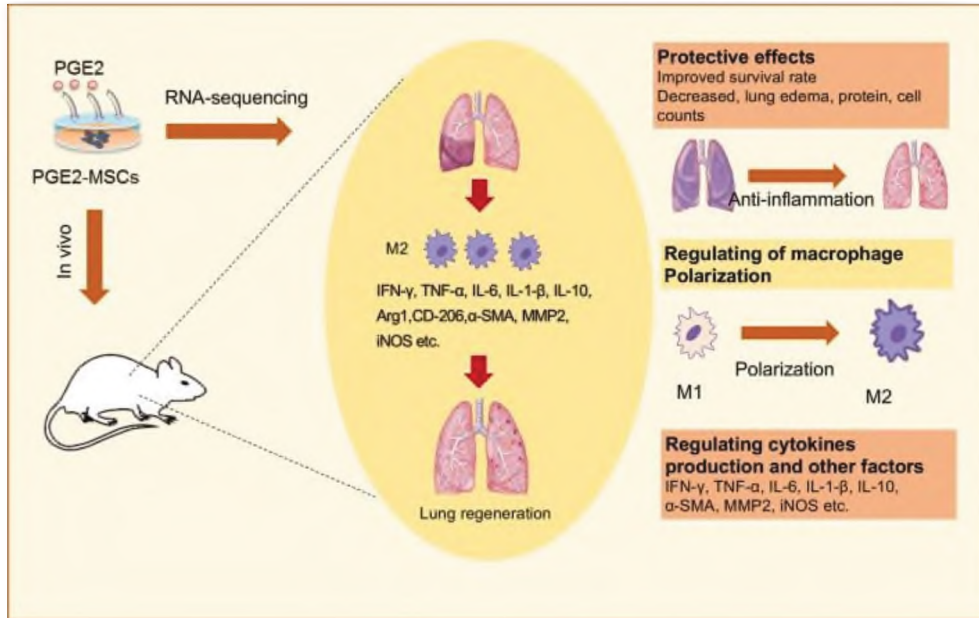


Рис. 129. Схематическая диаграмма механизмов лечения с помощью мезенхимальных стволовых клеток, праймирующих простагландин E₂, при остром повреждении легких, вызванном липополисахаридами бактериального происхождения (по Hezam K. et al., 2023)

экспрессирующие промотор аргиназы-1 (Arg1) в сочетании с люциферазой светлячка, для биолюминесцентной визуализации микроокружения опухоли (Сао Х. et al., 2022). Для этого макрофаги, полученные из костного мозга, были адоптивно перенесены от репортерных мышей Luc⁺ контрольным мышам и мышам с опухолями путем инфузии в хвостовую вену, а их распределение и миграцию контролировали с помощью биолюминесценции *in vivo*. Как показано на рис. 129 (А), интенсивная биолюминесценция наблюдалась в легких в течение 30 мин после инфузии как у контрольных мышей, так и у мышей с опухолями. Через 24 ч биолюминесценция у экспериментальных мышей была сконцентрирована в печени, тогда как у контрольных мышей биолюминесценция была слабой только в тонком кишечнике. Макрофаги Luc⁺ оставались в печени мышей с опухолями через 48 ч, тогда как макрофаги в контрольной группе мигрировали в селезенку и тонкий кишечник (см. рис. 130 А). Интенсивность биолюминесценции *ex vivo* паховых лимфатических узлов (ILN), подмышечных лимфатических узлов (ALN), подчелюстных лимфатических узлов (NLN), печеночных лимфатических узлов (LivLN), мезентериальных лимфатических узлов (MLN) и других органов

или тканей через 48 ч также подтвердило, что макрофаги были в основном распределены в печени мышей с опухолями, тогда как макрофаги в

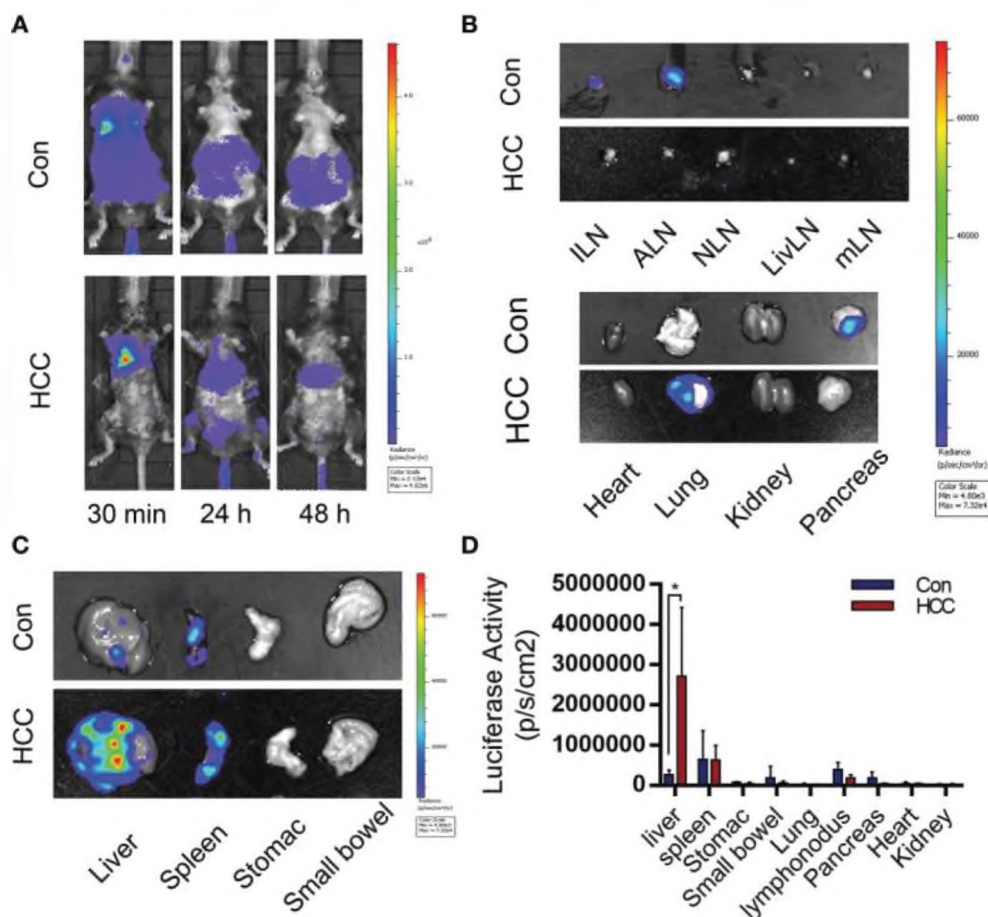


Рис. 130. Распределение макрофагов костномозгового происхождения в контрольной модели и мышинной модели с опухолями: (A) Миграция макрофагов в период от 30 мин до 48 ч после инъекции клеток. (B, C) Макрофаги в основном распределены в печени и селезенке мышей с опухолями. (D) Статистический анализ активности люциферазы в основных органах мышей

контрольной группе в основном располагались во вторичных лимфатических узлах и селезенке (рис. 130, B и C). Статистика биоломинесценции основных органов представлена на рис. 130, D), что указывает на то, что активность биоломинесценции печени была самой сильной. Эти данные свидетельствуют о том, что инфильтрация макрофагов в микроокружение опухоли печени приводит к их поляризации к фенотипу M2, экспрессирующему Arg1.

Сочетание стандартной лучевой терапии с иммунотерапией становится одним из основных направлений лечения НМРЛ. В исследовании Reijmen E. et al. (2021) продемонстрировано снижение роста опухоли и ряд иммунологических эффектов в диапазоне низких доз лучевой терапии. Изменение роста опухоли оценивали через биолюминесцентную визуализацию *in vivo* и иммуногистохимией *in vitro*. Установлено, что значительные иммунологические изменения, вызванные лучевой терапией, наблюдались в облученных легких и на периферии (в селезенке и крови). После лучевой терапии во всех оцениваемых тканях наблюдались значительное снижение количества CD8⁺ Т-клеток и тенденция к увеличению количества CD4⁺- и регуляторных Т-клеток. Примечательно, что только на периферии оставшиеся CD8⁺ Т-клетки демонстрировали более активированный фенотип. Кроме того, при лучевой терапии наблюдалось значительное увеличение количества нейтрофилов и моноцитов локально (в легких) и системно (в крови). Локально лучевая терапия увеличивала приток опухолеассоциированных макрофагов и обычных дендритных клеток второго типа, тогда как количество альвеолярных макрофагов и обычных дендритных клеток первого типа резко уменьшалось. Данные АПК демонстрировали пониженный уровень экспрессию антигена CD86, что указывало на снижение способности индуцировать эффективный иммунный ответ. Описан метод определения цитотоксической активности CD8⁺ Т-клеток с помощью многоканального люминометра (Hayashi R. et al., 2022). Были выделены цитотоксические Т-лимфоциты из селезенки животного с меланомой. Цитотоксическую активность CD8⁺ Т-клеток оценивали в опытах *in vitro* при совместном культивировании Т-лимфоцитов и клеток меланомы, экспрессирующих светляковую люциферазу. Установлено, что с увеличением функциональной активности цитотоксических Т-лимфоцитов рост опухоли замедляется.

Инвариантные естественные киллерные Т-клетки (iNKT) обладают способностью обеспечивать мощную противоопухолевую реактивность и поэтому стали предметом внимания при разработке клеточной иммунотерапии. Клетки iNKT атакуют опухолевые клетки, используя несколько механизмов с высокой эффективностью. Однако их клиническое применение ограничено из-за их небольшого количества у онкологических больных и трудностей с проникновением в солидные опухоли. В исследовании Li Y.R. et al. (2022) при использовании α -GalCer (α GC — синтетический гликолипидный лиганд), специфически рекрутирующего iNKT в солидные опухоли, подобные ограничения преодолены. Путем адоптивного переноса клеток iNKT человека в гуманизированных мышей NSG с опухолями и введения однократной дозы локализованного в опухоли α -GalCer продемонстрировано быстрое привлечение клеток iNKT человека в солидные опухоли всего за один день и значительно повышенную способность лизировать опухолевые клетки. С использованием клеток iNKT, меченных люциферазой светлячка, проведен контроль биораспределения в тканях у мышей NSG

с опухолями. В совокупности эти доклинические исследования демонстрируют перспективность иммунотерапии на основе клеток iNKT, управляемой αGS, для воздействия на солидные опухоли.

Оригинальный способ оценки микробного загрязнения различных сред разработали российские химики из МГУ им. Ломоносова (Москва, Россия). Чтобы обнаружить микробов, они заставляют их светиться с помощью той же химической реакции, которая дает свечение светлячкам. Этот метод экспресс-анализа позволяет буквально пересчитать микробов в молоке, мороженом или же на стенах больничной палаты всего за несколько минут. Люминесценция осуществляется благодаря взаимодействию фермента люциферазы светлячков с молекулой АТФ. Если оболочки микробных клеток разрушить, АТФ, содержащийся в них, окажется вне клеток, в растворе. Теперь, добавив в раствор люциферазу и необходимые реактивы, по интенсивности ее свечения можно определить количество микроорганизмов — стафилококков, сальмонеллы и т.д. Чем больше в пробе живых микробных клеток, тем сильнее будет светиться раствор. Создатели нового метода подчеркивают, что главное его преимущество — это его быстрота. Измерение АТФ занимает 1 мин, а на полный анализ образца в зависимости от длительности пробоподготовки требуется от 2 мин до 6 ч. Для сравнения: при традиционном способе оценки микробного загрязнения пробу помещают в питательную среду на несколько дней, пока микробы размножатся. Такой анализ длится от 24 до 72 ч. По-новому же методу «подрашивать» микробы требуется только в редких случаях, когда их уж совсем мало, причем все равно на это требуется не больше 6 ч (https://elementy.ru/novosti_nauki/164642/Svetlyachki_pomogayut_obnaruzhit_vrednykh_mikrobov).

Светящиеся бактерии — самые мелкие и самые изученные из светящихся организмов — обитают в почве, в соленой и пресной воде. Среди них есть свободноживущие, но есть и те, которые живут в симбиозе с рыбами, крабами, нематодами и другими многоклеточными организмами или же являются их паразитами. Исследованные люминесцентные бактерии принадлежат к четырем родам: *Photobacterium*, *Beneckea (Vibrio)*, *Alteromonas* и *Photorhabdus* (Kudryasheva N.S., 2005).

Бактериальная люминесцентная реакция катализируется ферментом — бактериальной люциферазой (монооксигеназой) и включает в себя процесс окисления восстановленного флавинонуклеотида ФМН-H₂ до ФМН и одновременно алифатического альдегида (C₈–C₁₄) до соответствующей жирной кислоты. Эта реакция протекает через стадию образования пероксида флавинонуклеотида и приводит к голубовато-зеленой люминесценции с максимумом при 490 нм. В отличие от всех известных билюминесцентных реакций, бактериальная проходит без образования углекислого газа. Бактериальная люцифераза

представляет собой гетеродимер, состоящий из двух неидентичных субъединиц (α и β), с молекулярной массой 40 кДа и 35–37 кДа соответственно. Активный центр локализован на α -субъединице (Yehia M.R. et al., 2022). На основе бактериальной биолюминесценции нами разработаны методы определения внутриклеточной активности широкого спектра НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ. Результаты представлены в различных публикациях и, в том числе в данной монографии.

Для выполнения методов био- и хемилюминесцентного анализа (см. ниже) был разработан биохемилюминесцентный анализатор БЛМ-3607М01 (ООО «МедБиоТех», Красноярск, Россия) (рис. 131.). Прибор БЛМ-3607 оснащен электронной системой управления и контроля параметров с помощью современных ПК.



Рис. 131. Общий вид прибора БЛМ-3607М01

Анализатор биохемилюминесцентный работает в режиме счета импульсов с автоматическим выбором диапазона измерения и с внутренней автоматической системой калибровки измерений. Программное обеспечение прибора позволяет провести одновременно измерение в 36 кюветках с определением следующих параметров:

- создание файла и возможность обработки результатов измерения после проведения эксперимента;

- определение максимального значения интенсивности свечения;
- определение на кривой время достижения максимального свечения;
- определение константы спада интенсивности свечения;
- определение скорости выхода на максимум свечения;
- определение площади пика в относительных единицах;
- цифровая фильтрация шумов кривых при обработке результатов измерения.

Технические характеристики:

область спектральной чувствительности	нм	300–800
объем измерительной кюветы	мл	1
общее количество кювет	шт.	36
количество рабочих кювет	шт.	35
диапазон температуры кюветного отделения	С	20–45
динамический диапазон измерений		1–1 000 000
время измерения одной точки биохемилюминесцентной кривой	с	0,1–10
время перехода между двумя рядом стоящими пробами, не более	с	0,3
общее время измерения биохемилюминесценции	мин	1–240
число точек измерения на каждую биохемилюминесцентную кривую		1–440
количество каналов для подключения внешних дозаторов		4
электропитание прибора осуществляется от однофазной сети переменного тока напряжением 220 вольт с частотой 49–51 Гц, с заземлением.		

Исходя из сопряженной системы, на основе биферментной системы светящихся бактерий разработан биолюминесцентный метод по определению активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в клетках иммунной системы (лимфоциты, нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки):



где ФМН — флавиномононуклеотид, C₁₄ — миристиновый альдегид, hν — квант света.

Выделенные клетки подсчитывали и раствором Хенкса доводили до уровня 1 млн/мл. Клетки разрушали путем осмотического лизиса (1:5 по объему) с добавлением дитиотреитола 2,0 мМ. Данным методом определяли активность следующих ферментов: лактатдегидрогеназы (ЛДГ, ЕС 1.1.1.27), НАД-зависимой малатдегидрогеназы (МДГ, ЕС 1.1.1.37), НАДФ-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы (НАДФ-МДГ, ЕС 1.1.1.40), НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАД-ИЦДГ, ЕС 1.1.1.41) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

(Г6ФДГ, ЕС 1.1.1.49). Для этого 50 мкл суспензии разрушенных клеток добавляли в кювету люминометра к 150 мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат в концентрации 10^{-5} – 10^{-2} М и кофермент в концентрации 10^{-6} – 10^{-2} М при рН 5,5–10,4 (0,1 М K^+ , Na^+ -фосфатном или трис-НСI-буфере). После инкубации при 37 °С в течение 30 мин к 200 мкл инкубационной смеси добавляли по 50 мкл 0,005% миристинового альдегида и $1,5 \times 10^{-5}$ М ФМН и НАД(Ф):ФМНоксидоредуктаза-люциферазы (все реактивы биолюминесцентной смеси разводились в 0,1 М K^+ , Na^+ -фосфатном буфере с рН 7,0). Измеряли уровень биолюминесценции и при помощи калибровочной кривой определяли активность ферментов. Учитывая, что в клетках имеются субстраты для течения различных ферментативных реакций с наработкой НАД(Ф)Н, определяли условно названный субстратный фон. Определение производили в тех же условиях, но в инкубационную смесь вместо соответствующего субстрата вносили буфер. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах, где 1 Е = 1 мкмоль/мин (Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012). Воспроизводимость метода оценивали путем определения активности каждого фермента не менее чем в пяти параллельных определениях. Ошибка метода не превышала 5%.

Для оценки значимости биолюминесцентного метода определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов обследован 51 больной РГП внебольничного и госпитального происхождения, проходивших лечение в отделении гнойной хирургии и отделении реанимации и интенсивной терапии МУЗ «ГБСМП имени Н.С. Карповича» г. Красноярск. В качестве контроля обследованы 112 здоровых людей. У всех обследованных выделяли нейтрофилы и с помощью биолюминесцентного метода определяли активность ферментов. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинской декларации (2001 г.).

Известно, что чувствительность биолюминесцентного анализа при работе с биологическим материалом снижается (Kudryasheva N.S., 2006). Это связано, во-первых, с ингибирующим влиянием на биолюминесцентную систему продуктов распада клеток и, во-вторых, с различием в рН-оптимума люминесцентной системы бактерий и исследуемых ферментов (рис. 131). Так, для люминесцентного биферментного комплекса НАД(Ф):ФМНоксидоредуктаза-люцифераза оптимум рН составил 7,0, для НАД-ИЦДГ — 7,8, для ЛДГ — 9,0, для МДГ, НАДФ-МДГ и Г6ФДГ — 9,8.

Для повышения чувствительности метода осуществляется инкубация с коферментом и субстратом соответствующего фермента (для наработки НАДН и НАДФН) с последующим введением в пробу биолюминесцентных реактивов и измерением биолюминесценции. Для каждого фермента были подобраны оптимальные условия (табл. 47). НАД-ИЦДГ является аллостерическим ферментом, активность которого регулируется АДФ и АТФ (Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012).

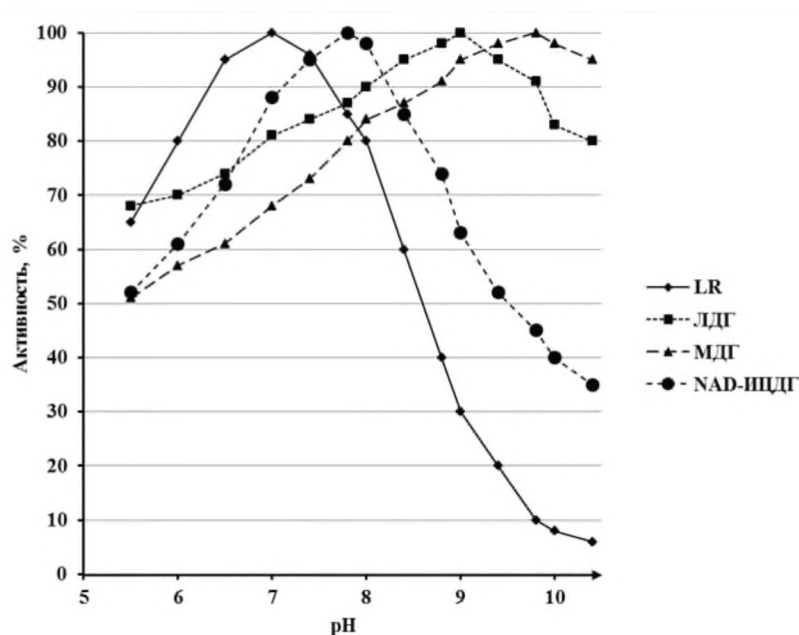


Рис. 132. pH-Зависимость активности никотинамидадениндинуклеотидфосфата: флавиномононуклеотидоксидоредуктазы-люциферазы и некоторых НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов

Примечание: активность ферментов представлена в %, где 100% — максимум, выявляемый в данных условиях

Таблица 47

Концентрация субстратов, коферментов и показатели pH среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах биолюминесцентным методом

Фермент	Субстрат — мМ	Кофермент — мМ	pH буфера
ЛДГ	Лактат — 2,0	НАД — 0,50	9,0
МДГ	Малат — 2,0	НАД — 2,50	9,8
NADP-МДГ	Малат — 7,5	НАДФ — 0,375	9,8
NAD-ИЦДГ	Изоцитрат — 5,0	НАД — 5,0	7,8
Г6ФДГ	Глюкозо-6-фосфат — 1,5	НАДФ — 0,025	9,8

Так как при осмотическом лизисе клеток нарушаются все регуляторные взаимосвязи клеток, то для определения максимальной активности НАД-ИЦДГ в пробу инкубации добавляется АДФ в количестве 1,3 мМ. На рис. 133 представлена зависимость активности НАД-ИЦДГ от концентрации изоцитрата при введении в состав инкубационной пробы АДФ. Все это позволило достичь оптимальной чувствительности биолюминесцентного метода и снизить количество биологического материала до 10^4 клеток на 1 определение.

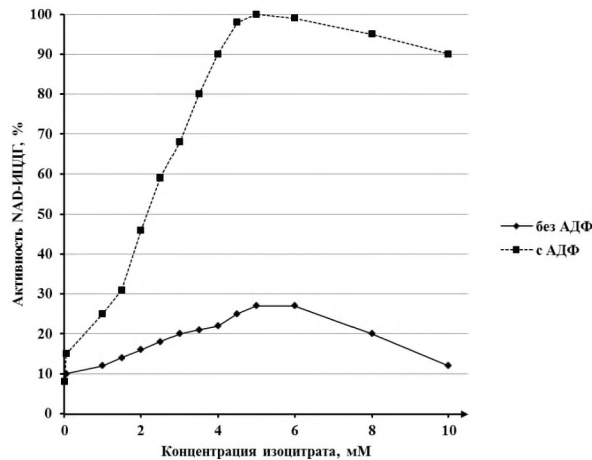


Рис. 133. Зависимость активности НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы от концентрации изоцитрата в инкубационной пробе в отсутствии и присутствии аденозиндифосфата

Примечание: то же, что и для рис. 131

Синтез АФК в процессе респираторного взрыва фагоцитов

Способность к продукции активных форм кислорода является одним из универсальных свойств фагоцитов позвоночных и беспозвоночных животных. В ответ на антигенный стимул или регуляторный сигнал повышается интенсивность потребления кислорода фагоцитирующими клетками. Кислород не только необходим для процессов жизнедеятельности самих клеток (например, аэробное дыхание), но и является основой для синтеза АФК необходимых для уничтожения фагоцитированных объектов.

Ключевым событием образования АФК является сборка ферментативного комплекса НАДФН-оксидазы [(NOX), NADPH-oxidase], (Beutler B., 2004). Фермент представляет собой клеточный мембраносвязанный мультимолекулярный комплекс, локализующийся преимущественно на цитоплазматической мембране и в некоторых органеллах. В организме человека и млекопитающих выделяют 7 типов NOX, различающихся по составу субъединиц, клеточной специфичности, регуляции и другим некоторым параметрам (NOX1-5, LNOX1 и LNOX2) (Sirokmány G. et al., 2016). Например, NOX1 локализуется в различных типах клеток (эндотелии, в клетках гладкой мускулатуры, в эпителии кишечника, в остеокластах, нейронах, глиальных клетках и фибробластах), участвует в регуляции кровяного давления, в росте и миграции гладкомышечных клеток. NOX2 преимущественно экспрессируется в моноцитарных и миелоцитарных клетках, инициирует развитие респираторного взрыва. В основе NOX находятся две мембранные единицы: p91phox и p22phox. Субъединица p91phox содержит

участок связывания НАДФН и простетическую группу ФАД в С-концевой (цитоплазматической) части. Phox в составе белков характеризует фагоцитарную роль фермента (phagocyte oxidase). В процессе активации НАДФН-оксидазы к мембранным субъединицам присоединяются цитоплазматические субъединицы (p47phox, p67phox, p40phox) и малый G-белок Rac1. Процесс сборки начинается с белка p47phox, который предварительно должен быть фосфорилирован протеинкиназой С. Необходимым условием этого являются сигналы от рецепторов фагоцитирующих клеток, отвечающих за распознавание патогена. Сборка ферментативного комплекса приводит к тому, что один из его компонентов, а именно gp91phox приобретает конформацию, способную передавать электрон, полученный от цитоплазматического НАДФН на молекулу кислорода O_2 . В результате этой реакции образуется короткоживущий супероксид-радикал или супероксид-анион ($O_2^{\bullet-}$), сочетающий в себе свойства аниона и радикала. Сам по себе он относится к АФК с низкой бактерицидной активностью, но способен запускать последующую цепь реакций, приводящих к формированию токсичных для микроорганизмов активных форм кислорода. Также необходимо отметить, что НАДФН синтезируется в пентозофосфатном цикле, что определяет зависимость активности НАДФН-оксидазы от внутриклеточных метаболических процессов.

В ходе следующей реакции супероксид-радикал взаимодействует с протонами, в результате чего образуется перекись водорода (H_2O_2), обладающая выраженной антимикробной активностью (рис. 134).

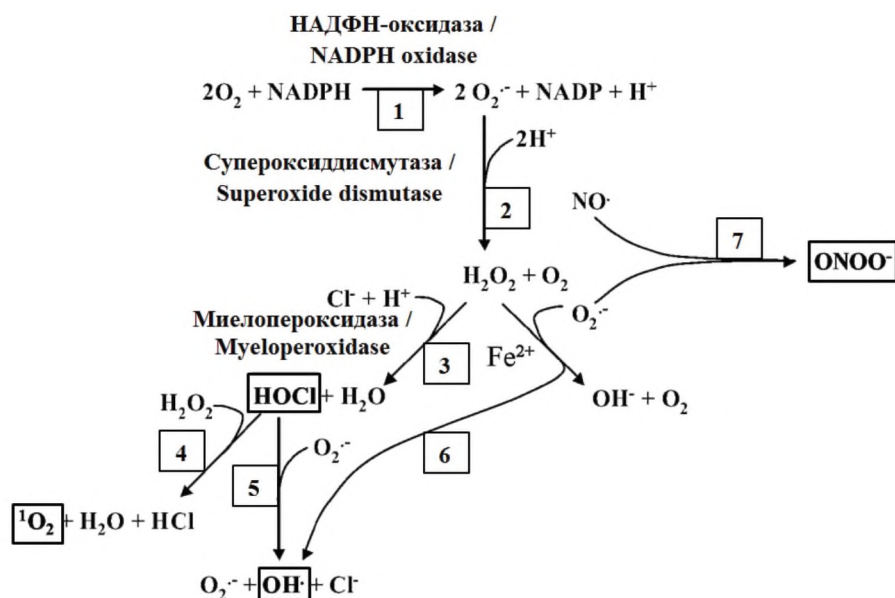


Рис. 134. Механизм синтеза АФК фагоцитирующими клетками (по Beutler, 2004)

Эта реакция протекает в присутствии фермента (СОД). Перекись водорода способна вызывать окисление SH-групп у различных белков и вызвать перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот. В организме человека и млекопитающих существует три типа СОД, различающихся по локализации, массе и виду переходного металла-кофактора в активном центра. СОД1 локализуется в цитоплазматическом компартменте, СОД2 — в митохондриях, СОД3 является внеклеточной формой. Атом Zn является структурным компонентом, тогда как атом Cu входит в состав активного центра СОД1 и СОД3. В составе активного центра СОД2 находится атом Mn. В составе активного центра СОД, выделяемых из бактерий, также обнаруживается атом Fe.

Образование перекиси водорода запускает каскад процессов, приводящих к формированию еще более токсичных форм кислорода. Так, в присутствии миелопероксидазы начинается формирование галоидных производных. При наличии протонов и ионов хлора реакция протекает с образованием хлорноватистой (гипохлорной) кислоты (HOCl), обладающей высоким антимикробным эффектом. При взаимодействии HOCl с аминокислотами происходит образование хлораминов, которые также обладают микробицидным действием.

HOCl может окисляться перекисью водорода с образованием синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, основной мишенью которого являются полиненасыщенные жирные кислоты. Результатом перекисного окисления последних является деструкция поверхностной мембраны микроорганизмов. С другой стороны, при взаимодействии с белками $^1\text{O}_2$ способен разрушать ковалентные связи между молекулами углерода. HOCl может взаимодействовать с $\text{O}_2^{\bullet-}$, в результате чего образуется гидроксильного радикала (HO^\bullet). Этот же радикал образуется и в ходе еще одной реакции — спонтанной дисмутации (реакция 6 на рис. 133), которая протекает в присутствии ионов железа. В результате этой реакции происходит взаимодействие супероксид-радикала с перекисью водорода (реакция Фентона). Образовавшийся гидроксильный радикал считается одним из самых токсичных метаболитов кислорода. Под его действием происходят разрыв нитей ДНК и пептидных связей внутри белковых молекул, окисление сульфгидрильных групп и т.д.

Супероксид-радикал принимает участие еще в нескольких реакциях, например в формировании пероксинитрита OONO , окисляющего сульфгидрильные группы различных молекул. Кроме этого при взаимодействии супероксид-радикала с водой идет формирование озона (O_3), также обладающего широким антимикробным действием.

Методы оценки синтеза АФК с помощью проточной цитометрии

Проточная цитофлуориметрия — современная технология быстрого измерения характеристик клеток при помощи моноклональных антител или других

зондов, позволяющая судить об их типе (по наличию того или иного набора клеточных маркеров) и функциональном состоянии (по изменению протекающих в них процессах). Принципиальным преимуществом проточной цитометрии по сравнению с другими общепринятыми и доступными лабораторными методами клеточного анализа является анализ индивидуальных параметров каждой клетки проанализированного образца. Анализ осуществляется в проточной ячейке прибора, где при помощи «гидродинамического фокусирования» частицы выстраиваются таким образом, чтобы проходить через зону анализа по очереди — одна за другой. Кроме того, современные приборы могут регистрировать несколько параметров для каждой отдельной клетки со скоростью до 10^5 клеток в секунду, тогда как анализ большого количества клеток (до 10^8 клеток и более в одном образце) позволяет достигать высокой статистической достоверности получаемых результатов. Применение логических ограничений (введение в протокол исследования различных зон анализа для клеток или «гейтов» одновременно) допускает определение нескольких субпопуляций клеток в одном образце. Это особенно важно при характеристике гетерогенных клеточных популяций, например лейкоцитов периферической крови, среди которых можно выявить отдельно нейтрофилы и моноциты для оценки уровня продукции АФК каждой клеточной популяций отдельно (рис. 135).

Как уже отмечалось, процесс поглощения объекта фагоцитоза клеткой сопровождается образованием в фаголизосоме широкого спектра АФК, обладающих бактерицидным действием. Для исследования различных продуктов этих реакций широко применяются методы проточной цитофлуориметрии. В настоящее время использование специфических флуоресцентных красителей позволило изучить продукцию практически всех кислородных радикалов у фагоцитов. Несмотря на широкий спектр известных красителей, наиболее часто в иммунологических исследованиях применяются только три, а именно дигидроэтидин, дихлородигидрофлуоресцеин и дигидрородамин 123. Все эти красители способны спонтанно диффундировать сквозь мембрану клеток и накапливаться в цитоплазме. Для эффективного возбуждения этих красителей применяются источники света с длиной волны около 488 нм, то есть самые распространенные и доступные большинству диагностических лабораторий. Для регистрации флуоресценции в случае дигидроэтидина используется фильтр с длиной волны пропускания около 610 нм (канал проточного цитометра, где идет регистрация фикоэритрина), тогда как в случае дихлородигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123 регистрация сигнала осуществляется в диапазоне 510–520 нм, что соответствует каналу для регистрации ФИТЦ.

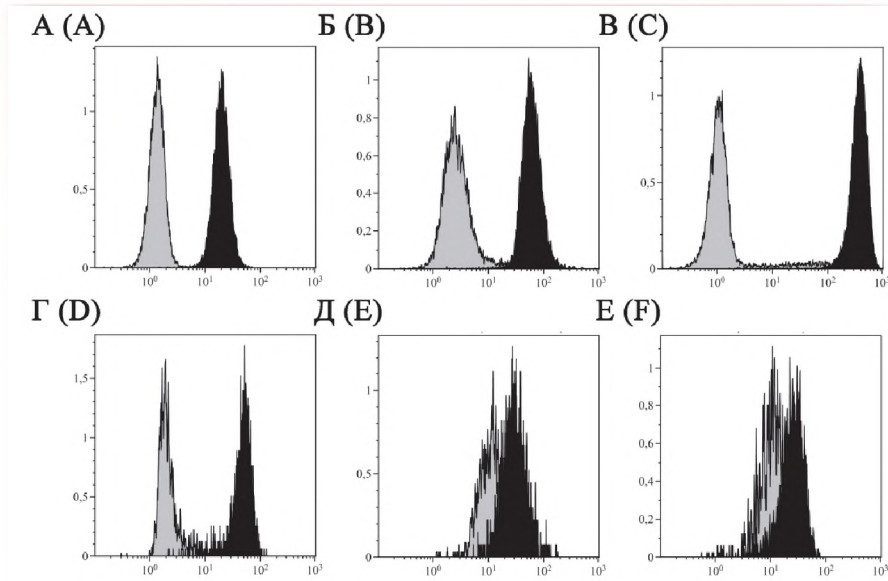


Рис. 135. Продукция активных форм кислорода нейтрофилами (гистограмма А–В) и моноцитами (Г–Е) периферической крови: по оси абсцисс — интенсивность флуоресценции дигидроэтидина (А и Г), 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина (Б и Д) и дигидроэтидием 123 (В и Е), соответственно; по оси ординат — количество проанализированных клеток. Серым — спонтанная продукция АФК, черным — продукция АФК после 15 минут инкубации клеток периферической крови в присутствии 50 нг/мл форболового эфира. Нейтрофилы выделены на основании экспрессии CD16, моноциты выделены на основании экспрессии CD14

Гидроэтидин (дигидроэтидин). Дигидроэтидин применяется для исследования продукции супероксид-радикала. После спонтанного проникновения через мембрану фагоцитирующей клетки, обусловленного наличием липофильных свойств, дигидроэтидин взаимодействует с $O_2^{\bullet-}$ с образованием двух флуоресцирующих форм — этидиума (E^+) и 2-гидрокси-этидиума (2-ОН- E^+). При этом показано, что формирование E^+ вызвано неспецифическими окислительно-восстановительными реакциями, которые не имеют прямого отношения к образованию супероксид-радикала (Zielonka J. et al., 2010). В то же время 2-гидрокси-этидиум, спектральные характеристики которого весьма близки к таковым E^+ , накапливается в клетках только в присутствии супероксид-радикала. Оба образовавшихся в ходе окисления вещества способны при облучении источником света с длиной волны около 500 нм испускать флуоресценции в красной части спектра с максимумом в районе 610 нм. Однако интенсивность их флуоресценции значительно возрастает после накопления в митохондриях или после перемещения в ядро клетки, где они связываются с ДНК. Особо следует подчеркнуть тот факт, что другие активные формы кислорода, например $ONOO^-$, OH^\bullet и H_2O_2 , способны

окислять дигидроэтидин именно до E^+ , что не позволяет рассматривать данный краситель в качестве специфического для определения уровня продукции $O_2^{\bullet-}$ фагоцитирующими клетками. Вместе с тем использование дигидроэтидина позволяет судить о способности клеток к формированию активных форм кислорода в целом, что не снижает его клинической значимости при диагностике и прогнозе характера течения широкого спектра заболеваний, связанных с нарушениями фагоцитарного звена врожденного иммунитета (Lyublinskaya O.G. et al., 2014). На модели экспериментальных животных на основе реакции дигидроэтидина разработан протокол определения активности миелопероксидазы *in vivo* и *ex vivo* в артериях для оценки воспалительных процессов и заболеваний сосудов (Talib J. et al., 2016).

Ограничения, связанные с неспецифическим формированием флуоресцирующих форм дигидроэтидина, распространяются и на его два основных аналога — гидропропидин и MitoSOX™ Red. Гидропропидин является водорастворимым аналогом дигидроэтидина, лишенным липофильных свойств, благодаря наличию сильного положительного заряда у молекулы (Kalyanaraman V. et al., 2014). Данная особенность строения молекулы предотвращает ее поглощение клетками, что позволяет использовать этот флуоресцентный зонд для измерения внеклеточного супероксид-радикала при помощи флуориметрии, а не проточной цитометрии. Краситель MitoSOX™ Red применяется для оценки уровня супероксид-радикала в митохондриях клеток при помощи флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии (Robinson K.M. et al., 2008).

Альтернативой дигидроэтидина могут служить высокоспецифические красители, флуоресценция которых не зависит от окислительно-восстановительных реакций. Например, соединения типа бис-(2,4-динитробензолсульфонил) флуоресцеинов (Maeda H. et al., 2005).

2,7-дихлоро-дигидрофлуоресцеин (H_2DCFH) получил широкое распространение в иммунологических и цитологических исследованиях благодаря тому, что в форме диацетата ($DCFH-DA$) он способен спонтанно проникать через мембрану клеток (Aranda A. et al., 2013). После прохождения мембраны под действием неспецифических эстераз, локализованных в цитоплазме клеток, он превращается в нефлуоресцирующее соединение — дихлородигидрофлуоресцеин ($DCFH$). В присутствии пероксидазы происходит окисление $DCFH$ за счет H_2O_2 , после чего $DCFH$ переходит в форму дихлорофлуоресцеина (DCF), обладающего выраженной флуоресценцией в зеленой части спектра. Именно эта форма красителя и регистрируется в клетках при проведении анализа с помощью методов проточной цитофлуориметрии. Например, Wang Y. et al. (2017) на основе анализа с $DCFH-DA$ охарактеризовали состояние респираторного взрыва макрофагов при формировании атеросклеротической бляшки (Wang Y. et al., 2017).

Несмотря на широкое применение данного красителя в иммунологических

исследованиях и в клеточной биологии в целом, DCFH-DA не может служить надежным индикатором для определения внутриклеточной H_2O_2 и других АФК по целому ряду причин. Во-первых, этот краситель непосредственно с H_2O_2 не реагирует с формированием флуоресцентного соединения, используемого для регистрации флуоресценции при помощи цитометрии. Во-вторых, помимо перекиси водорода, в цитоплазме клеток окисление DCFH может происходить и под действием гидроксильных (HO^\bullet) и пероксильных (ROO^\bullet) радикалов и некоторых других. Также существенным ограничением является и тот факт, что промежуточная форма красителя DCFH — DCF^\bullet — способна самостоятельно реагировать с кислородом с образованием супероксид-радикала, который в свою очередь в ходе дисмутации формирует внутриклеточную перекись водорода. Последнее событие приводит к более эффективному окислению DCFH во флуоресцирующую форму и сопровождается «искусственной» амплификацией флуоресцентного сигнала, регистрируемого при анализе клеток (Folkes L.K. et al., 2009). И, наконец, редокс-активные ионы металлов (например, Fe^{2+}), входящие в состав активных центров широкого спектра внутриклеточных ферментов, способны катализировать окисление DCFH, что также выражается в усилении флуоресценции клеток. Эти обстоятельства накладывают существенные ограничения на применение DCFH-DA как высокоспецифического флуоресцентного красителя для оценки уровня продукции АФК клетками, однако не снижают его популярности как показателя для оценки различных окислительно-восстановительных процессов, протекающих в живых системах.

Дигидрородамин 123 (DHR123), как и дихлородигидрофлуоресцеин, обладающий липофильными свойствами, способен спонтанно диффундировать через большинство клеточных мембран в виде нефлуоресцирующего соединения. Уже в цитоплазме под действием окислителей, в качестве которых выступает перекись водорода (а также в присутствии пероксидазы, цитохрома С или двухвалентного железа), краситель превращается в родамин 123, флуоресцирующий в зеленой части спектра с максимумом около 529 нм. Так как родамин 123 обладает катионными свойствами, то обычно он накапливается в составе митохондрий. Окисление дигидрородамина может происходить под действием $HOCl$ и пероскиннитрита $ONOO^-$, формирующегося в ходе реакции оксида азота и супероксид-радикала, образовавшимися в результате быстрого и спонтанного распада пероскиннитрита. Таким образом, данный краситель окисляется $ONOO^-$ опосредованно и не может рассматриваться в качестве специфического маркера для его регистрации в клетках. Более того, промежуточный радикал дигидрородамин — DHR^\bullet — способен реагировать с молекулами кислорода, что сопровождается искусственной амплификацией флуоресценции клеток за счет действия молекул красителя, накопившихся в клетке (Wardman P., 2008). Несмотря на столь низкую специфичность в выявлении конкретных АФК в

клетках, дигидрородамин широко применяется в иммунологических исследованиях. Более того, именно этот флуоресцентный краситель является «золотым стандартом» в диагностике такого первичного иммунодефицитного состояния, как хроническая гранулематозная болезнь (Vowells S.J. et al., 1995).

Хемилюминесцентный анализ респираторного взрыва фагоцитов

Другим методом оценки состояния респираторного взрыва фагоцитирующих клеток является хемилюминесцентный анализ. Под люминесценцией понимается широкий ряд реакций, в которых возбужденные молекулы переходят в основное состояние с испусканием кванта света. Люминесценция химических реакций называется хемилюминесценцией. Хемилюминесценция довольно часто возникает в реакциях окисления или при рекомбинации радикалов. Для ее возникновения, прежде всего, необходимо, чтобы общая выделяемая энергия была больше 70 ккал/моль (это соответствует диапазону энергий видимой области спектра 400–700 нм). В этих условиях может образоваться электронно-возбужденный продукт, возвращение которого в основное состояние сопровождается излучением видимого света. Свечение это довольно слабое, поскольку квантовый выход электронно-возбужденного продукта невысок (0,001–0,1). При этом под квантовым выходом хемилюминесценции понимается число испущенных квантов на один акт реакции.

Выделяют три главных этапа хемилюминесцентной реакции (Савченко А.А. и соавт., 2013; Allen R.C., 2015). Первым является подготовительный этап, в рамках которого осуществляется превращение исходных реагентов. С точки зрения механизма респираторного взрыва на этом этапе осуществляется синтез АФК. Второй этап определяется как ключевой, в рамках которого образуются продукты химической реакции (т.е. взаимодействие ионов и радикалов) — часть из них находится электронно-возбужденном состоянии. И на третьем этапе осуществляется испускание кванта света, а также различные процессы безызлучательной дезактивации эмиттера хемилюминесценции и, соответственно, переход электронно-возбужденной молекулы в «спокойное» состояние. Данный этап характеризуется такими показателями, как время жизни эмиттера и квантовый выход люминесценции. В связи с тем, что образовавшаяся на ключевой стадии электронно-возбужденная молекула эмиттера не всегда дезактивируется испусканием кванта света, квантовый выход люминесценции многих возбужденных продуктов бывает низким. Для усиления интенсивности хемилюминесцентной реакции используют метод сенсбилизации излучения. Для этого в хемилюминесцентную пробу добавляют специальный акцептор излучения (индикатор, активатор, вторичный эмиттер), на который осуществляется безызлучательный перенос энергии электронно-возбужденной молекулы, с последующим испусканием кванта света. Квантовый выход подобных хемилюминесцентных

реакций значительно увеличивается. В зависимости от присутствия в реакционной смеси индикаторов или их отсутствия хемиллюминесцентная реакция определяется, соответственно, как активированная (зависимая от индикатора) или неактивированная. Обязательным требованием к подобным индикаторам хемиллюминесцентной реакции является отсутствие какого-либо воздействия на биологические объекты.

В качестве основных индикаторов, которые на сегодняшний день используются в хемиллюминесцентном анализе оценки состояния респираторного взрыва, выступают люминол и люцигенин (Савченко А.А. и соавт., 2013). Люминол ($C_8H_7N_3O_2$) представляет собой белые или светло-желтые кристаллы, хорошо растворимые в полярных органических растворителях и практически не растворимые в воде. Люминол взаимодействует со всеми формами АФК. Это, безусловно, определяет невозможность его использования для оценки уровня синтеза конкретной АФК, но, с другой стороны, позволяет интегрально охарактеризовать состояние респираторного взрыва фагоцитирующих клеток.

Кроме люминола, в качестве хемиллюминесцентного индикатора также широко используется люцигенин (N,N-диметилбиакридилнитрат). Представляет собой золотисто-желтые кристаллы, хорошо растворимые в воде. Наиболее чувствителен к супероксид-радикалу. В связи с этим люцигенинзависимая хемиллюминесценция преимущественно используется для оценки уровня синтеза данной первичной АФК (Савченко А.А. с соавт., 2013).

Также для оценки состояния респираторного взрыва фагоцитирующих клеток используются и другие хемиллюминесцентные индикаторы. Так, аналогом люминола является индикатор L-012 8-амино-5-хлор-7-фенилпиридо[3,4-d]пиридазин-1,4-(2H,3H)дион. Считается, что интенсивность хемиллюминесценции при использовании L-012 в 100 раз выше, чем в люминолзависимой хемиллюминесценции (Zielonka J. et al., 2013). Кроме того, разработаны молекулы еще более усиливающие хемиллюминесцентную активность L-012. Так, в работе Ichibangase T. et al. (2014) сообщается, что чувствительность определения H_2O_2 в хемиллюминесцентной реакции L-012 в комплексе с 2-(4-гидроксифенил)-4,5-ди(2-пиридил)имидазолом и 4-йодфенолом составила 0,29 и 1,5 пмоль соответственно (Ichibangase T. et al., 2014). Разработан хемиллюминесцентный индикатор 2-метил-6-[p-метоксифенил]-3,7-дигидроимидазо[1,2-a]пиразин-3-он (MCLA), который является чувствительным к синглетному кислороду и супероксид-радикалу (Wang J. et al., 2012). В работе Hosaka S. et al. (2005) продемонстрирован метод оценки эффективности антиоксидантов по их снижению интенсивности MCLA-зависимой хемиллюминесценции (Hosaka S. et al., 2005). Таким образом, в запасе исследователей респираторного взрыва фагоцитирующих клеток имеется широкий спектр хемиллюминесцентных индикаторов, позволяющих с высокой степенью чувствительности оценивать как интегральное состояние респираторного

взрыва (весь синтезируемый клетками комплекс АФК), так и отдельные АФК.

Кинетика хемилюминесцентной реакции при оценке респираторного взрыва нейтрофилов крови у здоровых людей на примере люминола представлена на рис. 136. На рисунке представлена спонтанная хемилюминесценция (1) нейтрофильных гранулоцитов и зимозан-индуцированная (2). Наличие четко выраженной кинетики спонтанной хемилюминесценции связано с действием комплекса различных регуляторных факторов на клетки (например, изменение состава среды, температуры и т.д.). Опсонизированный зимозан является наиболее распространенным индуктором дыхательного взрыва фагоцитирующих клеток (Савченко А.А. и соавт., 2013). Зимозан представляет собой полисахарид, содержащийся в стенках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Кроме индукции респираторного взрыва, фагоцитов зимозан также способен активировать комплемент в присутствии пропердина по альтернативному пути. Опсонизированный зимозан индуцирует более интенсивный респираторный взрыв фагоцитирующих клеток, чем исходный.

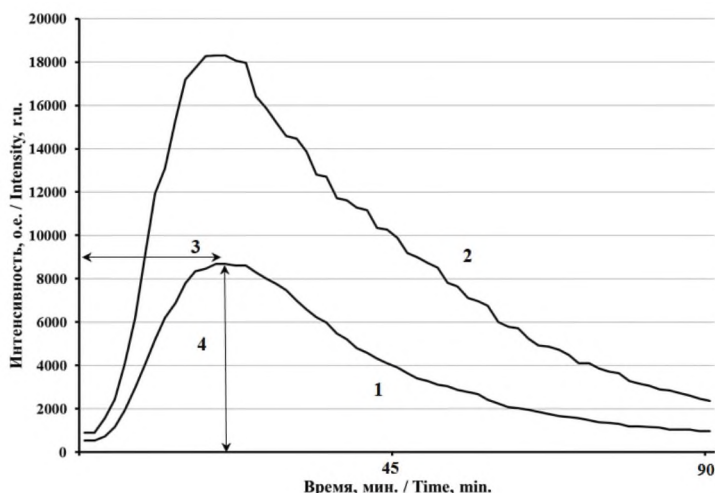


Рис. 136. Кинетика спонтанной (1) и зимозан-индуцированной (2) хемилюминесценции нейтрофилов крови здоровых людей: 3 — время выхода на максимум хемилюминесценции; 4 — максимум хемилюминесценции

Характеристику состояния респираторного взрыва осуществляют по следующим показателям, регистрируемым отдельно для спонтанной и индуцированной хемилюминесценции: время выхода на максимум (3), максимум интенсивности хемилюминесценции (4), площадь под кривой хемилюминесценции и индекс активации. Время выхода на максимум характеризует длительность развития максимальной активности синтеза АФК от момента антигенной или регуляторной индукции респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Этот

период, прежде всего, зависит от состояния внешней цитоплазматической мембраны и метаболизма клеток (Савченко А.А. и соавт., 2013). При острых инфекционно-воспалительных заболеваниях, когда нейтрофилы находятся в активированном состоянии, время выхода на максимум хемилюминесценции сокращается. В то же время при хронических воспалительных процессах на фоне снижения активности основных метаболических процессов в фагоцитах время выхода на максимум хемилюминесцентной активности увеличивается. Максимум интенсивности хемилюминесценции определяет максимальную активность синтеза АФК клеткой. Площадь под кривой хемилюминесценции интегрально характеризует весь комплекс АФК, вырабатываемых фагоцитами за исследуемый период. Максимум интенсивности и площадь под кривой также зависят от функционально-метаболического состояния фагоцитирующих клеток. Индекс активации вычисляется через отношение площади под кривой индуцированной хемилюминесценции к площади под кривой спонтанной хемилюминесценции и характеризует наличие внутриклеточных метаболических резервов для реализации респираторного взрыва.

В целом можно заключить, что хемилюминесцентный анализ является высокочувствительным и дает возможность получения бесконтактной информации о состоянии респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Кроме того, на основе хемилюминесцентного анализа также имеется возможность оценки влияния различных регуляторных факторов и патогенов на функцию фагоцитов.

Глава 12. Общие принципы лечения больных с иммунопатологией



Проблема восстановления функционального состояния иммунной системы при лечении больных различной патологией не требует обоснования. Современные достижения иммунологии и других смежных специальностей, а также разработка новых иммуотропных препаратов позволяют врачу оказать реальную и долговременную помощь больному с иммунными нарушениями. Однако в настоящее время нет единой концепции к подходам коррекции иммунных нарушений. Это связано с большим разнообразием иммунопатологических реакций и разными «сценариями» развития иммунных нарушений у одного и того же заболевания. При этом лечение больного с нарушением функции иммунитета не может ограничиваться только иммуноактивной терапией. Каждое заболевание — процесс мультифакторный, и, исходя из этого, лечение любого больного должно быть комплексным и индивидуальным, тем не менее необходимо соблюдать пять основных принципов лечения больных с нарушениями функции иммунной системы (рис. 137).

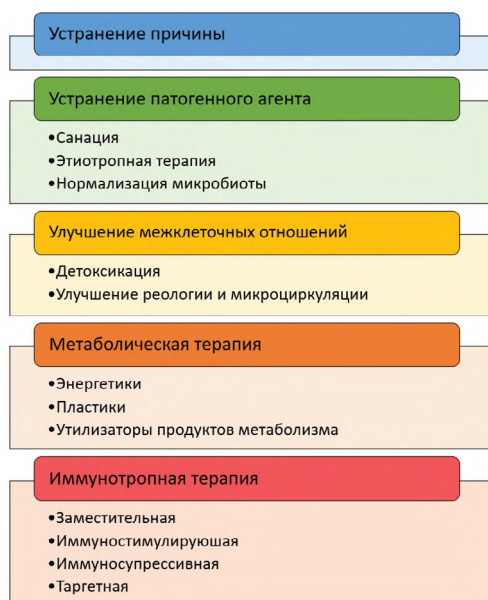


Рис. 137. Принципы лечения больных с нарушениями функции иммунной системы

Устранение причины иммунных нарушений

Выявив и устранив причину иммунных нарушений, возможно практически полностью решить проблемы, связанные с иммуноопосредованной патологией. Как отмечалось ранее, традиционно иммунные нарушения делят на две большие группы: первичные и вторичные иммунодефициты. При этом аутоиммунные и аллергические заболевания также можно рассматривать как иммунодефицит, связанный с нарушением процессов толерантности и/или супрессорных механизмов иммунитета. Во многих случаях, когда воздействие на иммунную систему не приобрело необратимый характер, лечебные мероприятия позволяют излечить больного — это особенно важно в период реабилитации (табл. 48).

Таблица 48

Подходы к устранению причин нарушений функционирования иммунной системы

Причина	Методы лечения и профилактики
Первичные иммунодефициты	Заместительная терапия, в том числе трансплантация костного мозга
Протозойные и глистные инвазии	Дегельминтизация и/или противопротозойная терапия
Бактериальные и вирусные инфекции	Антибактериальная и противовирусная терапия
Повреждающие факторы внешней среды	Профилактика и предотвращение воздействия факторов внешней среды
Интоксикации	Детоксикация
Ятрогенные	Коррекция терапии, полноценные реабилитационные мероприятия после лечения основного заболевания
Метаболические нарушения	Полноценное питание, иммунологическая диета
Заболевания эндокринной системы	Гормональная коррекция
Стресс	Повышенная физическая активность, полноценный сон
Физиологические иммунодефициты	Поддерживающая терапия

Устранение патогенного агента

Устранение патогенного агента, вызывающего иммунные нарушения, обычно сопряжено с лечением заболеваний, осуществляется врачами соответствующего профиля: инфекции и инвазии — инфекционистом, гормональные нарушения — эндокринологом, наркомания, токсикомания, алкоголизм — наркологом, кровопотери и потери белка — трансфузиологом и т.д.

Различные патогенные агенты являются причиной развития заболевания, поэтому санация патогенных очагов и этиотропная терапия осуществляются как одно из основных мероприятий в период лечебного процесса. Сложно получить

положительный результат лечения без санационных мероприятий, этиотропной терапии и нормализации микрофлоры.

Санационные мероприятия

Основным мероприятием при лечении больного с иммунными нарушениями является санация патогенного очага. Обычно это хирургические вмешательства. Данная операция приводит к уменьшению интоксикации, подавлению инфекции как в очаге, так и в организме больного в целом.

Однако санация подразумевает не только хирургические мероприятия. При лечении заболеваний верхних дыхательных путей (ангина, ОРВИ, острые и хронические синуситы и т.д.) это полоскание горла и промывание носа с применением гипертонического раствора и/или противовоспалительных и антибактериальных средств. При бронхитах и пневмониях — ингаляции и вибромассаж, применение муколитиков, при заболеваниях мочеполовой системы — гигиенические процедуры с использованием антибактериальных средств. Важным является местное применение антисептиков.

Этиотропная терапия

Этиотропная терапия выполняет защитную функцию, аналогичную функции иммунной системы. Разделение таких препаратов на группы по преимущественной активности базируется на классификации возбудителей инфекционных заболеваний человека. Выделяют антибактериальные (антибиотики, сульфаниламиды и ко-тримоксазол, нитроимидазолы, нитрофураны), противогрибковые, противовирусные, противопротозойные, противогельминтные препараты.

Коррекция дисбактериоза

Нарушение состава микробной флоры связано с нарушениями функций иммунной системы организма человека. Поэтому нормализация кишечного дисбактериоза может быть одним из основных мероприятий по коррекции иммунных нарушений. При этом необходимо решить следующие задачи:

- 1) нормализовать работу моторики кишечника (избавить больного от поносов и/или запоров);
- 2) санировать кишечник от патогенной и условно-патогенной флоры (бактериофаги, кишечные антисептики, фитонциды и антибактериальные препараты);
- 3) создать условия, способствующие более благоприятному развитию собственной флоры (аутофлоры) организма: коррекция нормальной микрофлоры кишечника с помощью различных пробиотиков, проведение энтеросорбции и энтеропротекции (карболен, полифепан, смекта и др.);
- 4) обеспечить функциональное питание;
- 5) сохранять и поддерживать микробную экологию кишечника.

Для восстановления нормальной микрофлоры кишечника применяют три группы препаратов: пробиотики, пребиотики, синбиотики.

Иммуотропная терапия

Актуальность проблемы восстановления иммунологических нарушений с помощью иммунокорректирующих препаратов в настоящее время несомненна и не требует обоснования. Однако при всей очевидности использование иммуотропных средств в комплексном лечении больных, их применение представляет собой сложную задачу и в настоящее время разработано недостаточно. Нет даже единого названия данного раздела терапии. В разное время этот вид терапии назывался по-разному: иммуномодулирующая, иммунокорректирующая, иммуноактивная, иммуотропная. Действительно, не всегда понятно, каким образом иммуномодулирующие препараты вызывают эффект возвращения из любого положения (угнетение, стимуляция) к нормальному уровню функционирования, при котором звенья иммунной системы не меняются или колеблются в нормальных пределах.

Иммунная система — это мощная эшелонированная многокомпонентная система, которую сложно вывести из равновесия, и поэтому при незначительных сбоях работы иммунитета самое главное — «не мешать» иммунной системе, она сама восстановится. Тем не менее с современных позиций варианты иммунотерапии представлены на рис. 138.



Рис. 138. Варианты иммунотерапии

При заместительной терапии большое значение имеет применение внутривенных иммуноглобулинов, свежезамороженной плазмы и цитокинов (IL, IFN, колониестимулирующего фактора и пр.). Без этих препаратов невозможно представить ведение больных с иммунными нарушениями тяжелой степени. Вероятно, в ближайшее время к этому списку прибавятся и методы клеточно-тканевой терапии.

Группа иммуностимулирующих препаратов весьма разнообразна. Попытка разделить иммуностимуляторы по избирательности действия осложняется отсутствием селективности действия существующих препаратов. С практической точки зрения необходимо выделить следующие группы:

бактериальные и вирусные вакцины, в основном обладающие профилактическим действием за счет формирования адаптивного иммунитета к конкретному возбудителю;

препараты бактериального происхождения, в том числе лизаты и антигенные экстракты, фрагменты пептидогликана клеточной стенки и РНК, липополисахариды бактерий и их синтетические аналоги. Эффект этих препаратов связан со стимуляцией врожденного иммунитета и в некоторых случаях — с формированием противобактериального адаптивного иммунитета.

Тимические и костномозговые иммунорегуляторные пептиды и их синтетические аналоги способны оказывать влияние на созревание «незрелых» клеток иммунной системы.

Аналогичным действием обладают иммунометаболические препараты. К этой группе относятся препараты дезоксирибонуклеиновой кислоты, производные пурина и пиримидина, имидазола, полиэтиленперазина и аминофталгидразита. Наиболее интересным является производное аминофталгидразита — галавит. Помимо иммуностимулирующего действия, он обладает выраженным противовоспалительным эффектом, что обуславливает широкое применение его при различных заболеваниях.

Следует выделить и отдельную группу индукторов синтеза интерферонов (амиксин, цитоферон, йодантипирин, неовир, кагоцел). Однако их эффективное применение возможно только после лабораторной оценки системы интерферонов.

Иммуносупрессивную терапию в зависимости от степени воздействия распределяют следующим образом:

препараты, подавляющие иммунный ответ в целом (глюкокортикоиды, цитостатики, производные хинолина и др.);

устраняющие реакции, сопровождающие иммунные процессы, обладающие противовоспалительным и частично иммунодепрессивным действием (нестероидные противовоспалительные средства, антигистаминные средства, стабилизаторы мембран тучных клеток);

средства, оказывающие специфическое иммунодепрессивное действие (моноклональные антитела против лимфоцитов и цитокинов).

Глава 13. Коррекция нарушений метаболизма клеток



Большое значение в лечении больного с наличием иммунных нарушений имеет нормализация и/или стимуляция работы клетки. К препаратам этой группы относится множество лекарственных средств, прямо или опосредованно влияющих на различные клетки человека, поэтому такой подход рекомендован в комплексной терапии и при иммунных нарушениях. В настоящее время в современной фармакопии это витамины, (водо- и жирорастворимые), антиоксиданты, анаболики, естественные метаболиты, средства, стимулирующие процессы регенерации, и т.д. Однако уже сегодня необходимо выделять лекарственные средства, напрямую влияющие на различные звенья метаболизма клетки (рис. 139). К этой группе необходимо отнести и большое количество иммуномодуляторов, применяемых в России, т.к. они в основном не обладают избирательным действием на иммунную систему, а действуют через метаболизм клеток иммунной системы.

С позиций биохимических реакций в каждой группе необходимо выделить препараты, действующие на регуляцию какой-либо реакции (гормоны, ферменты и коферменты) и субстраты этой реакции (естественные метаболиты).



Рис. 139. Классификация иммунометаболических препаратов

ПРЕПАРАТЫ, ПРЕИМУЩЕСТВЕННО ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ КЛЕТКИ

В эту группу входит большое количество водорастворимых витаминов и естественных метаболитов, которые можно разделить на регуляторы энергетических процессов, естественные метаболиты энергетических процессов, антигипоксанты.

Регуляторы энергетических процессов

Витамин В₁ (тиамин) активно влияет на различные функции организма, вмешиваясь в обмен веществ и нервно-рефлекторную регуляцию. С помощью фермента тиаминпирофосфаткиназы тиамин в организме превращается в тиаминпирофосфат, который является кофактором окислительного дезаминирования α -кетокислот. Большое количество его содержится в дрожжах, зародышах и оболочках пшеницы, овса, гречихи, а также в хлебе, изготовленном из муки простого помола. Суточная потребность взрослого человека в витамине В₁ составляет 1,5–2 мг.

Применяется с учетом суточной потребности витамина внутрь, внутримышечно, внутривенно, подкожно. Рекомендуется начинать парентеральное введение с малых доз (не более 0,5 мл 5 или 6% раствора) и только при хорошей переносимости вводить более высокие дозы. Внутримышечно (глубоко в мышцу), внутривенно (медленно), реже — подкожно. Взрослым назначают по 0,02–0,05 г тиамин хлорида (1 мл 2,5 или 5% раствора) или 0,03–0,06 г тиамин бромид (1 мл 3 или 6% раствора) 1 раз в день ежедневно, переходя на прием внутрь, детям — по 0,0125 г тиамин хлорида (0,5 мл 2,5% раствора) или по 0,015 г тиамин бромид (0,5 мл 3% раствора). Курс лечения — 10–30 инъекций. Внутрь после приема пищи взрослым в профилактических целях — по 0,005–0,01 г/сут, в лечебных — по 0,01 г 1–5 раз в сутки, максимальная доза — 0,05 г/сут. Курс лечения — 30–40 дней. Детям в возрасте до 3 лет — 0,005 г через день, 3–8 лет — по 0,005 г 3 раза в день через сутки. Курс лечения — 20–30 дней.

Противопоказания: гиперчувствительность, с осторожностью при энцефалопатии, в предклимактерический и климактерический период у женщин.

Возможные побочные реакции: крапивница, кожный зуд, ангионевротический отек, редко — анафилактический шок.

Чаще анафилактическая реакция развивается после внутривенного введения больших доз. При применении тиамин возможны повышенное потоотделение, тахикардия, болезненность (из-за низкого значения рН растворов) при подкожном, реже — при внутримышечном введении. Парентеральное введение рекомендовано только в том случае, если невозможен прием внутрь (тошнота, рвота, синдром мальабсорбции, предоперационные и/или послеоперационные состояния). Назначение декстрозы должно предшествовать приему тиамин.

Не рекомендуется одновременное парентеральное введение тиамин с пиридоксином или цианокобаламином. Пиридоксин затрудняет превращение тиамин в биологически активную форму. Цианокобаламин усиливает алергизирующее действие тиамин. Не следует смешивать в одном шприце тиамин и никотиновую кислоту (тиамин разрушается). Тиамин ослабляет эффект деполаризующих миорелаксантов (суксаметония йодид и др.). Нельзя вводить внутривенно тиамин с растворами, содержащими натрия гидросульфит в качестве антиоксиданта. Этанол замедляет скорость всасывания тиамин после перорального приема.

Витамин В₂ (рибофлавин). При поступлении в организм рибофлавин с помощью фермента рибофлавинкиназы превращается во флавиномононуклеотид, реакция которого с АТФ, катализируемая ФМН-аденилилтрансферазой, приводит к образованию флавинаденидинуклеотида. Оба продукта являются коферментами оксидоредуктаз и участвуют в переносе протонов и регулировании окислительно-восстановительных процессов, этим обусловлена их роль в углеводном, белковом и жировом обмене.

Суточная потребность в витамине В₂ для взрослого человека составляет 1,5–2 мг. В организме человека он поступает главным образом с мясными и молочными продуктами. Он широко распространен в растительном и животном мире и содержится в дрожжах, молочной сыворотке, яичном белке, мясе, рыбе, печени, горохе, зародышах и оболочках зерновых культур. Получен синтетически.

С терапевтической целью витамин В₂ обычно применяется внутрь, реже — внутримышечно. Внутрь: взрослым — 5–10 мг в сутки, в тяжелых случаях — 5–10 мг 3 раза в сутки, детям — 2–5 мг 1 раз в сутки. Длительность лечения — 1–1,5 мес. Внутримышечно: 1 мл 1% раствора (0,1 г) 1 раз в сутки в течение 10–15 дней (детям — 3–5 дней), затем 2–3 раза в неделю. Курс лечения — 15–20 инъекций. При заболеваниях глаз — 0,2–0,5 мл 1% раствора в течение 10–15 дней. При применении рибофлавин нельзя хранить в открытом месте, так как он разрушается под воздействием солнечных лучей.

При совместном применении рибофлавин уменьшает активность доксициклина, тетрациклина, окситетрациклина, эритромицина и линкомицина. Несовместим со стрептомицином. Хлорпромазин, имипрамин, амитриптилин за счет блокады флавинокиназы нарушают включение рибофлавин в ФМН и ФАД и увеличивают его выведение с мочой. Этанол, трициклические антидепрессанты, фенотиазины, препараты, блокирующие канальцевую секрецию, снижают абсорбцию (требуют увеличения дозы рибофлавин). М-холиноблокаторы увеличивают всасывание и биодоступность (снижают перистальтику кишечника). Тиреоидные гормоны ускоряют метаболизм. Витамин В₂ уменьшает и предупре-

ждает побочные эффекты хлорамфеникола (нарушение гемопоэза, неврит зрительного нерва). Совместим с лекарственными средствами, стимулирующими гемопоэз, антигипоксантами, анаболическими стероидами.

Противопоказания: гиперчувствительность. Изредка при применении возможно проявление крапивницы. Необходимо обратить внимание на то, что рибофлавин окрашивает мочу в светло-желтый цвет.

Витамин РР (никотиновая кислота) существует в виде никотиновой кислоты и никотиномида. Включается в простетическую группу ферментов, являющихся переносчиками водорода — НАД и НАДФ, регулирует окислительно-восстановительные процессы, тканевое дыхание, синтез белков и жиров, распад гликогена, угнетает липолиз в жировой ткани, уменьшает скорость синтеза липопротеидов низкой плотности, нормализует липидный состав крови: снижает уровень общего холестерина, липопротеидов низкой плотности, триглицеридов и повышает уровень липопротеидов высокой плотности, обладает антиатерогенными свойствами.

Суточная потребность в никотиновой кислоте и никотинамиде составляет для взрослого человека около 20 мг, при тяжелом физическом труде — около 25, для детей в зависимости от возраста — от 6 до 18 мг. Продукты, богатые витамином РР, — говяжья печень, дрожжи, брокколи, морковь, сыр, кукурузная мука, финики, яйца, рыба, молоко, арахис, свинина, картофель, помидоры, проростки пшеницы, продукты из цельных злаков, травы — люцерна, корень лопуха, листья одуванчика, котовник кошачий, кайенский перец, ромашка, песчанка, очанка, семя фенхеля, пажитник сенной, женьшень, хмель, хвощ, коровяк, крапива, овес, петрушка, мята перечная, листья малины, красный клевер, плоды шиповника, шалфей, щавель.

С терапевтической целью витамин РР применяется подкожно, внутримышечно и внутривенно — 10 мг (1% раствор по 1 мл) 1–2 раза в день в течение 10–15 дней. Высшие дозы для взрослых: разовая — 0,1 г, суточная — 0,3 г. Внутривенное введение требует осторожности, необходимо вводить медленно. Менее эффективно применение внутрь (после еды). Для профилактики взрослым назначают 15–25 мг, детям — 5–20 мг/сут, при пеллагре соответственно — по 100 мг 2–4 раза в день в течение 15–20 дней, детям — 12,5–50 мг 2–3 раза в день. Для профилактики гиповитаминоза РР наиболее предпочтительно сбалансированное питание. В процессе длительного лечения (особенно при назначении не в качестве витаминного лекарственного средства) необходимо контролировать функцию печени. Для предупреждения осложнений рекомендуется включать в диету продукты, богатые метионином (творог), или использовать метионин, липоевую кислоту и другие липотропные лекарственные средства.

Противопоказания: гиперчувствительность, выраженная артериальная гипертензия, атеросклероз, подагра, гиперурикемия, детский возраст (до 2 лет).

С осторожностью применять при геморрагиях, глаукоме, печеночной недостаточности, артериальной гипотензии, гиперацидном гастрите, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки (в стадии обострения).

При применении возможны кожная сыпь, кожный зуд, стридорозное дыхание, после внутривенного быстрого введения — ортостатическая гипотензия, коллапс, гиперемия кожи лица и верхней половины туловища, парестезии, головокружение, приливы крови к коже лица, головная боль, головокружение.

Местные реакции: болезненность в местах подкожного и внутримышечного введения.

Необходимо соблюдать осторожность при комбинировании с гипотензивными лекарственными средствами, антикоагулянтами и ацетилсалициловой кислотой.

Витамин С (аскорбиновая кислота) участвует в регуляции окислительно-восстановительных процессов, поскольку аскорбиновая кислота легко переходит в дегидроаскорбиновую и обратно, донируя или акцептируя два протона (окисляя или восстанавливая соответствующие субстраты). Аскорбиновая кислота, оказывая стимулирующее влияние на организм в целом, повышает его адаптационные возможности, резистентность к инфекциям. Дефицит витамина С приводит к отчетливому нарушению Т-системы иммунитета. Система же гуморального иммунитета более устойчива к С-витаминной недостаточности. Кроме дозы, большое значение имеет характер сочетания витамина С с другими препаратами, например с витаминами группы В (В₉ и В₁₂). Стимуляция фагоцитоза связана с непосредственным влиянием витамина на фагоциты и зависит от дозы препарата. Полагают, что витамин С увеличивает чувствительность бактерий к лизоциму.

В обычных условиях суточная потребность взрослого человека в аскорбиновой кислоте составляет 70–80 мг. Аскорбиновая кислота содержится в значительных количествах в плодах шиповника, капусте, лимонах, апельсинах, хрене, ягодах, хвое и др. Небольшое содержание — в печени, мозге, мышцах животных. При хранении продуктов (включая длительное замораживание, высушивание, соление, маринование), приготовлении пищи (особенно в медной посуде), измельчении овощей и фруктов в салатах, приготовлении пюре происходит частичное разрушение аскорбиновой кислоты (при температурной обработке — до 30–50%).

Для медицинских целей витамин С получают синтетическим путем. Рекомендации по применению витамина С весьма противоречивы. Общепринятая доза внутрь после еды для профилактики гиповитаминоза С: взрослым — 50–100 мг/сут, детям — 25–75 мг/сут. При беременности и лактации — 300 мг/сут в течение 10–15 дней, далее по 100 мг/сут с лечебной целью: детям — по 50–100 мг 2–3 раза в день, взрослым — по 50–100 мг 3–5 раз в день в течение

2 нед. Назначают внутримышечно или внутривенно по 50–150 мг (1–3 мл 5% раствора), при отравлениях — до 3 г (60 мл). Максимальная разовая доза — 200 мг, суточная — 1 г; детям — 50–100 мг/сут. Однако имеются рекомендации по ежедневному приему витамина С в больших дозах (3–6 г/сут). При таких передозировках могут развиваться повышение возбудимости центральной нервной системы, бессонница, тошнота, рвота, диарея, гиперацидный гастрит, альтерация слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, угнетение функции инсулярного аппарата поджелудочной железы (гипергликемия, глюкозурия), гипероксалурия, невролитиаз (из кальция оксалата), повреждение гломерулярного аппарата почек, умеренная поллакиурия (при приеме дозы более 600 мг/сут.). Минимальная ежедневная потребность в аскорбиновой кислоте в II–III триместрах беременности — около 60 мг. Следует иметь в виду, что плод может адаптироваться к высоким дозам аскорбиновой кислоты, которую принимает беременная женщина, и затем у новорожденного возможно развитие синдрома «отмены». Минимальная ежедневная потребность в период грудного вскармливания — 80 мг. Диета матери, содержащая адекватное количество аскорбиновой кислоты, достаточна для профилактики дефицита у грудного ребенка. Теоретически существует опасность для ребенка при применении матерью высоких доз аскорбиновой кислоты (рекомендуется не превышать кормящей матерью максимума ежедневной потребности в аскорбиновой кислоте).

Противопоказан прием витамина С при гиперчувствительности. С осторожностью назначать при сахарном диабете, дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, гемохроматозе, сидеробластной анемии, талассемии, гипероксалурии, почечнокаменной болезни.

Аскорбиновая кислота повышает концентрацию в крови бензилпенициллина и тетрациклинов, в дозе 1 г/сут повышает биодоступность этинилэстрадиола (в том числе входящего в состав пероральных контрацептивов), улучшает всасывание в кишечнике препаратов железа (переводит трехвалентное железо в двухвалентное), может повышать выведение железа при одновременном применении с дефероксамином, снижает эффективность гепарина и непрямых антикоагулянтов. Ацетилсалициловая кислота, пероральные контрацептивы, свежие соки и щелочное питье снижают всасывание и усвоение витамина С. При одновременном применении с ацетилсалициловой кислотой повышается выведение с мочой аскорбиновой кислоты и снижается выведение ацетилсалициловой кислоты. Ацетилсалициловая кислота снижает абсорбцию аскорбиновой кислоты примерно на 30%, увеличивает риск развития кристаллурии при лечении салицилатами и сульфаниламидами короткого действия, замедляет выведение почками кислот, увеличивает выведение лекарственных средств, имеющих щелочную реакцию (в том числе алкалоидов), снижает концентрацию в крови пероральных контрацептивов. Витамин С повышает общий клиренс этанола, который

в свою очередь снижает концентрацию аскорбиновой кислоты в организме. Лекарственные препараты хинолинового ряда, кальций, салицилаты, глюкокортикоиды при длительном применении истощают запасы аскорбиновой кислоты. Витамин С при одновременном применении уменьшает хронотропное действие изопrenalина, в высоких дозах повышает выведение мексилетина почками. Барбитураты и примидон повышают выведение аскорбиновой кислоты с мочой. Витамин С уменьшает терапевтическое действие антипсихотических препаратов (нейролептиков) — производных фенотиазина, а также канальцевую реабсорбцию амфетамина и трициклических антидепрессантов.

В связи со стимулирующим действием аскорбиновой кислоты на синтез глюкокортикоидных гормонов необходимо следить за функцией почек и артериальным давлением (АД). При длительном применении больших доз возможно угнетение функции инсулярного аппарата поджелудочной железы, поэтому в процессе лечения ее необходимо регулярно контролировать. У пациентов с повышенным содержанием железа в организме следует применять аскорбиновую кислоту в минимальных дозах.

Естественные метаболиты энергетических процессов

Декстроза (глюкоза) как субстрат обеспечивает энергетический обмен клеток всего организма. Глюкоза, поступая в ткани, фосфорилируется, превращаясь в глюкозо-6-фосфат, который активно включается во многие звенья обмена веществ организма, но, прежде всего, усиливает окислительно-восстановительные процессы. Изотонический 5% раствор глюкозы оказывает дезинтоксикационное, метаболическое действие, является источником ценного легкоусвояемого питательного вещества. При метаболизме глюкозы в тканях выделяется значительное количество энергии, необходимой для жизнедеятельности организма. Помимо этого, изотонический раствор восполняет объем потерянной жидкости, повышенная осмотическая активность гипертонических растворов увеличивает выход тканевой жидкости в сосудистое русло и удерживает ее в нем, повышает диурез и выведение токсических веществ. Вливание растворов глюкозы частично восполняет водный дефицит.

Гипертонический 10% раствор глюкозы повышает осмотическое давление крови, улучшает обмен веществ, повышает сократимость миокарда, улучшает антитоксическую функцию печени, расширяет сосуды, увеличивает диурез.

Показания к применению. Назначается при гипогликемии, недостаточности углеводного питания, токсикоинфекции, интоксикациях при заболеваниях печени (гепатит, дистрофия и атрофия печени, в том числе печеночная недостаточность), геморрагическом диатезе, дегидратации (рвота, диарея, послеоперационный период), интоксикации, коллапсе, шоке. Используется как компонент

различных кровезамещающих и противошоковых жидкостей; для приготовления растворов лекарственных средств для в/в введения.

Способ применения и дозы. В/в капельно, 5% раствор вводят с максимальной скоростью до 7 мл (150 кап)/мин (400 мл/ч); максимальная суточная доза для взрослых — 2000 мл; 10% раствор — до 60 кап/мин (3 мл/мин), максимальная суточная доза для взрослых — 1000 мл. В/в струйно — 10–50 мл 5 и 10% растворов.

У взрослых с нормальным обменом веществ суточная доза вводимой глюкозы не должна превышать 4–6 г/кг/сут, т.е. около 250–450 г/сут (при снижении интенсивности обмена веществ суточную дозу уменьшают до 200–300 г), при этом объем вводимой жидкости — 30–40 мл/кг/сут.

Детям для парентерального питания, наряду с жирами и аминокислотами, в первый день вводят 6 г глюкозы/кг/сут, в последующем — до 15 г/кг/сут. При расчете дозы глюкозы при введении 5 и 10% растворов нужно принимать во внимание допустимый объем вводимой жидкости: детям с массой 2–10 кг — 100–165 мл/кг/сут, детям с массой 10–40 кг — 45–100 мл/кг/сут.

Скорость введения: при нормальном состоянии обмена веществ максимальная скорость введения для взрослых — 0,25–0,50 г/кг/ч (при снижении интенсивности обмена веществ скорость введения снижают до 0,125–0,25 г/кг/ч). У детей скорость введения глюкозы не должна превышать 0,5 г/кг/ч, что составляет для 5% раствора — около 10 мл/мин — 200 капель/мин (20 капель = 1 мл).

Для более полного усвоения глюкозы, вводимой в больших дозах, одновременно с ней назначают инсулин из расчета 1 ед. инсулина на 4–5 г глюкозы. Больным диабетом глюкозу вводят под контролем ее содержания в крови и моче.

Противопоказания: гипергликемия, сахарный диабет, гипергидратация, послеоперационные нарушения утилизации глюкозы; гипертоническая кома, гиперлактацидемия. С осторожностью — при тяжелой сердечной недостаточности, отеке легких, олигурии, анурии, гипонатриемии.

Возможное побочное действие: гипергликемия, лихорадка, гипертония, острая левожелудочковая недостаточность. В месте введения — развитие инфекции, тромбоз.

Янтарная и лимонная кислота являются одним из основных субстратов цикла Кребса, способствуют выработке АТФ, усиливают клеточное дыхание, способствуют усвоению кислорода клетками. За счет стимуляции окислительно-восстановительных реакций, процессов дыхания и синтеза АТФ способны активировать физиологические функции органов и тканей, тем самым улучшая адаптационные и компенсаторно-защитные возможности организма. Помимо этого, под воздействием данных препаратов усиливаются секреция желудочного сока, образование соляной кислоты, повышается аппетит, уменьшается токсическое действие алкоголя.

Применяют в качестве средства для повышения неспецифической реактивности организма беременных женщин, улучшения его адаптационных и компенсаторно-защитных возможностей в целях профилактики осложнений при гипоксии, гипотрофии плода, при невынашивании беременности; для профилактики опьянения, при лечении острого алкогольного опьянения легкой и средней степени тяжести, для уменьшения токсического влияния алкоголя и постинтоксикационных расстройств, в комплексной терапии для лечения запойных состояний у больных с хроническим алкоголизмом, в период алкогольного абстинентного синдрома для комплексного лечения астеновегетативных расстройств (общая слабость, снижение работоспособности, аппетита); в качестве «пробного завтрака» при исследовании секреторной и кислотообразующей функции желудка.

При практическом применении оптимально использовать препарат лимонтар, в котором содержится 200 мг янтарной кислоты и 50 мг лимонной кислоты. Его применяют внутрь до еды: таблетку измельчают и растворяют в воде с питьевой содой (сода — на кончике ножа), для растворения можно использовать минеральную воду. Беременным лимонтар назначают по 1 таблетке в день в течение 10 дней в I триместре (на сроке беременности 12–14 нед) и в II (срок беременности 24–26 нед), в III триместре назначают за 10–25 дней до родов. Общая доза препарата за период беременности — 5,0–7,5 г.

При назначении в качестве «пробного завтрака» для исследования секреторной и кислотообразующей функции желудка принимают внутрь натощак 1 таблетку, предварительно растворив в 10–15 мл воды.

При появлении чувства тяжести в подложечной области лимонтар назначают после еды.

Противопоказания: при гиперчувствительности, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца (в т.ч. стенокардии), глаукоме, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки в стадии обострения, позднем гестозе (тяжелая форма).

Возможно появление болей в подложечной области (обычно эти явления проходят самостоятельно через 3–5 мин), повышенная секреция желудочного сока. У лиц, склонных к повышению АД, после приема препарата может повышаться АД.

Широко получил распространения раствор для инфузий на основе янтарной кислоты — *реамберин*. В качестве антигипоксического и детоксицирующего средства при острых интоксикациях различной этиологии у детей и взрослых реамберин вводят в/в капельно со скоростью не более 90 кап/мин. Взрослым препарат вводят до 400–800 мл/сут. Детям в возрасте старше 1 года суточная доза препарата определяется из расчета 10 мг/кг массы тела. Скорость введения пре-

парата и доза определяются в соответствии с состоянием пациента. Продолжительность курса введения препарата зависит от степени тяжести состояния пациента, но не должна превышать 11 дней.

Инозин (рибоксин, рибонозин). Нуклеозид — предшественник АТФ. Субстратно стимулирует синтез адениновых нуклеотидов, повышает активность некоторых ферментов цикла Кребса. Принимает непосредственное участие в обмене глюкозы и способствует активизации обмена при гипоксии и при отсутствии АТФ. Стимулирует окислительно-восстановительные процессы. Интенсифицирует метаболизм пировиноградной кислоты, нормализует процесс тканевого дыхания, способствует повышению активности ксантиндегидрогеназы. Оказывает положительное влияние на обменные процессы в миокарде, повышает его энергетический баланс, улучшает коронарное кровообращение, снижает агрегацию тромбоцитов, активирует регенерацию тканей.

Суточная доза при приеме внутрь составляет 0,6–2,4 г, в первые дни лечения она равна 0,6–0,8 г (по 0,2 г 3–4 раза в день). В случае хорошей переносимости ее повышают (на 2–3-й день) до 1,2 г, при необходимости — до 2,4 г/сут. Длительность лечения — от 4 нед до 1,5–3 мес. При урокопропорфирии суточная доза составляет 0,8 г (по 0,2 г 4 раза в день). В/в (медленно, струйно или капельно — 40–60 кап/мин): начинают с введения 200 мг (10 мл 2% раствора) 1 раз в день, при хорошей переносимости дозу увеличивают до 400 мг 1–2 раз в день. Продолжительность лечения — 10–15 дней. При острых нарушениях ритма и проводимости допустимо струйное введение в разовой дозе 200–400 мг. Для фармакологической защиты почек, подвергнутых ишемии, вводят в/в струйно в разовой дозе 1,2 г (60 мл 2% раствора) за 5–15 мин до пережатия почечной артерии, а затем еще 0,8 г (40 мл 2% раствора) сразу после восстановления кровообращения. Для в/в капельного введения 2% раствор разводят в 5% растворе декстрозы или 0,9% растворе NaCl (до 250 мл).

Антигипоксанты

Предуктал обуславливает эффект действия повышением энергетического потенциала, активацией окислительного декарбоксилирования и рационализацией потребления кислорода (усиление аэробного гликолиза и блокада окисления жирных кислот). Предотвращает внутриклеточное истощение АТФ и фосфокреатинина. В условиях ацидоза нормализует функционирование ионных каналов мембран, внутриклеточную концентрацию K^+ , препятствует накоплению Ca^{2+} и Na^+ в кардиомиоцитах. Уменьшает внутриклеточный ацидоз и концентрацию фосфатов, обусловленных ишемией, ишемических повреждений миокарда, выход креатинфосфокиназы из клеток. Останавливает повреждающее действие свободных радикалов, сохраняет целостность клеточных мембран,

предотвращает активацию нейтрофилов в зоне ишемии, увеличивает продолжительность электрического потенциала. Препарат применяется внутрь по 2 таблетки (70 мг) в день во время еды в 2 приема. Курс лечения — от 1 до 2 мес.

Левокарнитин (элькар, L-карнитин) — природное вещество, родственное витаминам группы В. Участвует в процессах обмена веществ в качестве переносчика длинноцепочечных жирных кислот (пальмитиновой и др.) из цитоплазмы в митохондрии, где эти кислоты подвергаются процессу β -окисления с образованием аденозинтрифосфорной кислоты и ацетил-КоА, что способствует дополнительному энергообеспечению тканей. Улучшает белковый и жировой обмен, повышает секрецию и ферментативную активность желудочного и кишечного сока, улучшает усвоение пищи, снижает избыточную массу тела и уменьшает содержание жира в мышцах. Повышает устойчивость к физическим нагрузкам, угнетает образование кетокислот и анаэробный гликолиз, уменьшает степень лактатацидоза, способствует экономному расходованию гликогена и увеличивает его запасы в печени и мышцах.

Применяется внутрь за 30 мин до еды, дополнительно разбавленный жидкостью; при длительных физических и психоэмоциональных нагрузках: от 0,75 г (1/2 мерной ложки или 2,5 мл) 3 раза в день до 2,25 г (1,5 мерной ложки, или 7,5 мл) 2–3 раза в день; при нервной анорексии, а также в период реабилитации после перенесенных заболеваний и хирургических вмешательств и травм: по 1,5 г (1 мерная ложка, или 5 мл) 2 раза в день. Курс лечения — в течение 1–2 мес; в комплексной терапии хронического гастрита и хронического панкреатита с пониженной секреторной функцией: по 0,375 г (1/4 мерной ложки, или 1,25 мл) 2 раза в день, курс лечения — в течение 1–1,5 мес; для лечения кожных заболеваний: по 0,75 г (1/2 мерной ложки, или 2,5 мл), курс лечения — в течение 2–4 недель; при гипертиреозе легкой степени: по 0,25 г (13 капель) 2–3 раза в день, курс лечения — 20 дней, его повторяют после 1–2-месячного перерыва или назначают в течение 3 мес без перерыва; при сосудистых, токсических и травматических поражениях головного мозга: по 0,75 г (1/2 мерной ложки, или 2,5 мл) в сутки, курс лечения — в течение 3–5 дней, при необходимости через 12–14 дней назначают повторный курс; при заболеваниях, сопровождающихся недостатком карнитина (первичная и вторичная карнитиновая недостаточность): до 50–100 мг/кг (2–5 капель/кг) массы тела с кратностью приема 2–3 раза в день, курс лечения — в течение 3–4 мес. Детям назначают в виде добавки к сладким блюдам (кисель, компот, соки). Детям до 3 лет доза определяется лечащим врачом, от 3 до 6 лет — в разовой дозе 0,1 г (5 капель) 2–3 раза в день, в суточной дозе — 0,2–0,3 г (11–16 капель), курс лечения — 1 мес; детям от 6 до 12 лет назначают в разовой дозе 0,2–0,3 г (11–16 капель) 2–3 раза в день, в суточной дозе — 0,4–0,9 г (22–48 капель), курс лечения — не менее 1 мес; при задержке

роста: по 0,25 г (13 капель) 2–3 раза в день, курс лечения — 20 дней, его повторяют после 1–2-месячного перерыва или назначают в течение 3 мес без перерыва; в спортивной медицине и при интенсивных тренировках: по 2,5 г 1–3 раза в день (суточная доза — 2,5–7,5 г); в случае использования с лечебной целью — 70–100 мг/кг/сут (5–7,5 г/сут), курсы приема: в предсоревновательный период — 3–4 недели, в период тренировочного процесса — до 6–8 недель.

Цитохром С представляет собой высокомолекулярное железопорфириновое соединение, которое выделяют в виде очищенного кристаллического вещества, например, из миокарда крупного рогатого скота. Представляет собой конъюгированный белок, по структуре близкий к гемоглобину, состоит из гема и одиночной пептидной цепи (апоцитохром С). Цитохром С играет важнейшую роль в биохимических окислительно-восстановительных процессах практически у всех аэробных организмов. Эти реакции происходят с участием двух митохондриальных ферментов: цитохромоксидазы и цитохромредуктазы. Гем проявляет свойства либо донора, либо акцептора электронов. Он обладает высокой химической активностью в отношении утилизации кислородных радикалов, таких как супероксид или перекись водорода, которая является сильным окислителем. Метаболиты гема действуют как «ловушки» для пероксидного радикала. Препарат быстро и полностью всасывается при любых путях введения, хорошо проникает в клетки органов и тканей.

Комплексным препаратом, стимулирующим энергетику клетки, является **Цитофлавин** (инозин + никотинамид + рибофлавин + янтарная кислота), за счет комплексного воздействия на метаболизм клетки усиливает интенсивность аэробного гликолиза, увеличивает устойчивость мембран клеток к ишемии. Обладая антиоксидантным и антигипоксикантным действием, препарат оказывает положительное влияние на энергообразование в клетке, уменьшает продукцию свободных радикалов, активизирует окислительно-восстановительные ферменты дыхательной цепи митохондрий, ресинтез макроэргов, способствуя утилизации глюкозы и жирных кислот, что позволяет сделать вывод о целесообразности его использования при реабилитации пациентов с постковидным синдромом. Цитофлавин может влиять на ключевое патофизиологическое звено полиорганной недостаточности при COVID-19 за счет того, что усиливает тканевое дыхание и восстанавливает митохондриальное звено энергетического обмена клетки. Проведен анализ клинической практики применения лекарственных препаратов на основе сукцинатов у пациентов с тяжелым течением COVID-19. Применение препарата Цитофлавин повышало успех прекращения респираторной поддержки, ранней реабилитации и ускоряло выздоровление.

Добавление курсового последовательного применения Цитофлавина (10,0 мл на 200 мл физиологического раствора в течение 10 дней 1 раз/сут с переходом на пероральную форму препарата — по 2 таблетки 2 раза/сут в течение

25 дней) в схему комплексной реабилитации постковидного синдрома позволяло достоверно улучшить общее функциональное состояние организма, снизить выраженность астенического синдрома и повысить толерантность к физическим нагрузкам.

Обладая противовоспалительным, антиоксидантным и антигипоксанта́нным действием, Цитофлавин оказывает положительное влияние на энергообразовательное в клетке и восстанавливает активность ферментов антиоксидантной защиты. Это позволяет сделать вывод о целесообразности его использования при реабилитации пациентов с постковидным синдромом. По данным рандомизированного проспективного исследования ЦИТАДЕЛЬ с участием 100 пациентов (средний возраст $40,4 \pm 11,7$ года, давность перенесенного COVID-19 от 30 до 90 дней с момента выздоровления), назначение препарата Цитофлавин по 2 таблетки 2 раза/сут в течение 25 дней позволило добиться выраженного регресса астенических симптомов и коррекции когнитивных нарушений. Оценка состояния проводилась по шкале оценки астении (MFI-20), краткой шкале оценки психического статуса (опросник MMSE), опроснику качества жизни (EQ-5D), шкале оценки общего состояния здоровья, Питтсбургскому опроснику качества сна (PSQI). Ретроспективно выполнялся анализ лабораторных показателей. Был выявлен дополнительный положительный эффект Цитофлавина — уменьшение выраженности тромбоцитопении. Преимущества этого лекарственного препарата заключаются в синергичных механизмах действия его активных компонентов.

В экспериментальных и клинических исследованиях показано, что Цитофлавин обладает антиишемическим действием, улучшает коронарный и мозговой кровоток, в том числе при COVID-19. Результаты исследований позволяют рекомендовать Цитофлавин в программе лечения и реабилитации пациентов с постковидным синдромом при астенических расстройствах, нарушении когнитивных функций, особенно у коморбидных пациентов. Назначение препарата не требует возрастной корректировки дозы и хорошо сочетается с другой лекарственной терапией.

СРЕДСТВА, ДЕЙСТВУЮЩИЕ ПРЕИМУЩЕСТВЕННО НА ПЛАСТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КЛЕТКИ

В основе фармакологической регуляции пластических реакций клетки лежит стимуляция белкового синтеза, пролиферации и дифференцировки клеток. Для стимуляции этих процессов могут быть использованы различные группы лекарственных препаратов. Это прежде всего регуляторы — витамины, анаболические гормоны и другие синтетические средства, в т.ч. индукторы IFN и синтетические иммуномодуляторы, а также естественные метаболиты, в т.ч. препараты

дезоксирибонуклеиновой кислоты и ряда других синтетических иммуномодуляторов. Как отдельную третью группу иммунометаболических средств, влияющих на клетки иммунной системы, следует отнести индукторы IFN.

Регуляторы пластических процессов

Витамин В3 (пантотеновая кислота) в организме является субстратным (единственный незаменимый компонент) стимулятором синтеза кофермента А. Последний катализирует в организме ацилирование, участвует практически во всех метаболических процессах (цикл трикарбоновых кислот, обмен углеводов, жиров и жирных кислот, фосфолипидов, белков и др.), обеспечивает образование глюкокортикоидов, ацетилирование холина. Обладает противовоспалительным действием, стимулирует процессы репарации и регенерации.

Наиболее богаты витамином В₃ мясо и субпродукты, пивные дрожжи, отруби, зародыши пшеницы, зеленые овощи, орехи, маточное молочко пчел. Витамин может синтезироваться кишечными бактериями, но в недостаточном количестве, учитывая суточную потребность организма: для детей и подростков 5–7 мг, для взрослых — 10–12 мг, хотя при лечении доза может быть увеличена в несколько раз.

Витамин В6 (пиридоксин) — это групповое название трех производных пиридина: пиридоксаля, пиридоксина и пиридоксамина. Пиридоксин, поступая в организм, фосфорилируется и в этой форме катализирует декарбоксилирование и переаминирование аминокислот.

Витамин В6 содержится в растениях и органах животных, особенно в очищенных зернах злаковых культур, в овощах, мясе, рыбе, молоке, печени трески и крупного рогатого скота, яичном желтке, дрожжах. Суточная потребность взрослого человека составляет 2 мг и удовлетворяется частично продуктами питания, частично синтезом микрофлоры кишечника. Пиридоксин, поступая в организм, фосфорилируется и в этой форме катализирует декарбоксилирование и переаминирование аминокислот.

Суточная потребность в пиридоксине для взрослых — 2–2,5 мг; для детей от 6 мес до 1 года — 0,5 мг, 1–1,5 года — 0,9 мг, 1,5–2 года — 1 мг, 3–4 года — 1,3 мг, 5–6 лет — 1,4 мг, 7–10 лет — 1,7 мг, 11–13 лет — 2 мг; для юношей 14–17 лет — 2,2 мг; для девушек 14–17 лет — 1,9 мг; для женщин — 2 мг и дополнительно при беременности — 0,3 мг, при кормлении грудью — 0,5 мг.

С терапевтической целью пиридоксин принимается внутрь (после еды). Для профилактики гиповитаминоза В6 взрослым назначают по 2–5 мг/сут, детям — по 2 мг/сут, лечебные дозы для взрослых — 0,02–0,03 г 1–2 раза в день, для детей дозу уменьшают соответственно возрасту, курс лечения — 1–2 мес. Вводится парентерально (подкожно, внутримышечно или внутривенно), если

прием внутрь невозможен (при рвоте) и при нарушении всасывания в кишечнике: взрослым — по 0,05–0,1 г/сут в 1–2 приема, детям — по 0,02 г, курс лечения для взрослых — 1 мес, для детей — 2 нед, при сопутствующей терапии изо니아зидом, фтивазидом — по 0,005–0,01 г/сут. Для лечения сидеробластной анемии назначают внутрь по 0,1 г ежедневно или 0,1 г внутримышечно 2 раза в неделю. Целесообразно одновременно принимать фолиевую кислоту, цианокобаламин, рибофлавин. При паркинсонизме вводят внутримышечно по 100 мг/сут, на курс — 20–25 инъекций, курс лечения повторяют через 2–3 мес либо, начав с дозы 50–100 мг/сут, ежедневно увеличивают дозу на 50 мг, доводя ее до 300–400 мг/сут, в виде однократной инъекции в течение 12–15 дней; при депрессиях инволюционного возраста — внутримышечно по 200 мг/сут; для лечения пиридоксинзависимого судорожного синдрома: взрослым — внутривенно или внутримышечно 30–600 мг, детям — 10–100 мг ежедневно.

Применение витамина В₆ противопоказано при гиперчувствительности. Необходимо с осторожностью его назначать при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, ишемической болезни сердца. При тяжелых поражениях печени пиридоксин в больших дозах может вызвать ухудшение ее функции, также возможны крапивница, гиперсекреция желудочного сока, онемение, появление чувства сдавления в конечностях — симптом «чулок» и «перчаток», снижение лактации (иногда это используют как лечебный эффект); редко — судороги (возникают только при быстром введении).

Витамин В₉ (фолиевая кислота) катализирует перенос одноуглеродистых фрагментов в синтезе пуринов и пиримидинов, т.е. обеспечивает для образования РНК и ДНК. При дефиците витамина В₉ нарушаются митотическое деление клеток, их созревание и функционирование.

Содержится в свежих овощах (бобах, шпинате, томатах и др.), а также в печени и почках животных. В организме человека, кроме того, синтезируется микрофлорой кишечника. Суточная потребность взрослых людей в фолиевой кислоте — 200 мкг, беременных и кормящих женщин — 400–600 мкг, детей первого года жизни — 40–60 мкг. Для медицинских целей (в том числе при интоксикации, вызванной противоопухолевыми препаратами) используют синтетическую фолиевую кислоту, хотя сама она неактивна и в организме восстанавливается до тетрагидрофолиевой, являющейся коферментом многих метаболических процессов.

Для профилактики гиповитаминоза В₉ наиболее предпочтительно сбалансированное питание. С лечебной целью фолиевая кислота назначается внутрь: взрослым — до 5 мг/сут в течение 20–30 дней, детям — в меньших дозах; для профилактики (исходя из суточной потребности) взрослым — 150–200 мкг/сут, детям до 3 лет — 25–50 мкг/сут, 4–6 лет — 75 мкг/сут, 7–10 лет — 100 мкг/сут; в период беременности — по 400 мкг/сут, в период лактации — по 300 мкг/сут.

Фолиевую кислоту не применяют для лечения B_{12} -дефицитной (пернициозной), нормоцитарной и апластической анемии, а также анемии, рефрактерной к терапии. При пернициозной (B_{12} -дефицитной) анемии фолиевая кислота, улучшая гематологические показатели, маскирует неврологические осложнения. Пока не исключена пернициозная анемия, назначение фолиевой кислоты в дозах, превышающих 0,4 мг/сут, не рекомендуется (исключение — беременность и период лактации). Следует иметь в виду, что пациенты, находящиеся на гемодиализе, нуждаются в повышенных количествах фолиевой кислоты.

Противопоказания: гиперчувствительность, пернициозная анемия.

Возможные осложнения в виде развития кожной сыпи, кожного зуда, бронхоспазма, эритемах, гипертермии.

Фолиевая кислота снижает эффект фенитонина (требуется увеличение его дозы). Анальгетики (длительная терапия), противосудорожные препараты (в том числе фенитонин и карбамазепин), эстрогены, пероральные контрацептивы увеличивают потребность в фолиевой кислоте. Антациды (в том числе препараты Ca^{2+} , Al^{3+} и Mg^{2+}), колестирамин, сульфонамины (в том числе сульфасалазин) снижают абсорбцию фолиевой кислоты. Метотрексат, пириметамин, триамтерен, триметоприм ингибируют дигидрофолатредуктазу и снижают эффект фолиевой кислоты (вместо нее пациентам, применяющим эти препараты, следует назначать кальция фолинат). В отношении препаратов Zn^{2+} однозначная информация отсутствует: одни исследования показывают, что фолаты ингибируют абсорбцию Zn^{2+} , другие эти данные опровергают. Во время лечения антациды следует применять спустя 2 ч после приема фолиевой кислоты, колестирамин — за 4–6 ч до или спустя 1 ч после приема фолиевой кислоты. Следует иметь в виду, что антибиотики могут исказить (давать заведомо заниженные показатели) результаты микробиологической оценки концентрации фолиевой кислоты в плазме и эритроцитах. При применении больших доз фолиевой кислоты, а также терапии в течение длительного периода возможно снижение концентрации витамина B_{12} .

Витамин B_{12} (цианокобаламин) — комплексное соединение, имеющее в основе цикл коррина и содержащее координационно связанный ион кобальта. В тканях животных не синтезируется. Витамин B_{12} в организме превращается в коферментные формы — метилкобаламин и дезоксиаденозилкобаламин. Как кофермент участвует в различных метаболических процессах, включая метаболизм жиров и углеводов и синтез белка. Является фактором роста и стимулятором гемопоеза, оказывает благоприятное влияние на функции печени и нервной системы, активирует процессы свертывания крови. Очевидна эффективность витамина B_{12} в нормальных дозах при крайне расстроенных гемопоетических и иммунологических функциях (нарушение дифференцировки В-клеток, снижение числа плазмочитов, АТ, лейкопения, мегалобластная анемия, рецидивирующая

инфекция). Однако отмечается стимулирующее влияние витамина В₁₂ на рост опухоли (в отличие от В₁, В₂, В₆). Одно из основных иммуномоделирующих действий витамина В₁₂ — влияние на обмен нуклеиновых кислот и белков.

Источниками витамина В₁₂ служат различные виды мяса, рыба, яйца, молоко, сыр, но он полностью отсутствует в растительной пище. Витамин всасывается слизистой желудка только в присутствии секретируемого (эндогенного) гликопротеина, так называемого внутреннего фактора. Назначение этого мукопротеида заключается в связывании цианокобаламина и тем самым — в защите от деградации. В крови В₁₂ также связывается специальным белком — транскобаламином. Его синтез в природе осуществляется только микроорганизмами. Потребности человека и животных в нем обеспечиваются микрофлорой кишечника, откуда цианокобаламин поступает в органы, накапливаясь в наибольших количествах в почках, печени, стенках кишечника. Суточная потребность в этом витамине составляет 0,003 мг. Витамин В₁₂ в организме превращается в коферментные формы — метилкобаламин и дезоксиаденозилкобаламин.

Внутри вводится подкожно, внутримышечно и внутривенно. При анемии Аддисона–Бирмера витамин назначают подкожно по 100–200 мкг/сут через день; при фуникулярном миелозе, макроцитарных анемиях с нарушением функции нервной системы — по 400–500 мкг/сут, в первую неделю — ежедневно, затем с интервалами между введениями до 5–7 дней (одновременно назначают фолиевую кислоту); в период ремиссии поддерживающая доза составляет 100 мкг/сут 2 раза в месяц; при наличии неврологических явлений — по 200–400 мкг 2–4 раза в месяц; при острой постгеморрагической и железодефицитной анемии — 30–100 мкг 2–3 раза в неделю; при апластической анемии — по 100 мкг до наступления клинко-гематологического улучшения; при нарушениях со стороны нервной системы — по 200–400 мкг 2–4 раза в месяц; при заболеваниях ЦНС и периферической нервной системы — по 200–500 мкг через день в течение 2 нед; при травмах периферической нервной системы — 200–400 мкг через день в течение 40–45 дней; при гепатитах и циррозах печени — 30–60 мкг/сут или 100 мкг через день в течение 25–40 дней; при лучевой болезни — по 60–100 мкг ежедневно в течение 20–30 дней; при фуникулярном миелозе, боковом амиотрофическом склерозе — эндолумбально по 15–30 мкг, с постепенным увеличением дозы до 200–250 мкг на инъекцию.

Для устранения дефицита витамина В₁₂ вводят внутримышечно или внутривенно по 1 мг ежедневно в течение 1–2 нед; для профилактики — 1 мг 1 раз в месяц внутримышечно или внутривенно; детям раннего возраста при алиментарной анемии и недоношенным — подкожно 30 мкг в день ежедневно в течение 15 дней.

Дефицит витамина В₁₂ должен быть подтвержден диагностически до назначения препарата, поскольку он может маскировать недостаток фолиевой

кислоты. В период лечения необходимо контролировать показатели периферической крови: на 5–8-й день лечения определяются число ретикулоцитов, концентрация железа. При длительном применении количество эритроцитов, гемоглобин и цветной показатель необходимо контролировать в течение 1 мес 1–2 раза в неделю, а далее — 2–4 раза в месяц. Ремиссия достигается при повышении количества эритроцитов до $4\text{--}4,5 \times 10^{12}/\text{л}$, при достижении нормальных размеров эритроцитов, исчезновении анизо- и пойкилоцитоза, нормализации числа ретикулоцитов после ретикулоцитарного криза. После достижения гематологической ремиссии контроль периферической крови проводится не реже 1 раза в 4–6 мес.

При применении возможно развитие аллергических реакций, психического возбуждения, кардиалгии, тахикардии, диареи, головной боли, головокружения, при применении в высоких дозах — гиперкоагуляция, нарушение пуринового обмена.

Цианокабаламин несовместим с аскорбиновой кислотой, солями тяжелых металлов (инактивация цианокобаламина), тиамин бромидом, пиридоксином, рибофлавином (так как содержащийся в молекуле цианокобаламина ион кобальта разрушает другие витамины). Аминогликозиды, салицилаты, противоэпилептические препараты, колхицин, препараты K^+ снижают абсорбцию. Витамин B_{12} усиливает развитие аллергических реакций, вызванных тиамин. Хлорамфеникол снижает гемопоэтический ответ. Нельзя сочетать с препаратами, повышающими свертываемость крови. Существует риск развития аллергических реакций на фоне тиамин. Необходимо соблюдать осторожность у лиц, склонных к тромбообразованию, со стенокардией (в меньших дозах, до 0,1 мг на инъекцию). Рекомендуется принимать длительное время при пернициозной анемии, предстоящих операциях на желудочно-кишечном тракте.

При применении в рекомендуемых дозах в период беременности, кормления грудью, а также у пожилых людей побочных реакций, кроме вышеперечисленных, не отмечено.

Витамин U (*S*-метилметионин) — активированная форма метионина. Является донатором метильных групп, необходимых для процессов синтеза в организме. Этим объясняется заживление повреждений слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Метилируя гистамин, витамин U превращает его в неактивную форму, а это способствует уменьшению желудочной секреции, оказывает анальгезирующее действие.

Содержится в соке капусты, картофеля и других сырых овощах. Суточная потребность в витамине U не определена. Применяется внутрь после еды по 0,1 г 3–5 раз в сутки в течение 30–40 дней.

Как побочные реакции описаны гиперчувствительность, кожные высыпания с зудом, тошнота, рвота.

Витамин А — его синтетические аналоги и гомологи относят к ретиноидам — производным ретиноевой кислоты. Биологически активными формами витамина А являются ретинол, ретиналь и сама ретиноевая кислота. Этот витамин содержится в продуктах животного происхождения — рыбьем жире, сливочном масле, яичном желтке, печени некоторых рыб (треска, морской окунь и др.) и морских животных (кит, морж, тюлень). В растительных пищевых продуктах ретинол не встречается. Однако многие из них (морковь, шпинат, салат, петрушка, зеленый лук, щавель, красный перец, черная смородина, черника, крыжовник, персики, абрикосы и др.) содержат каротин, представляющий собой провитамин А, из которого в организме образуется ретинол. Витамин А регулирует процессы ороговения, обеспечивает секрецию сальных желез, необходим для нормального роста волос, поддержания иммунитета, участвует в противоопухолевой защите организма.

Внутрь принимают в профилактических и лечебных целях (через 10–15 мин после еды), при необходимости (тяжелое течение, нарушение всасывания в желудочно-кишечном тракте) — внутримышечно (в виде масляных растворов). Растворы для инъекций подогревают перед введением до температуры тела. В случаях, требующих длительного лечения (заболевания кожи, глаз), курсы внутримышечных инъекций можно чередовать с приемом внутрь. При авитаминозах легкой и средней степени взрослым — 33 тыс. МЕ/сут; при гемералопии, ксерофтальмии — 50–100 тыс. МЕ/сут; детям — 1–5 тыс. МЕ/сут, в зависимости от возраста; при заболеваниях кожи взрослым — 50–100 тыс. МЕ/сут; детям — 5–20 тыс. МЕ/сут. Для лечения угревой сыпи требуются высокие дозы витамина А, что увеличивает риск токсических осложнений, поэтому при этой нозологии во избежание развития гипervитаминоза А наиболее предпочтительны местные формы витамина А (в том числе третиноин или изотретиноин). Суточная потребность в витамине А для взрослого человека — 5 тыс. МЕ (1,5 мг); для беременных — 6,6 тыс. МЕ (2 мг); для кормящих женщин — 8,25 тыс. МЕ (2,5 мг); детям до 1 года — 1,65 тыс. МЕ (0,5 мг), 1–6 лет — 3,3 тыс. МЕ (1 мг), 7–14 лет — 5 тыс. МЕ (1,5 мг). В условиях Крайнего Севера дозы для беременных, кормящих женщин и детей повышаются на 50%.

При применении ретинола возможны передозировки. Острые передозировки (развиваются через 6 ч после введения): сонливость, вялость, двоение в глазах, головокружение, сильная головная боль, тошнота, тяжелая рвота, диарея, раздражительность, остеопороз, кровотечение из десен, сухость и изъязвление слизистой оболочки полости рта, шелушение губ, кожи (особенно ладоней), спутанность сознания, повышение внутричерепного давления (у детей грудного возраста — гидроцефалия, выпячивание родничка).

К симптомам хронической интоксикации относятся потеря аппетита, боль в костях, трещины и сухость кожи, губ, сухость слизистой оболочки полости рта,

гастралгия, рвота, гипертермия, астения, необычайная утомляемость, дискомфорт, головная боль, фоточувствительность, поллакиурия, никтурия, полиурия, раздражительность, выпадение волос, желто-оранжевые пятна на подошвах, ладонях, в области носогубного треугольника, гепатотоксические явления, внутриглазная гипертензия, олигоменорея, портальная гипертензия, гемолитическая анемия, изменения на рентгенограммах костей, судороги, фетотоксические явления (пороки развития мочевыводящей системы, задержка роста, раннее закрытие эпифизарных зон роста). Лечение: отмена препарата, симптоматическая терапия.

Противопоказания: гиперчувствительность, гипервитаминоз А. С осторожностью назначать витамин при алкоголизме, циррозе печени, вирусных гепатитах, почечной недостаточности, беременности (особенно I триместр), в период лактации, в пожилом и детском возрасте.

При взаимодействии ретинол ослабляет эффект препаратов Ca^{2+} , увеличивает риск развития гиперкальциемии. Колестирамин, колестипол, минеральные масла, неомицин уменьшают абсорбцию витамина А (может потребоваться повышение его дозы). Пероральные контрацептивы увеличивают концентрацию витамина А в плазме. Изотретиноин увеличивает риск возникновения токсического эффекта. Одновременное применение тетрациклина и витамина А в высоких дозах (50 тыс. ЕД и выше) увеличивают риск развития внутричерепной гипертензии. Витамин Е снижает токсичность, абсорбцию, депонирование в печени и использование витамина А. Высокие дозы витамина Е могут снизить запасы витамина А в организме.

Витамин D. В настоящее время называют два жирорастворимых, близких по химическому строению и действию вещества — эргокальциферол (витамин D₂) и колекальциферол (витамин D₃). Основное свойство этих соединений — способность предупреждать и лечить рахит, в связи с чем их иногда называют противорахитическими витаминами. Витамин D₂ в небольшом количестве содержится в пищевых продуктах: яичном желтке, сливочном масле, сыре, молоке, икре, жирных сортах рыбы (угорь, лосось, макрель, сардины), устрицах, печени трески, говяжьей печени, хлебе из зерен крупного помола. Витамин D₃ образуется в коже человека под воздействием солнечных лучей. За 25 мин пребывания на солнце организм синтезирует до 2000 МЕ витамина D. Более того, в данном случае невозможно «превысить дозу». По биологической активности витамины D₂ и D₃ практически не различаются, поскольку в организме оба, вероятно, превращаются в кальцитриол — активный метаболит витамина D. Считается, что нужно потреблять ежедневно 50–200 мг витамина D, а после 50 лет дозу необходимо удвоить (1 мг витамина D равен 40 МЕ).

Основным свойством витамина D является его участие в метаболизме кальция. В настоящее время витамин рассматривают не только как витамин, но

и как гормон, регулирующий вместе с гормоном паращитовидной железы концентрацию ионов кальция в плазме крови, в том числе всасывание кальция в пищеварительном тракте, отложение его в костях, препятствуя резорбции из костной ткани. Витамин D регулирует также содержание фосфора в организме. Применяют его для профилактики и лечения рахита и заболеваний костей, вызванных нарушениями обмена кальция (остеомаляция и некоторые формы остеопороза). В последнее время доказано иммуностропное действие витамина D. Терапия высокими дозами витамина D эффективна в предотвращении активации латентных форм туберкулеза и для профилактики рака.

Суточная потребность в витамине D₃ для взрослых составляет 400 МЕ (10 мкг). Применять необходимо под тщательным медицинским контролем концентрации Ca²⁺ в крови и моче (особенно при сочетании с тиазидными диуретиками). В качестве препарата кальциферол применяется внутрь или внутримышечно, для профилактики рахита — в дозе 200 тыс. МЕ (5 мг) 1 раз в 6 мес (до 5 лет). Если ребенок редко находится на солнце или его кожа гиперемирована, разовую дозу увеличивают до 400 тыс. МЕ, вводят также 1 раз в полгода (до 5 лет). При лечении рахита, спазмофилии и гипокальциемии доза витамина составляет 200 тыс. МЕ 1 раз в неделю в течение 2 нед (в сочетании с препаратами Ca²⁺); для предупреждения приступов тетании — до 1 млн МЕ/сут; при остеомаляции и остеопорозе — 200 тыс. МЕ каждые 15 дней в течение 3 мес.

Для детей витамин назначают в виде капель для приема внутрь (1 капля приблизительно соответствует 500 МЕ). Для профилактики рахита детям грудного возраста (доношенным) с 2-й недели жизни витамин назначают ежедневно по 500 МЕ/сут, в особых случаях (например, недоношенным детям) — до 1000 МЕ/сут; при недоношенности I степени — 1000–2000 МЕ/сут; при недоношенности II и III степени (исключая летние месяцы) и для лечения рахита — по 2000–5000 МЕ/сут в 2–3 приема в течение 1–1,5 мес. Затем переходят на поддерживающую терапию (500 МЕ/сут) в течение 2 лет и в зимний период на 3-м году жизни.

Доза 5000 МЕ назначается только при выраженных костных изменениях. Через 3 мес после окончания 1-го курса детям из группы риска проводят повторный курс противорецидивного лечения по 2000–5000 МЕ/сут в течение 3–4 нед, за исключением летних месяцев; грудным детям, страдающим спазмофилией, — по 5000 МЕ 3 раза в сутки; взрослым для профилактики остеомаляции — по 500–1000 МЕ 3 раза в сутки, для лечения остеомаляции — до 2500 МЕ 3 раза в сутки; при гипопаратиреозе и псевдогипопаратиреозе витамин назначают по 7500–15000 МЕ/сут. При этом нужен контроль концентрации Ca²⁺ в крови каждые 3–6 мес и при необходимости — коррекция режима дозирования. При профилактическом применении необходимо иметь в виду возможность передозировки, особенно у детей (не следует назначать более 10–15 мг в год).

Противопоказания: гиперчувствительность, гиперкальциемия, гипervитаминоз D, почечная остео дистрофия с гиперфосфатемией. С осторожностью назначают при атеросклерозе, саркоидозе или других гранулематозах, хронической сердечной недостаточности, нефроуролитиазе в анамнезе, гиперфосфатемии, хронической почечной недостаточности, беременности, в период лактации, в детском возрасте.

Возможные побочные реакции: кожные высыпания, кожный зуд, гиперкальциемия, гиперкальциурия, снижение аппетита, полиурия, запоры, головная боль, миалгия, артралгия, повышение АД, аритмии, нарушение функции почек, обострение туберкулезного процесса в легких.

Возможна передозировка. Симптомы гипervитаминоза витамина D: ранние (обусловленные гиперкальциемией) — запор или диарея, сухость слизистой оболочки полости рта, головная боль, жажда, поллакиурия, никтурия, полиурия, анорексия, металлический привкус во рту, тошнота, рвота, необычайная усталость, общая слабость, гиперкальциемия, гиперкальциурия; поздние — боль в костях, помутнение мочи (появление в моче гиалиновых цилиндров, протеинурии, лейкоцитурии), повышение АД, кожный зуд, фоточувствительность глаз, гиперемия конъюнктивы, аритмия, сонливость, миалгия, тошнота, рвота, панкреатит, гастралгия, похудение.

Симптомы хронической интоксикации витамином D (при приеме в течение нескольких недель или месяцев для взрослых в дозах 20–60 тыс. МЕ/сут, детей — 2–4 тыс. МЕ/сут):

- кальциноз мягких тканей, почек, легких, кровеносных сосудов;
- артериальная гипертензия;
- почечная и сердечно-сосудистая недостаточность вплоть до смертельного исхода (эти эффекты наиболее часто возникают при присоединении к гиперкальциемии гиперфосфатемии);
- нарушение роста у детей (длительный прием в дозе 1,8 тыс. МЕ/сут).

Лечение гипervитаминоза D включает отмену препарата, диету с низким содержанием Ca^{2+} , большое количество потребления жидкости, назначение глюкокортикоидов, токоферола, аскорбиновой кислоты, ретинола, тиамин; в тяжелых случаях — внутривенное введение большого количества 0,9% раствора NaCl, фуросемида, электролитов, проведение гемодиализа.

Продолжительное применение витамина в высоких дозах приводит к хроническому гипervитаминозу D3. Следует иметь в виду, что чувствительность к витамину D у разных пациентов индивидуальна и у ряда пациентов прием даже терапевтических доз может вызвать явления гипervитаминоза. Чувствительность новорожденных к витамину D может быть различной. Некоторые из них могут быть чувствительными даже к очень низким дозам. У детей, получающих

витамин D в течение длительного периода времени, повышается риск возникновения задержки роста. Для профилактики гиповитаминоза D наиболее предпочтительно сбалансированное питание. Новорожденные, находящиеся на грудном вскармливании, особенно рожденные матерями с темной кожей и/или получавшие недостаточную инсоляцию, имеют высокий риск возникновения дефицита витамина D. В экспериментах на животных показано, что кальцитриол в дозах, в 4–15 раз превышающих рекомендуемые дозы для человека, обладает тератогенным эффектом.

Гиперкальциемия у матери, связанная с длительной передозировкой витамина D во время беременности, может вызвать у плода повышение чувствительности к витамину D, подавление функции паращитовидной железы, синдром специфической эльфоподобной внешности, задержку умственного развития, аортальный стеноз. В пожилом возрасте потребность в витамине D может возрастать вследствие уменьшения абсорбции витамина D, снижения способности кожи синтезировать провитамин D₃, уменьшения времени инсоляции, возрастания частоты возникновения почечной недостаточности.

Токсическое действие кальциферола ослабляют витамин A, токоферол, аскорбиновая кислота, пантотеновая кислота, тиамин, рибофлавин. При гипервитаминозе D возможны усиление действия сердечных гликозидов и повышение риска возникновения аритмии, обусловленные развитием гиперкальциемии (целесообразна коррекция дозы сердечного гликозида). Под влиянием барбитуратов (в том числе фенобарбитала), фенитоина и примидона потребность в колекальцифероле может значительно повышаться (увеличивают скорость метаболизма). Длительная терапия на фоне одновременного применения витамина D с Al³⁺- и Mg²⁺-содержащими антацидами увеличивает их концентрацию в крови и риск возникновения интоксикации (особенно при наличии хронической почечной недостаточности). Кальцитонин, производные этидроновой и памидроновой кислот, пликамицин, галлия нитрат и глюкокортикоиды снижают эффект. Колестирамин, колестипол и минеральные масла снижают абсорбцию в желудочно-кишечном тракте жирорастворимых витаминов и требуют повышения их дозировки. Витамин D увеличивает абсорбцию фосфорсодержащих препаратов и риск возникновения гиперфосфатемии. При одновременном применении с натрия фторидом интервал между приемом должен составлять не менее 2 ч, с пероральными формами тетрациклинов — не менее 3 ч, с другими аналогами витамина D повышается риск развития гипервитаминоза.

Естественные метаболиты. К этой группе относят препараты предшественников пуриновых или пиримидиновых оснований либо продукты частичного гидролиза нуклеиновых кислот.

Оротовая кислота является одним из предшественников пиримидиновых нуклеотидов, входящих в состав нуклеиновых кислот, которые участвуют в синтезе белковых молекул, в связи с чем соли оротовой кислоты рассматриваются как вещества анаболического действия и применяются при нарушениях белкового обмена для их стимуляции. Обычно применяют калиевую соль оротовой кислоты (калия оротат). Она стимулирует синтез нуклеиновых кислот, продукцию альбумина в печени (особенно в условиях длительной гипоксии), повышает аппетит, обладает диуретическим, регенерирующим свойствами.

Принимают внутрь за 1 ч до еды или через 4 ч после еды. Взрослым назначают по 250–500 мг 2–3 раза в сутки. Курс лечения длится в среднем 20–30 дней. При необходимости лечение можно повторить через 1 мес. В исключительных случаях можно увеличить дозу взрослых до 3 г в сутки. Детям рекомендуется по 10–20 мг/кг массы тела в сутки, дозу разделить на 3–4 приема (например, если масса тела ребенка 25 кг, то разрешенная доза — от $25 \times 10 = 250$ мг (1/2 таблетки) до $25 \times 20 = 500$ мг (1 таблетка в сутки, разделенная на 3–4 приема). Курс лечения — 3–5 нед.

Калия оротат хорошо переносится. В отдельных случаях могут возникать аллергические кожные реакции, которые исчезают после прерывания лечения. Калия оротат может также вызвать легкие расстройства пищеварения (тошнота, рвота). При применении в высоких дозах на фоне малобелковой диеты возможно развитие дистрофии печени. Противопоказания к назначению: повышенная чувствительность к любому из компонентов препарата, острое и хроническое органическое поражение печени, асцит.

Метионин (гентрал, адеметионин) — незаменимая аминокислота, регулирующая азотистый баланс. S-аденозил-метионина входит в состав всех тканей и жидких сред организма, участвует в большинстве биологических реакций, в том числе как донор метиловой группы — в процессе метилирования в составе липидного слоя клеточной мембраны (трансметилирование); как предшественник эндогенных тиоловых соединений — цистеина, таурина, глутатиона, коэнзима А (транссульфурирование); как предшественник полиаминов — путресцина, стимулирующего регенерацию клеток, пролиферацию гепатоцитов, спермидина, спермина, входящих в структуру рибосом (аминопропилирование). Восполняет дефицит адеметионина и стимулирует его выработку в организме, в первую очередь в печени и мозге. Повышает содержание глутамина в печени, цистеина и таурина в плазме, снижает содержание метионина в сыворотке крови, нормализуя метаболические реакции в печени. После декарбоксилирования участвует в процессах аминопропилирования как предшественник полиаминов — путресцина (стимулятор регенерации клеток и пролиферации гепатоцитов), спермидина и спермина, входящих в структуру рибосом; незаменимая аминокислота, регулирующая азотистый баланс. Содержит подвижную метильную

группу и участвует в процессах метилирования, обеспечивающих синтез холина, адреналина, креатина и других биологически важных соединений, обезвреживание токсичных продуктов, образование фосфолипидов. Тормозит отложение в печени нейтрального жира, оказывает липотропный эффект (удаляет из печени избытки жира). Модулирует эффект гормонов и витаминов (В₁₂, аскорбиновая и фолиевая кислоты).

Таурин (дибикор, тауфон) — аминокислота, образующаяся в организме в процессе превращения цистеина. Игрет большую роль в липидном обмене, способствует нормализации функции клеточных мембран, оптимизации обменных процессов, сохранению электролитного состава цитоплазмы (за счет накопления ионов калия и кальция), входит в состав парных желчных кислот (таурохолевой, тауродезоксихолевой), способствующих эмульгированию жиров в кишечнике. В головном мозге выполняет функцию нейромедиатора, тормозящего синаптическую передачу, обладает противосудорожной и кардиотонической активностью. Вызывает нормализацию метаболизма глазных тканей при заболеваниях дистрофического характера.

Препараты дезоксирибонуклеиновой кислоты включают препараты нуклеиновых кислот животного (деринат, ферровир и пр.) и грибкового происхождения (нуклеинат натрия). К этой же группе следует отнести производные пиримидина и пурина. Одним из старейших иммуноактивных препаратов, проверенных временем, является натрия нуклеинат, обладающий широким спектром биологической активности. Он способствует ускорению процессов регенерации, активизирует деятельность костного мозга и лейкопоэз, вызывает лейкоцитарную реакцию, увеличивает количество Т-лимфоцитов; стимулирует миграцию и кооперацию Т- и В-лимфоцитов, фагоцитарную активность макрофагов и факторов неспецифической резистентности, процессы клеточного деления и дифференцировки; усиливает синтез нуклеиновых кислот в лимфоцитах, повышает накопление цАМФ в лимфоцитах и функциональную активность неспецифических факторов защиты. Нуклеинат натрия увеличивает содержание РНК и белка в макрофагах в 1,5 раза и гликогена в 1,6 раза, активность лизосомальных ферментов, следовательно, завершает фагоцитоз макрофагами. Препарат повышает содержание у человека лизоцима и нормальных АТ, если их уровень был снижен.

Деринат — препарат, в качестве биологически активного вещества которого выступает дезоксирибонуклеат натрия, полученный из вытяжки молок осетровых рыб. Активирует процессы клеточного и гуморального иммунитета, оптимизирует воспалительную реакцию и специфический иммунный ответ на бактериальные, грибковые, вирусные АГ, активизирует В-лимфоциты, Т-хелперы, по-

вышает фагоцитоз. Снижает чувствительность клеток к повреждению химиотерапевтическими препаратами и радиотерапией, что сопровождается понижением кардио- и миелотоксического действия у онкологических больных и приводит к повышению стабильности и результативности терапевтического эффекта повторных курсов лечения. Деринат обладает высокими репаративными и регенеративными свойствами, стимулирует дренажно-детоксикационную функцию лимфатической системы, в первую очередь в очаге воспалительной реакции, нормализует состояние органов и тканей при дистрофиях сосудистого происхождения. Увеличивает толерантность к физической нагрузке, снимает боль в икроножных мышцах, способствует заживлению различного типа гангренозных трофических инфицированных ран и глубоких ожогов и эрадикации *Helicobacter pylori* при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, улучшает сократимость миокарда, микроциркуляцию в сердечной мышце, восстанавливает функцию миоцитов, стимулирует заживление язв ЖКТ.

Ферровир — комплекс дезоксирибонуклеат натрия с железом. Представляет собой биологически активное вещество из вытяжки молок осетровых рыб (очищенная и стандартизованная комплексная соль дезоксирибонуклеат натрия с железом). Препарат оказывает иммуномодулирующее и противовирусное действие, активизирует противовирусный, противогрибковый и противомикробный иммунитет, проявляет противовирусное действие и к РНК- и ДНК-содержащим вирусам. Курсовое применение ферровира при комплексной терапии вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) повышает уровень CD4+-лимфоцитов в крови на 1–1,5 мес. При рецидивирующей герпетической инфекции сокращается продолжительность рецидива и наступает длительная ремиссия. Применение этого препарата больными хроническим гепатитом С способствует снижению репликативной активности HCV и переводит процесс в латентную фазу.

Производные пиримидина и пурина. В качестве средств, повышающих резистентность организма к инфекциям, с каждым годом все шире применяются производные пиримидина и пурина. Производные пиримидина интересны тем, что обладают низкой токсичностью, активизируют деятельность белкового и нуклеинового обмена, ускоряют клеточный рост и размножение, вызывают противовоспалительные действия, способны предупреждать снижение фагоцитарной активности лейкоцитов, которое наступает под влиянием антибиотиков, вызывать индукцию синтеза IFN, увеличивать уровень иммунизации и уровень нормальных антител. Механизм действия как стимуляторов иммуногенеза, по-видимому, связан с включением их в белковый и нуклеиновый обмен, вызывающий поливалентное влияние на иммуногенез и процессы регенерации.

Метилурацил — как стимулятор лейкопоза препарат назначают при агранулоцитарной ангине, алиментарно-токсической алейкии, хроническом бензольном отравлении, лейкопении в результате химиотерапии злокачественных новообразований, при рентгено- и радиотерапии и других состояниях, сопровождающихся лейкопенией. Необходимо учитывать, что метилурацил целесообразно назначать при легких формах лейкопении. При поражениях средней тяжести применение стимуляторов кроветворения показано лишь в случае возобновления нарушенной регенерации кровяных клеток. При тяжелых поражениях кроветворной системы метилурацил запрещен.

Изопринозин — активное вещество инозин пранобекса увеличивает суммарное число Т-лимфоцитов и выработку ими ИЛ-2, активирует функцию НК-клеток и Т-хелперов, стимулирует хемотаксическую и фагоцитарную активность моноцитов, макрофагов (повышает в них синтез ИЛ-1) и полиморфноядерных клеток. Усиливает синтез РНК и рибосомального белка, одновременно препятствуя использованию рибосомальной РНК для размножения вируса.

Индукторы синтеза интерферонов среди иммуномодуляторов можно рассматривать как препараты, стимулирующие выработку эндогенного IFN. Эта группа разнородна по составу. Выделяют синтетические препараты (амиксин, циклоферон, полудан, неовир, амплиген) и природные соединения (кагоцел, панавир, рогасин, саврац). Клинические испытания показали широкий диапазон их иммуномодулирующей и противовирусной активности. Многие авторы эти препараты рассматривают как противовирусные средства. Индукторы IFN являются препаратами с комбинированным эффектом: этиотропным, направленным непосредственно на вирус, и иммуномодулирующим, т.е. корригирующим нарушения системы иммунитета. Эти индукторы индуцируют синтез всех иммунологических классов IFN: α , β и γ в разных пропорциях. Все они хорошо сочетаются друг с другом — рекомбинантными IFN, иммуномодуляторами и химиотерапевтическими средствами. Комбинированное применение с другими препаратами часто приводит к потенцированию эффектов индукторов IFN.

Индукторы IFN имеют ряд преимуществ перед рекомбинантными IFN, а именно:

- индукторы IFN не обладают антигенностью;
- естественный, но стимулированный синтез эндогенного IFN не вызывает гиперинтерферонемии, которая нередко возникает при использовании рекомбинантных IFN, что в свою очередь приводит к побочным эффектам, т.е. отсутствуют симптомы передозировки;
- однократное введение индукторов IFN обеспечивает их длительную циркуляцию на терапевтическом уровне. Для достижения такого

уровня экзогенных IFN требуется многократное введение высоких доз рекомбинантных IFN;

- рекомбинантные IFN, принимая участие в иммунных реакциях организма, стимулируют неспецифическую цитотоксичность иммуноцитов и вызывают экспрессию молекул HLA в тех популяциях клеток, которые обычно не экспрессируют эти АГ. Это может быть причиной усугубления аутоиммунного ответа организма человека;
- широко применяемые рекомбинантные IFN являются препаратами IFN- α , что существенно ограничивает их противовирусные свойства, так как для эффективной противовирусной защиты необходимо наличие всех трех классов IFN, синтез которых вызывается индукторами интерферогенеза;
- индукторы IFN дешевле препаратов IFN.

Эффективность индукторов выработки IFN показана при ряде вирусных заболеваний: амиксин — при герпетической инфекции, гриппе, ОРВИ, гепатитах, энцефалите; неовир — при герпетической инфекции, ОРВИ; полудан — при герпетической инфекции; ридостин — при гриппе, ОРВИ, бешенстве; рогасин — при гепатите А, В; соврац — при ОРВИ, гепатите А, энтеровирусных инфекциях.

Амиксин (лавомакс, тилорон) — известный отечественный препарат, является первым пероральным индуктором эндогенных IFN- α , β , γ . Он наиболее полно сочетает в себе все преимущества индукторов IFN. Представляя собой поликлональный стимулятор, амиксин вызывает синтез IFN в Т-лимфоцитах, энтероцитах кишечника, гепатоцитах, проникает через гематоэнцефалический барьер и индуцирует IFN в клетках мозга. Стимулирует СК костного мозга, в зависимости от дозы усиливает антителообразование, уменьшает степень иммунодепрессии, восстанавливает соотношение CD4⁺/CD8⁺. Эффективен против различных вирусных инфекций, в том числе против вирусов гриппа, других острых респираторных вирусных инфекций, вирусов гепатита и герпеса. У него отсутствуют мутагенный, тератогенный, эмбриотоксический, канцерогенный и другие токсические эффекты. Препарат не обладает антигенностью. Важная особенность амиксина — вызываемая им длительная циркуляция в организме терапевтической концентрации IFN (50–100 ЕД/мл в сыворотке крови).

Неовир — низкомолекулярный синтетический супериндуктор IFN. Представляет собой производное карбоксиметилакридона с молекулярной массой менее 300. Повышает способность клеток-интерферопродуцентов вырабатывать IFN при индукции патологическим агентом (свойство сохраняется длительное время после отмены препарата) и создает в организме высокие титры эндогенных IFN, идентифицированных как ранний IFN- α и - β ; активирует СК костного мозга, устраняет дисбаланс в субпопуляциях Т-лимфоцитов с активацией эффекторных звеньев Т-клеточного иммунитета и макрофагов; на фоне опухолевых

заболеваний усиливает активность натуральных киллеров, которая обусловлена продукцией ИЛ-2, и нормализует синтез ФНО; стимулирует активность полиморфноядерных лейкоцитов (миграция, цитотоксичность, фагоцитоз); оказывает противовирусное (в отношении РНК- и ДНК-геномных вирусов) и антихламидийное действия.

Циклоферон — метилглюкаминная соль карбоксиметилакридона, представляющая собой синтетический аналог природного алкалоида из культур *Citrus Grandis*, обладает пролонгированным противовирусным, противовоспалительным и иммуномодулирующим действиями; стимулирует продукцию IFN- α , β , γ (до 60–80 ЕД/мл и выше) лейкоцитами, макрофагами, Т- и В-лимфоцитами, эпителиальными клетками, а также тканями селезенки, печени, легких, мозга; проникает в цитоплазму и ядерные структуры, индуцирует синтез «ранних» IFN; активизирует Т-лимфоциты и естественные киллерные клетки; способствует коррекции иммунного статуса при иммунодефицитных состояниях различного генеза, в том числе ВИЧ; активен в отношении вирусов клещевого энцефалита, гриппа, гепатита, герпеса, цитомегаловируса, ВИЧ, различных энтеровирусов, хламидий; проявляет высокую эффективность при ревматических и других системных заболеваниях соединительной ткани, подавляя аутоиммунные реакции и оказывая противовоспалительное и обезболивающее действие; отличается низкой токсичностью и отсутствием мутагенных, тератогенных, эмбриотоксических и канцерогенных эффектов, обладает пролонгированным иммуномодулирующим действием. Препарат хорошо сочетается с традиционными средствами терапии.

К регуляторам пластических процессов, обладающий мощным регенеративным эффектом имеет смысл отнести гидролизат плаценты человека *лаеннек*, в состав которого входят прежде всего факторы роста (низкомолекулярные регуляторные пептиды: HGF фактор роста гепатоцитов, NGF фактор роста нервов, EGF эпидермальный фактор роста, FGF фактор роста фибробластов, CSF колониестимулирующий фактор роста, IGF инсулиноподобный фактор роста, TGF трансформирующий фактор роста, VEGF фактор роста эндотелия сосудов) и другие цитокины (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, интерфероны, эритропоэтин). Помимо этого он содержит макро- (N, P, C, S, Si, Na, Mg, Ca, K) и микроэлементы (Zn, Br, Si, Fe, Mn, c, Se, Cr, V, Cu, Li, B, Co), витамины (B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12; C, D, PP, A, E, K), аминокислоты, в том числе незаменимые (треонин, серин, пролин, глицин, аланин, метионин, лецин, изолейцин, валин, фенилаланин, гистидин, лизин, аргинин, таурин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, цистин), нуклеозиды и нуклеотиды

СРЕДСТВА, УСТРАНЯЮЩИЕ ПРОДУКТЫ МЕТАБОЛИЗМА В КЛЕТКЕ

В эту группу препаратов входят средства, способствующие утилизации продуктов метаболизма клетки, антиоксиданты и стабилизаторы мембран.

Средства, способствующие утилизации продуктов метаболизма клетки

Витамин В₁₅ (пангамовая кислота). Так как витамин В₁₅ широко представлен в семенах растений, в связи с этим и получил свое название — пангамовая кислота (от греч. pan — «всюду» и gamu — «семя»). Наибольшее содержание пангамовой кислоты обнаружено в семенах злаковых растений и в ядрах косточковых плодов, а также в большом количестве она содержится в печени, почках, яичном желтке, икре рыб, горохе, рисе, дрожжах, отрубях. Суточная потребность — 2 мг. Пангамовая кислота активизирует окислительные процессы, уменьшает явления гипоксии, оказывает детоксицирующее действие, улучшает липидный обмен, участвует в образовании холина, увеличивает содержание гликогена и креатинфосфата в мышцах, является донором метильных групп.

Глицин (аминоуксусная кислота) обладает глицин- и ГАМК-эргическим, α 1-адреноблокирующим, антиоксидантным, антитоксическим действием; регулирует деятельность глутаматных (NMDA) рецепторов, за счет чего препарат является регулятором обмена веществ.

Милдронат — аналог γ -бутиробетаина, подавляет γ -бутиробетаингидроксиазу, снижает синтез карнитина и транспорт длинноцепочечных жирных кислот через оболочки клеток, препятствует накоплению в клетках активированных форм неокисленных жирных кислот — производных ацилкарнитина и ацилкоэнзима А. В условиях ишемии восстанавливает равновесие процессов доставки кислорода и его потребления в клетках, предупреждает нарушение транспорта АТФ, одновременно с этим активизирует гликолиз, который протекает без дополнительного потребления кислорода. В результате снижения концентрации карнитина усиленно синтезируется γ -бутиробетаин, обладающий вазодилатирующими свойствами.

Натрия тиосульфат оказывает дезинтоксикационное, противовоспалительное, десенсибилизирующее действие.

«Унитиол» способствует дезинтоксикационному действию. Увеличивает выведение некоторых катионов (особенно Cu^{2+} и Zn^{2+}) из металлосодержащих ферментов клеток. Активные сульфгидрильные группы восстанавливают функции ферментных систем организма.

Аллопуринол-Эгис — средство, нарушающее синтез мочевой кислоты. Является структурным аналогом гипоксантина. Ингибирует фермент ксантиноксидазу, который участвует в превращении гипоксантина в ксантин и ксантина в

мочевую кислоту. Этим обусловлено уменьшение концентрации мочевой кислоты и ее солей в жидких средах организма и моче, что способствует растворению имеющихся уратных отложений и предотвращает их образование в тканях и почках. При приеме аллопуринола повышается выделение с мочой гипоксантина и ксантина.

Как способ утилизации продуктов метаболизма, особенно хронических ее форм, можно стимулировать биотрансформации. Биотрансформация токсических веществ — один из важнейших путей естественной детоксикации организма. При этом может произойти повышение активности индукции ферментов, главным образом в микросомах печени, ответственных за метаболизм токсичных соединений или снижение активности этих метаболитов (ингибция), влекущее за собой замедление метаболизма. В клинической практике используются препараты-индукторы или ингибиторы ферментов, влияющие на биотрансформацию ксенобиотиков с целью снижения их токсического действия. В настоящее время известно более 200 веществ, способных влиять на активность микросомальных ферментов (цитохром P-450). Наиболее изученными индукторами являются барбитураты, в частности фенobarбитал или бензонал и специальный препарат — Зиксорин. Под влиянием этих препаратов в митохондриях печени увеличиваются уровень и активность цитохрома P-450, что обусловлено стимуляцией процессов их синтеза. Лечебное действие проявляется не сразу, а спустя 1,5–2 сут.

Антиоксиданты. Протекающие в организме процессы биологического окисления состоят из последовательных реакций дегидрирования, при которых атомы водорода переходят от субстрата (жирные кислоты, углеводы) к акцептору. Кислород вовлекается в тканевое дыхание в завершающей цитохромоксидной реакции, соединяясь с акцептированными атомами водорода. Биологическое окисление структурно организовано в клетке, строго регулируется, ступенчато освобождает макроэрги и в конечной стадии образует нетоксичные продукты (H_2O и CO_2). Наряду с биологическим окислением в организме могут происходить реакции прямого присоединения кислорода к субстрату — аутоокисление. Обычно они начинаются с образования частиц с неспаренным электроном — свободными радикалами, образуя промежуточные соединения — перекиси. Соответственно, эти процессы называют свободнорадикальным или перекисным окислением. Свободнорадикальное окисление развивается как цепной лавинообразный процесс, вовлекающий все новые молекулы субстрата. Усиление свободнорадикального окисления в организме наблюдается при многих заболеваниях.

Общими являются следующие признаки: повышение гидрофильности мембран и, как следствие, увеличение их проницаемости; разобщение дыхания и фосфорилирования; нарушение связи фосфолипидов со структурными и рецепторными белками клеточных мембран; повреждение нуклеиновых кислот и

инактивация ферментов; лизис мембран лизосом, сопровождающийся выходом из них фосфолипаз и других гидролитических ферментов, способных вызвать аутолиз клетки.

Свободнорадикальные механизмы угнетают клеточный и гуморальный иммунитет. Развитие этого окисления может быть прекращено ингибиторами, восстанавливающими свободные радикалы в стабильную молекулярную форму, неспособную продолжать цепь аутоокисления.

Лекарственное влияние реализуется либо непосредственным связыванием свободных радикалов — так действуют прямые антиоксиданты, либо через активацию антиоксидантной системы организма — группу непрямых антиоксидантов. Можно выделить основные принципы их применения:

1) приоритетное использование природных биоантиоксидантов, полностью лишенных побочных эффектов;

2) учет алиментарного фактора. В зимне-весенний период обязательно назначение прямых антиоксидантов, летом и осенью при высоком содержании в рационе овощей и фруктов предпочтительны антиоксиданты непрямого действия;

3) комбинированное применение. Процессы свободнорадикального окисления могут развиваться как в липидной, так и в водной фазе клеточных и неклеточных структур. Соответственно, необходимо одновременное введение липидорастворимых и гидрофильных антиоксидантов;

4) адекватный выбор дозировки препаратов. Дозирование антиоксидантов должно базироваться на учете не только массы тела, но и возраста человека, характера его питания;

5) достаточно продолжительный курс фармакопрофилактики или фармакотерапии, который определяется длительностью воздействия фактора или ситуации, способствующих усилению свободнорадикального окисления (от 1–2 нед до 2–3 мес).

Классическим антиоксидантом является **витамин Е**. Под этим названием известен ряд соединений (токоферолов), близких по химической природе и биологическому действию. Наиболее активен из них α -токоферол. Токоферолы содержатся в зеленых частях растений, особенно в молодых ростках злаков, также богаты ими растительные масла (подсолнечное, хлопковое, кукурузное, арахисовое, соевое, облепиховое). Некоторое количество их содержится в мясе, жире, яйцах, молоке. Потребность в витамине Е составляет 8–10 МЕ для взрослых и от 3–7 МЕ для детей (в зависимости от возраста). Витамин Е является эндогенным противooksидлительным фактором (антиоксидантом), тормозящим перекисное окисление липидов клеточных мембран, участвует в биосинтезе белков, в тканевом дыхании, пролиферации клеток и других важнейших процессах.

Многие *биофлавоноиды (витамин Р)* имеют выраженные антиоксидантные свойства за счет прямого антирадикального действия. Это растительные биофлавоноиды, представляющие собой группу биологически активных веществ (рутин, катехины, кверцетин, цитрин, гесперидин, эриодиктиол, цианидин). Всего известно около 150 биофлавоноидов, обладающих сходными биологическими действиями. Витамин Р находится обычно в тех же растительных продуктах, в которых встречается и аскорбиновая кислота. Особенно много его содержится в цитрусовых, черной смородине, плодах шиповника, щавеле, зеленом чае, салате, гречихе, белой оболочке под кожурой цитрусовых; немного меньше его присутствие в помидорах, винограде, капусте, петрушке, сливах, яблоках, ягодах. Данный витамин не вырабатывается нашим организмом и поэтому должен быть включен в ежедневный рацион питания. Суточная потребность взрослого человека в рутине — 30 мг, кверцетине — 15, гесперидине — 100 мг. Витамин Р — эффективный антиоксидант, способный восстанавливать клеточную структуру, в основе действия которого лежит свойство перехватывать свободные радикалы кислорода и обезвреживать их. Являясь мощными природными антиоксидантами, биофлавоноиды предохраняют клетки нашего организма от разрушительного воздействия свободных радикалов, предотвращая старение организма, нарушения иммунитета, возникновение различных заболеваний. Традиционно считается, что биофлавоноиды обладают капилляроукрепляющим свойством: нормализуют и поддерживают структуру, эластичность, функцию и проницаемость кровеносных сосудов. Существенный интерес вызывает и их способность оказывать сберегающий эффект в отношении аскорбиновой кислоты.

Глутатион — глутамилцистеинглицин как трипептид при приеме внутрь гидролизует на составляющие аминокислоты. Предшественниками глутатиона являются метионин и глутаминовая кислота. В последние годы вместо метионина используется его более активная форма — метилметионинсульфоний. Все указанные соединения проявляют антиоксидантное действие и оказывают нормализующий эффект в отношении показателей липидного обмена.

Стабилизаторы мембран

Тиоктовая кислота (берлитион, липоевая кислота, α -липоевая кислота, октолипен, тиоктацид, тиогамама) — эндогенный антиоксидант (связывает свободные радикалы), в организме образуется при окислительном декарбоксилировании α -кетокислот. В качестве коэнзима митохондриальных мультиферментных комплексов участвует в окислительном декарбоксилировании пировиноградной кислоты и α -кетокислот. Способствует снижению концентрации глюкозы в крови и увеличению гликогена в печени, а также преодолению инсулинорезистентности. По характеру биохимического действия препарат близок к витаминам группы В. Участвует в регулировании липидного и углеводного обмена,

стимулирует обмен холестерина, улучшает функцию печени. Оказывает гепатопротекторное, гиполипидемическое, гипохолестеринемическое, гипогликемическое действие. Улучшает трофику нейронов. Использование трометамоловой соли тиоктовой кислоты в растворах для в/в введения (имеющей нейтральную реакцию) позволяет уменьшить выраженность побочных реакций.

Эссенциале — эссенциальные фосфолипиды, которые представляют собой высокоочищенную фракцию фосфатидилхолина. По своей химической структуре подобны эндогенным мембранным фосфолипидам, превосходя их по своим функциональным свойствам за счет высокого содержания в них полиненасыщенных жирных кислот, особенно липоевой кислоты. Фосфолипиды являются основными структурными элементами клеточных мембран и органелл. Они принимают участие в дифференциации, размножении и регенерации клеток. Функциональное значение основывается на их амфифильных свойствах, которые позволяют регулировать проницаемость клеточной оболочки. Улучшают функцию мембран, в частности ионный обмен, процесс внутриклеточного дыхания, биологического окисления, влияют на связывание ферментов внутриклеточного дыхания в митохондриях, а также на процесс окислительного фосфорилирования в энергетическом обмене клеток. В физиологических условиях синтез фосфолипидов удовлетворяет нормальные потребности гепатоцитов, которые содержат достаточное количество фосфолипидов. Эссенциале является универсальным стабилизатором мембран. Известно, что структура клеточных мембран, функция ферментных систем при заболеваниях печени и биосинтез фосфолипидов, дефицит которых приводит к изменению функции клеточной мембраны, нарушаются. Эссенциале форте устраняет указанные нарушения, способствует регенерации клеточных мембран, реактивирует мембраносвязанные ферментные системы и рецепторы, повышает детоксикационную способность печени и таким образом нормализует ее функцию.

Комплексным препаратом устраняющие продукты метаболизма в клетке стоит отнести **ремаксол**. Это сбалансированный инфузионный раствор, содержащий янтарную кислоту, меглюмин, инозин (рибоксин), метионин, никотинамид. Под действием препарата ускоряется переход анаэробных процессов в аэробные, улучшается энергетическое обеспечение клеток, увеличивается синтез макроэргов, повышается устойчивость мембран клеток к перекисному окислению липидов, восстанавливается активность ферментов антиоксидантной защиты. Он обладает гепатопротекторным действием снижая цитолиз, что проявляется в снижении индикаторных ферментов: аспартат- и аланин-аминотрансфераз, способствует снижению билирубина и его фракций, улучшает экскрецию прямого билирубина в желчь. Снижает активность экскреторных ферментов гепатоцитов — щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы, способствует окислению холестерина в желчные кислоты.

Глава 14. Детоксикация в системе метаболической терапии



Детоксикационная (эфферентная) терапия (от лат. *effereus* — «выводить») — метод лечения, направленный на выведение из организма токсических и балластных веществ, метаболитов.

Эндогенная интоксикация, свойственная большинству заболеваний, представляет собой основную точку приложения эфферентных методов. Влияние эфферентной терапии на патологические процессы не исчерпывается прямой детоксикацией. Под действием токсинов, микробных супрессивных белков, длительного избыточного воздействия АГ, оксидантов, провоспалительных цитокинов и других факторов меняются свойства мембран клеток иммунной и сопряженной с ними систем, блокируются рецепторы мембран. После длительной активации тех или иных клеток наступает фаза их супрессии или гиперреактивности.

Крайняя степень интоксикации проявляется в виде инфекционно-токсического шока (табл. 49).

Таблица 49

Клиническое определение степеней инфекционно-токсического шока

Критерии тяжести	I степень	II степень	III степень
Сознание	Возбуждение	Заторможенность	Спутанное, отсутствует
Реакция зрачков	Сужены	Расширены, реакция вялая	
Температура	Гипертермия	Критическое падение	
Кожные покровы	Цианоз губ и ногтевых фаланг	Акроцианоз, холодный пот	Тотальный цианоз
Дыхание	Не нарушено	Легкая одышка	Поверхностное
АД	Норма	До 80 мм рт.ст.	Менее 80 мм рт.ст.
Пульс	Умеренная тахикардия	Тахикардия более 100 в минуту	Нитевидный, не определяется
Индекс Аллговера (САД/пульс)	До 1,0	1–1,5	Более 1,5
Диурез	Несколько снижен	Олигоурия	Анурия
Геморрагический синдром	Нехарактерен	Рвота «кофейной гущей», гематурия, мелена, ДВС-синдром	

Медикаментозные стимулирующие или модулирующие воздействия на таком фоне могут быть малоэффективны или даже вредны. Для предотвращения этих процессов используются детоксикационная терапия, средства для улучшения реологии крови.

Детоксикация, эфферентная терапия.

Цель данного вида терапии прекращения воздействия токсичных веществ и их удаления из организма. Для достижения этой цели имеется большое число методов, направленных на стимуляцию естественной детоксикации, а также проведение искусственной и антидотной дезинтоксикационной терапии.

В клинической практике методы детоксикации проводятся либо путем стимуляции естественной детоксикации, либо активной искусственной (эфферентная терапия).

Можно выделить следующие виды детоксикации:

- стимуляция естественных процессов выведения — очищение ЖКТ, форсированный диурез;
- неинвазивные методы эфферентной терапии;
- инвазивные *методы эфферентной терапии.*

Как способ дезинтоксикации возможно также рассматривать описанные выше методы стимуляции биотрансформации — регуляция ферментативной функции гепатоцитов за счет фармакологической или физико-химической индукции или ингибиции и стимуляция активности иммунной системы — фармакологическая коррекция — физиогемотерапия.

Стимуляция выведения токсинов. К методам, направленным на усиление физиологической детоксикации, относятся очищение желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), форсированный диурез, регуляция активности ферментов, создание гипер- или гипотермии и др. При их проведении используются рвотные и слабительные средства, препараты, обеспечивающие водно-электролитную нагрузку, осмотические диуретики и салуретики. Следует отметить, что стимуляция естественных механизмов детоксикации возможна только при условии сохранения функции элиминирующих систем организма.

Очищение желудочно-кишечного тракта — пищеварительная система поставляет питательные вещества и удаляет отработанные элементы, если в работе органов пищеварения происходят какие-то нарушения, сбои в работе других органов и систем. Одна из причин дисфункции пищеварительной системы связана с нарушением вывода продуктов обмена веществ и накоплением их в организме, что приводит к хронической эндогенной интоксикации. Прежде всего, при очищении кишечника большое значение имеет диета. Список запрещенных продуктов включает жирное мясо и мясопродукты, копчености, белый хлеб и кондитерские изделия, макаронные изделия и крупы (кроме овсяной), жирное цельное молоко, творог, сахар, алкоголь. Обязательное условие: принимать не менее 2–3 л жидкости в день.

Достаточно эффективное средство для очищения и промывания желчных протоков — **слепой тюбаж**. Процедура помогает избавиться от застоя жёлчи, и как следствие, способствует выделению продуктов обмена веществ. Наиболее простой вид слепого тюбажа — с помощью минеральной воды. Процедуру лучше проводить рано утром, перед этим натощак (не едят минимум 6 ч) выпивают 250–300 мл минеральной воды, обладающей желчегонным действием (Ессентуки № 4). Предварительно из воды нужно выпустить весь газ и подогреть до 36–38 °С, затем положить на область печени теплую грелку и лечь на правый бок. Воду в грелке нужно также обновлять. Необходимо допить минеральную воду (200–250 мл). Общая продолжительность процедуры — 1,5–2 ч, эффектом будет разжиженный стул с зеленоватым оттенком. Помимо минеральной воды, можно использовать раствор сернокислой магнезии (1 чайная ложка на стакан воды), яблочный сок, овсяный отвар, растительное масло с лимонным соком.

Внутривенное введение растворов достаточно широко применяется при детоксикации. Однако при этом необходимо учитывать распределение воды в организме, изменения других жидкостей и электролитов.

Удельная масса воды в организме колеблется от 50 до 70%. Она состоит из внутриклеточной жидкости, которая составляет примерно 40% от массы тела, и внеклеточной воды: внутрисосудистой, составляющей 5%, и интерстициальной, составляющей 15% от массы тела (рис. 140). Водный баланс за сутки — 2000 мл. Поступает в организм 1500 мл воды за счет питья и 500 мл — за счет еды. Выделяется 250 мл с испражнениями, 800–1500 мл — с мочой и 600 мл — неощутимые потери влаги. Изменения жидкостей в организме может осуществляться за счет трех причин: изменения объема, изменения концентрации ионов и изменения

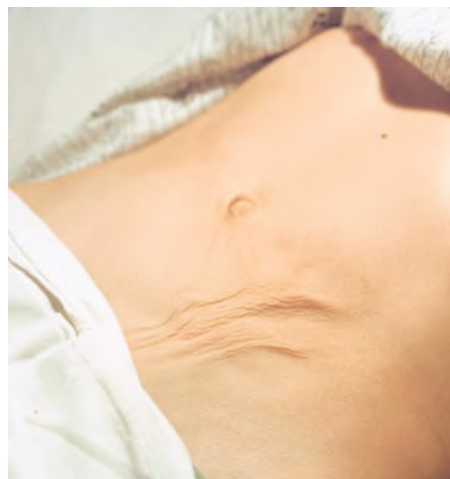


Рис. 140. Нарушение тургора кожи при большой потере жидкости

состава ионов. Дефицит объема жидкости — наиболее частая проблема у хирургических больных и больных с инфекционной патологией.

Причинами являются потеря жидкости при рвоте, через свищи, при кровотечениях и перемещение жидкости в интерстициальное пространство при травмах и инфекционных процессах. Клинически при этом наблюдаются ортостатическая гипотензия, снижение диуреза и небольшое понижение температуры тела (табл. 50).

Клинические проявления дегидратации

Клинические проявления	Дегидратация: степень (потеря жидкости в % от массы тела)			
	I (до 3%)	II (4–6%)	III (7–9%)	IV (более 9%)
Общее состояние	Не нарушено	Слабость, головокружение и обмороки. Температура тела нормальная или субфебрильная. Кратковременные судороги мышц	Сознание сохранено, жажда. За счет ацидоза (рН 7,3-7,36) учащенное шумное дыхание, но отсутствуют вторичные нарушения гемостаза и органная патология	Генерализованные продолжительные судороги, судорожные сокращения мышц живота, икота. Дыхание учащено до 60 в мин, поверхностное
Проявление со стороны желудочно-кишечного тракта	Жидкий кашицеобразный до 10 раз в сутки, не более 3 сут. Рвоты нет	Жидкий стул обильный до 10–15 раз в сутки. Возможна рвота до 10 раз в сутки без предшествующей тошноты	Обильный водянистый стул 10–20 раз в сутки, рвота более 20 раз в сутки при обезвоживании	Непрерывная дефекация («дорожка фекальных масс»). Обильная мучительная рвота
Проявление со стороны сердечно-сосудистой системы	АД в пределах возрастной нормы, лабильность пульса	Тахикардия, гипотония	АД значительно снижено. Пульс частый, слабый	АД резко снижено, пульс не определяется, на периферических сосудах. По ЭКГ — перегрузка правых отделов сердца
Мочевыделение	Диурез не изменен	Диурез не изменен	Олиго- или анурия	Анурия
Кожа и слизистые	Сухость слизистых рта. Кожа влажная, тургор не изменен, цианоза, судорог нет	Язык сухой, обложен бурым налетом, сухость во рту, охриплый голос. Бледность и сухость кожных покровов	Кожа и слизистые сухие, тургор кожи снижен, кожная складка расправляется медленно, кожа рук морщинистая, акроцианоз	Кожные покровы холодные, покрыты липким потом, тотальный цианоз, «руки прачки», кожная складка не расправляется в течение часа
Лабораторные данные	Показатели крови (вязкость, гематокрит, электролиты) не отклоняются от нормы	Нарушения электролитного состава крови непостоянны, наблюдается гипокалиемия и гипохлоремия	Сгущение крови умеренное, гипокалиемия, гипохлоремия, компенсаторная гипернатриемия	Эритроцитоз, лейкоцитоз, гипокалиемия (до 2,5 ммоль/л), гипохлоремия, натриемия, метаболический ацидоз (рН <7,3), респираторный алкалоз малого круга кровообращения

Лечение заключается в восполнении циркулирующего объема плазмы изотоническими солевыми растворами. Важное значение при проведении регидратационной терапии принадлежит сохранению или восстановлению нормального состава ионов в плазме (натрий, калий, кальций). Прежде всего, необходимо решить вопрос, требуется ли возмещение этих веществ в ходе инфузионной терапии.

Совместно с инфузионной терапией для проведения дезинтоксикационных мероприятий применяется форсированный диурез. Этот метод детоксикации основан на применении препаратов, способствующих возрастанию диуреза, и является наиболее распространенным методом удаления из организма токсических веществ.

Форсированный диурез всегда проводится в три этапа: предварительная водная нагрузка, быстрое введение диуретика и заместительная инфузия раствором электролитов. Обычно этот метод проводится на фоне интенсивной инфузионной терапии 1,0–1,5 л 5% глюкозы, солевых и плазмозаменяющих растворов. Как мочегонное средство применяют мочевины или маннитол (15–20% раствор). Их вводят внутривенно струйно в количестве 1,0–1,5 г на 1 кг массы тела больного. Возможно также применение фуросемида. В последующем вводится раствор электролитов со скоростью, равной скорости диуреза. При форсированном диурезе необходимо проводить строгий учет введенной и выделенной жидкости, определение гематокрина и электролитов крови. Метод противопоказан при тяжелых сердечно-сосудистых заболеваниях, а также при нарушении функции почек.

Неинвазивные сорбционные методы детоксикации

К неинвазивным сорбционным методам детоксикации относят методы детоксикации, метаболической и иммунологической коррекции, в процессе проведения которых не осуществляется прямой контакт сорбента с кровью. У больных практическое применение нашла гастроинтестинальная энтеросорбция.

Сорбенты. В качестве энтеросорбентов используют углеродные сорбенты на основе активированного угля (карболен, карбактин, уголь активированный и др.), кремний-содержащие энтеросорбенты и в том, числе высокодисперсный кремнезем (Полисорб), пористые полимеры природного происхождения (пектины, полифепан, лигносорб и др.), ионообменные материалы (холестирамин, вазозан), синтетические полимеры (энтеродез, энтеросорб).

Выбор сорбентов зависит от конкретных задач терапии, сорбционной емкости и удобства приема препарата, возможности применения у детей с рождения, беременных и кормящих женщин, у пациентов с отягощенным анамнезом и наличием сопутствующих заболеваний и других условий. При инфекционной патологии и аллергических заболеваниях наиболее эффективны современные сорбенты, способные связывать молекулы разного размера и массы, а также бактерии, вирусы, токсины, аллергены и биологически активные вещества (Полисорб, препараты на основе



лигнина). Накопленный к настоящему времени опыт этого вида лечения показал целесообразность его применения как в остром периоде заболевания, так и с целью профилактики рецидивов.

Энтеросорбция может назначаться по синдромальному принципу до установления этиологического диагноза. По степени детоксикации энтеросорбция в течение 1–2 дней сопоставима с однократной экстракорпоральной процедурой. Так же как и другие методы эфферентной терапии, энтеросорбция не заменяет, а дополняет другие реабилитационные мероприятия. По сравнению с экстракорпоральной гемокоррекцией сфера применения энтеросорбции при заболеваниях гораздо шире и охватывает легкие и среднетяжелые формы интоксикаций.

Как отдельное направление инвазивной эфферентной терапии возможно рассматривать методы с использованием межклеточных детоксикантов. В настоящее время единственным таким препаратом является азоксимера бромид (полиоксидоний). Он сорбирует на себе растворимые токсические вещества, микрочастицы и другие алармины, которые в дальнейшем захватываются макрофагами. За счет этого снижается концентрация PAMP и DAMP, чем и обусловлен его противовоспалительный эффект.

Наиболее эффективным оказался способ энтеральной детоксикации, запатентованный нами.

При применении данного метода используются следующие препараты:

Лактулоза — синтетический слабительный пребиотик, относится к дисахаридам: ее молекула состоит из остатков галактозы и фруктозы. Лактулоза не расщепляется пищеварительными ферментами, не всасывается в желудке и тонкой кишке и в неизменном виде достигает толстой кишки. Кишечной флорой толстой кишки лактулоза расщепляется на низкомолекулярные органические кислоты, которые приводят к понижению pH и посредством осмотического давления — к увеличению объема кишечного содержимого. Указанные эффекты стимулируют перистальтику кишечника и оказывают влияние на консистенцию стула. В результате отмечается слабительный эффект. Помимо этого, происходят подавление протеолитических бактерий, увеличение количества ацидофильных бактерий (например, лактобацилл), поглощение аммиака толстым кишечником, очищение кишечника (благодаря низкому показателю pH), уменьшение азотсодержащих токсических веществ путем стимуляции бактерий, связывающих аммиак в процессе белкового синтеза. Послабляющий эффект лактулозы при дозе 40–50 мл составляет 90–120 мин.

Энтеросорбенты — препараты медицинского назначения, обладающие высокой сорбционной емкостью, не разрушающиеся в желудочно-кишечном тракте и способные путем адсорбции, ионообмена или комплексообразования связывать экзо- и токсические эндогенные вещества различной природы, включая патогенные бактерии и бактериальные токсины, антигены, пищевые аллергены, лекарственные препараты и яды, соли тяжелых металлов, радионуклиды,

алкоголь. Они также сорбируют некоторые продукты обмена веществ организма, в том числе избыток билирубина, мочевины, холестерина и липидных комплексов, а также метаболиты, ответственные за развитие эндогенного токсикоза.

Способ осуществляется следующим образом. Пациенту с заболеванием, сопровождающимся иммунными нарушениями, одновременно с началом базового курса лечения назначают прием 1 раз в сутки пребиотика, обладающего слабительным действием, и энтеросорбента. Пребиотик, например лактулозу (дюфалак, прелакс, лактусан и проч.), используют в виде сиропа (100 мл раствора содержат 66,7 г лактулозы; вода — до 100 мл). Дозу препарата подбирают индивидуально: из расчета 0,5 мл сиропа на 1 кг массы пациента (в среднем 30–60 мл). При отсутствии слабительного эффекта лактулозы после первого приема назначают повторный прием лактулозы — $\frac{1}{2}$ первоначальной дозы (20–30 мл). Через 8–12 ч пациент принимает энтеросорбент, например полисорб МП, в виде водной взвеси в стандартной дозировке. В качестве энтеросорбента могут также применяться уголь активированный, энтеросгель, лактофилтрум. В зависимости от степени тяжести токсикоза курс энтеральной детоксикации включает 3–5 ежедневных процедур комплексного приема слабительного пребиотика и энтеросорбента.

Противопоказания к проведению детоксикационной терапии указанным методом: галактоземия, повышенная чувствительности к компонентам препаратов, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки в фазе обострения, кровотечения из желудочно-кишечного тракта, атония кишечника, непроходимость кишечника.

Инвазивные методы эфферентной терапии

Инвазивные методы эфферентной терапии показаны при тяжелых интоксикациях, также отмечен их эффект при различных хронических иммунопатологических состояниях.

К экстракорпоральной гемокоррекции (ЭГ) относятся трансфузиологические операции направленного количественного и качественного изменения клеточного, белкового, водно-электролитного, ферментного, газового состава крови во внеорганизменном перфузионном контуре кровообращения.

Эти изменения на сегодняшний день реализуются с помощью мембранной, сорбционной, центрифужной, электромагнитной и преципитационной технологий обработки крови, проведением внутривенных вливаний.

Гемодиализ — метод детоксикации, основанный на принципе диффузионного и фильтрационного переноса через полупроницаемую мембрану низкомолекулярных токсических субстанций, электролитов и внутрисосудистой жидкости из циркулирующей экстракорпорально крови в диализирующий раствор. В настоящее время под аппаратом для гемодиализа (как и для других экстракор-

поральных операций) понимают монитор, систему магистралей и массообменное устройство — диализатор, который и определяет качественные характеристики гемодиализа.

Гемофильтрация и ультрафильтрация — методы детоксикации, основанные на принципе фильтрационного переноса жидкости и некоторых токсических субстанций через полупроницаемую мембрану из циркулирующей экстракорпорально крови за счет градиента давления. При этом, если в качестве массообменных устройств применяют диализаторы, мембрана которых имеет коэффициент фильтрации 2,5–70 мл/мин, операция носит название «изолированная ультрафильтрация», или «сухой диализ»; в случае использования гемофильтров, мембрана которых имеет коэффициент фильтрации 90–140 мл/мин, операция называется «гемофильтрация». Соответственно, если при ультрафильтрации из крови выводятся ионы и низкомолекулярные вещества, то при гемофильтрации — вещества низкой и частично средней молекулярной массы, а объем выводимой жидкости таков (до 5–7 л/ч), что требует адекватного инфузионного замещения специальными растворами или приготовляемыми из стандартных солевых концентратов в специальных мониторах для гемодиализа и гемофильтрации.

Гемосорбция (гемокорбонерфузия) — метод детоксикации, основанный на выведении из крови большого токсических субстанций путем перфузии через адсорбенты в экстракорпоральном контуре. Для сорбции наиболее часто применяются активированные угли и ионообменные смолы.

Лимфосорбция — метод ЭГ, основанный на дренировании грудного лимфатического протока, эксфузии и фракционной сорбции лимфы с последующим ее введением в сосудистое русло. Удаление значительного количества лимфы для достижения детоксикационного эффекта оказывалось нередко неблагоприятным для больного в силу невозможности полной компенсации составных частей удаляемой лимфы и клеток, что нарушало белковый и иммунный гомеостаз. В основе активной детоксикации за счет дренажа грудного лимфатического протока и лимфосорбции лежит удаление маркеров начальной токсинемии и факторов вторичной токсической агрессии, которые попадают в лимфу грудного лимфатического протока из очагов и должны дренироваться этой системой.

Плазмаферез — это метод ЭГ, основанный на замене плазмы больного электролитными растворами, препаратами крови и/или кровезаменителями. Если плазмаферез проводят в объеме, превышающем 50% объем циркулирующей плазмы, то он носит название плазмообмена. Плазмаферез в силу больших возможностей варьирования методик его проведения (скорость, объем перфузии, объем и качество плазмозамещения, трансфузионная и медикаментозная программа) может иметь детоксикационную, иммунокорректирующую и реокорректирующую направленность. Если при плазмаферезе выведенная плазма не замещается компонентами крови или кровезаменителями, а сорбируется и реинфузируется, такая операция называется плазмосорбцией. Эта операция может быть

неселективной (применение в качестве сорбентов активированных углей), полуселективной (применение ионообменных смол) и селективной (применение иммуносорбентов или аффинных сорбентов). С целью активной детоксикации плазмосорбция редко применяется изолированно, однако она часто дополняет плазмаферез. Такая комбинация (плазмаферез + плазмосорбция) целесообразна при всех вышеизложенных показаниях, связанных с эндотоксикозом.

Цитаферез — метод ЭГ, основанный на выведении определенных клеточных компонентов крови больного и замене их компонентами, препаратами крови и (или) кровезаменителями. Различают следующие варианты цитафереза: эритроцитаферез, тромбоцитаферез, лимфоцитаферез, гранулоцитаферез, стемаферез (выведение СК крови). Как правило, цитаферез дополняет специфические эффекты действия плазмафереза.

Гемоксигенация — метод гемокоррекции, основанный на изменении состава крови путем ее оксигенации при перфузии в экстракорпоральном контуре. В зависимости от массообменного устройства различают пузырьковую, пленочную, мембранную оксигенацию и оксигенацию с помощью фторорганического переносчика кислорода.

Перитонеальный диализ — метод детоксикации, в основе которого лежит диффузионный и фильтрационный перенос через живую мембрану (брюшину) низко-, среднемолекулярных токсических субстанций и жидкости из внутри- и внесосудистого пространства в естественно существующую полость брюшины. С помощью этой технологии можно удалять из крови и всей внутренней среды организма, прежде всего, экзогенные и эндогенные водорастворимые вещества.

Фотогемотерапия представляет собой дозированное облучение крови квантами света с длиной волны 280–680 нм (верхняя часть ультрафиолетового спектра и видимый свет). Вызываемое фотонами возбуждение биомолекул и функционально-структурные изменения форменных элементов крови приводят к существенной активации лейкоцитов, факторов неспецифической резистентности организма, изменению проницаемости мембран и запуску опосредованных каскадных фотохимических реакций. Считается, что коротковолновое облучение крови (до 400 нм) обуславливает в основном иммунокорректирующий эффект, а длинноволновое облучение оптического диапазона существенно улучшает реологические свойства крови и микроциркуляцию.

При проведении курса лечения может применяться как один метод ЭГ, так и их сочетание и даже меняться интенсивность и направленность эффекта принципиально одного метода. Более того, в ряде случаев для достижения желаемого результата необходима комбинация методов гемокоррекции в одном экстракорпоральном контуре, позволяющая либо потенцировать основную направленность ЭГ, либо достигать сочетаемой направленности, либо нивелировать нежелательное действие изолированной операции.

Глава 15. Метаболическая регуляция функциональной активности клеток иммунной системы при клеточной терапии



Клеточные технологии определяются как совокупность методов, направленных на выделение отдельных типов клеток из какой-либо ткани, их культивирование (выращивание) с целью увеличения количества определенного типа клеток и последующего использования продуктов жизнедеятельности этих клеток или самих клеток в лечебных целях (Балдуева И.А. и соавт., 2020). Это новая многообещающая отрасль современной биомедицины, и от того, по какому пути она пойдет, зависит будущее медицины в ближайшие десятилетия. Уже в первом десятилетии XXI века было создано более 30 биотехнологических стартап-компаний в 11 странах с ежегодным бюджетом около 200 млн долларов, основой коммерческой деятельности которых стали технологии, основанные на применении стволовых клеток и терапевтическом клонировании. На сегодняшний день более 300 компаний занимаются разработкой подходов к клеточной терапии.

Одним из направлений в клеточных технологиях, применяемых в медицине, является стимулирование процессов пролиферации и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток (МСК). В основе механизмов влияния метаболитов на функциональную активность МСК лежат процессы, связанные как с непосредственным влиянием субстратов и коферментов на активность отдельных ферментов или метаболических процессов, так и с эпигенетической регуляцией. Термин «эпигенетическая регуляция» относится к нескольким процессам, которые вызывают изменения в наследуемой экспрессии без изменения геномов. Эти процессы включают метилирование ДНК, модификации гистонов, регуляцию некодирующей РНК и т. д. (Wang X. et al., 2023). Эпигенетическая регуляция играет основную роль в некоторых биологических характеристиках МСК и необходима для поддержания гомеостаза, определения судьбы клеток, старения клеток, их пролиферации. Эпигенетические ферменты регулируются внешним микроокружением, и передача этих сигналов клетками способствует ответу МСК на внешние изменения (Meier J.L., 2013).

Иммунотерапия на основе аутологичных Т-лимфоцитов, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы [(CAR), Chimeric Antigen Receptor], созданных с помощью методов генной инженерии (адоптивная иммунотерапия), является одним из наиболее многообещающих методов лечения онкологических

больных (Петухов А.В. и соавт., 2018; Biltibo E., Berdeja J.G., 2023; Zhang X.W. et al., 2023). При этом выраженная противоопухолевая активность CAR T-клеток требует введения метаболитов, стимулирующих пластические и энергетические процессы в лимфоцитах. Кроме того, необходимо учитывать, что метаболические потребности самих опухолевых клеток и микроокружения опухоли [(TME), Tumor Microenvironment] также отрицательно влияет на состояние метаболических процессов CAR T-лимфоцитов и, соответственно, их функциональную активность.

В 1956 году Отто Варбург констатировал, что пролиферация раковых клеток поддерживается энергетикой анаэробного гликолиза (рис. 141), а не процессами окислительного фосфорилирования (Warburg O., 1956).

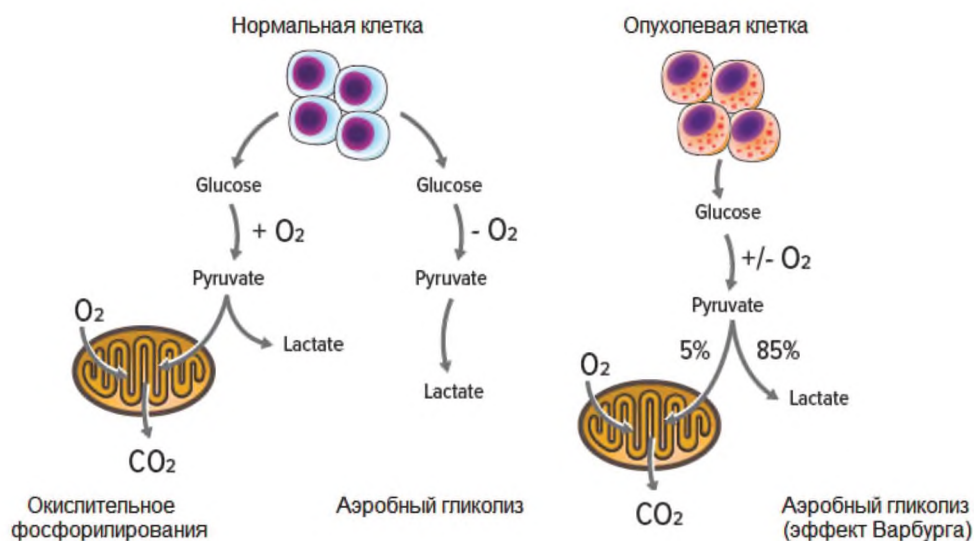


Рис. 141. Сравнительная характеристика анаэробной и аэробной энергетики в раковых клетках
(Xia L. et al., 2021)

Анаэробный метаболизм настолько важен для раковых клеток, что наиболее часто выявляемые в них мутации, стимулирующие экспрессию Ras (мембраносвязанные G-белки, участвующие в передаче регуляторного и/или функционального сигнала), активность PI3K/АКТ/mTOR (сигнальный путь, центральными компонентами которого являются ферменты фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназы АКТ (три протеинкиназы В, кодируемые генами АКТ1, АКТ2 и АКТ3) и mTOR (mammalian target of rapamycin)) (рис. 142), уровень фактора, индуцируемого гипоксией 1 α (HIF-1 α) и протоонкогенов c-MYC (фактор тран-

транскрипции) определяют высокий уровень экспрессии белков, обеспечивающих транспорт глюкозы в клетку, и синтез ферментов терминальной стадии гликолиза (продукция лактата) (Xu X. et al., 2019). Так, HIF-1 и c-MYC совместно экспрессируют белки, транспортирующие глюкозу и лактат, при этом перенаправляют пируват от реакций цитратного цикла к продукции лактата (Dang C.V., 2012; San-Millán I., Brooks G.A., 2017). Последовательная активация PI3K, за которой следует AKT и mTORC, также способна помочь раковым клеткам захватывать глюкозу из окружающей среды, а также катаболические метаболиты из митохондрий. AKT активирует гексокиназу (инициализирующий фермент гликолиза) и фосфофрукто-

киназу (ключевой фермент гликолиза), а также АТФ-цитратлиазу, чтобы превратить митохондриальный цитрат в цитозольный ацетил-КоА для синтеза липидов (Goncalves M.D., Cantley L.C., 2018; Ward P.S., Thompson C.B., 2012). Наконец, mTORC усиливает процессы биосинтеза в митохондриальном компартменте, поглощая оксалоацетат и α -кетоглутарат, превращая их в аминокислоты для последующего белкового синтеза (Ward P.S., Thompson C.B., 2012).

Также необходимо учитывать, что солидная опухоль проявляет пространственную метаболическую неоднородность (Инжеваткин Е.В., Савченко А.А., 2019). На рис. 143 показано распределение активности ферментов по площади исследованного фрагмента опухолевой ткани. Наибольшая активность НАДМДГ и НАДИЦДГ наблюдается в центральной области фрагмента. Известно, что в опухоли ЦТК функционирует в значительной мере как источник субстратов для биосинтеза аминокислот и жирных кислот, необходимых для пролиферации ее клеток (DeBerardinis R.J. et al., 2008).

Таким образом, высокие значения активности данного фермента в центральной области опухоли могут свидетельствовать о существовании высокого пролиферативного потенциала клеток карциномы. Максимум активности НАДНМДГ

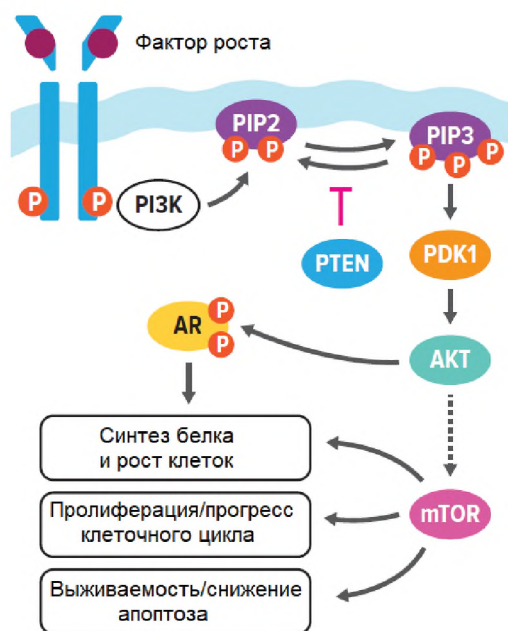


Рис. 142. Структура и значение сигнального пути PI3K/AKT/mTOR

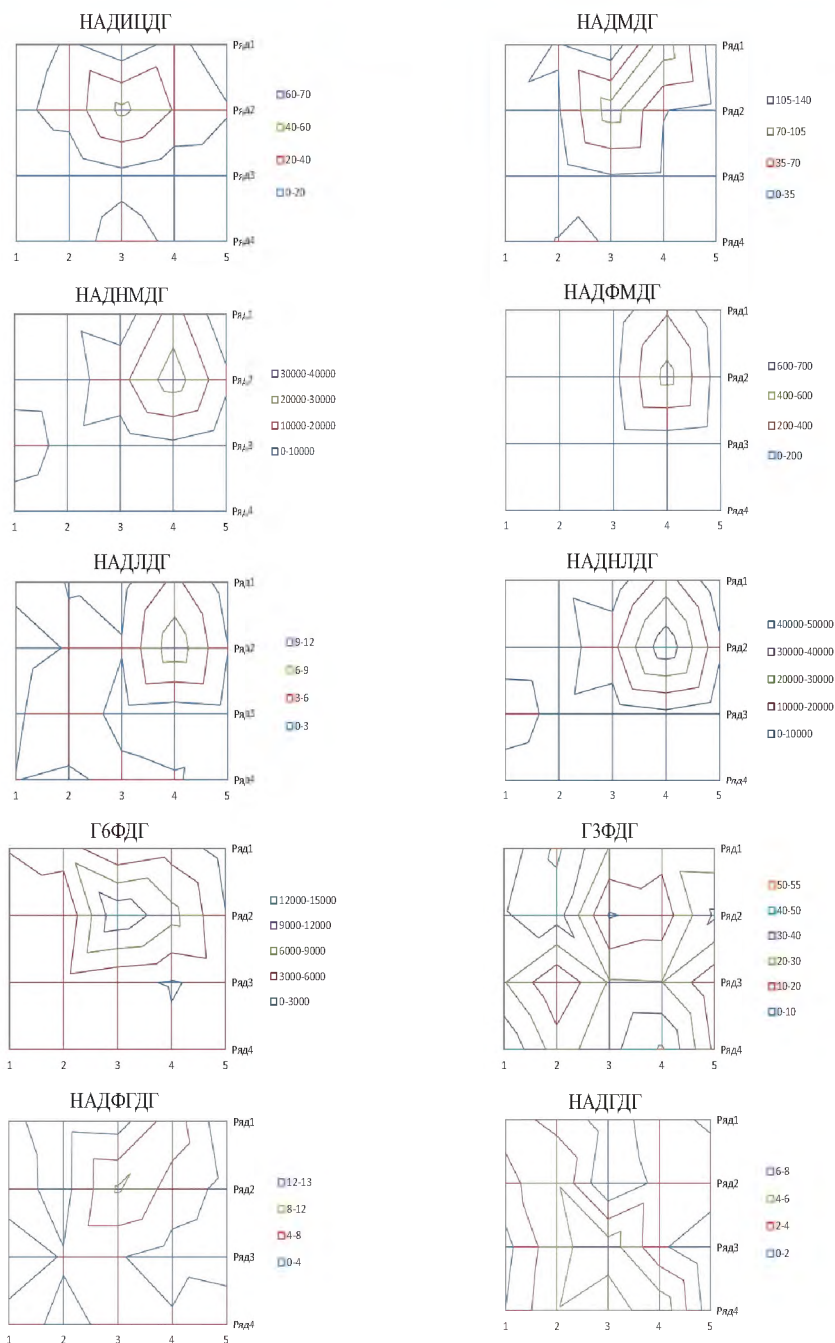


Рис. 143. Распределение активности никотинамидадениндинуклеотид- и никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимых дегидрогеназ (мкЕ/мг белка) в пределах опухолевой ткани солидной карциномы Эрлиха (Инжеваткин Е.В., Савченко А.А., 2019)

наблюдается в смежной области солидной опухоли. В дальнейшем малат в митохондриях опухолевых клеток может превращаться в оксалоацетат, который в свою очередь становится субстратом для получения аминокислот. Активность НАДФМДГ, НАДЛДГ и НАДНЛДГ достигает максимума в той же области опухоли, что и НАДНМДГ. НАДФМДГ выполняет в клетках роль поставщика НАДФН. С этим ферментом связывают усиление инвазивной способности опухоли, поскольку восстанавливаемый им НАДФН используется для синтеза жирных кислот в опухолевых клетках, а также обеспечивает поддержание внутриклеточного редокс-статуса и защищает раковые клетки от окислительного стресса (Zheng F.J. et al., 2012). Высокая активность НАДЛДГ и НАДНЛДГ свидетельствует о высоком уровне интенсивности гликолиза. Г6ФДГ является иницирующим ферментом пентозофосфатного пути, в результате деятельности которого образуется НАДФН, необходимый для регенерации восстановленного глутатиона. Вследствие этого Г6ФДГ часто рассматривают в качестве одного из защитных ферментов клеток, наряду с такими ферментами, как САТ, СОД, глутатион-S-трансфераза и ГР. Важно, что пентозофосфатный путь обеспечивает субстратами и НАДФН макромолекулярный синтез, что имеет особое значение для активно пролиферирующих клеток (Perl A. et al., 2011). Следовательно, повышение активности Г6ФДГ в центральной области тела опухоли определяет усиление в клетках биосинтетических процессов. Активность Г3ФДГ достигает максимальных уровней на периферии раковой опухоли. Этот фермент катализирует НАД-зависимое превращение глицерол-3-фосфата, который является предшественником триацилглицеролов, в диоксиацетонфосфат — один из интермедиатов гликолиза (Smirnova O.V. et al., 2011). Высокий уровень активности Г3ФДГ свидетельствует о возникновении предпосылок для перераспределения субстратов липидного обмена в направлении гликолиза. В то же время низкий уровень активности данного фермента в центральной области раковой опухоли говорит о преимущественном использовании глицерол-3-фосфата в качестве субстрата для синтеза липидов. Наряду с повышенной активностью Г6ФДГ и другими особенностями метаболизма, характерными для центральной области тела опухоли, это может свидетельствовать о развитии процессов метаболической адаптации опухолевых клеток. Пластический и энергетический обмен также зависит от активности НАДФ- и НАД-зависимых реакций глутаматдегидрогеназ, которые обеспечивают поступление в цикл трикарбоновых кислот субстратов от аминокислотного обмена в виде α -кетоглутарата, с образованием аммиака (Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012). Исходя из наших данных, наибольший уровень активности НАДФГДГ наблюдается в центральной и правой верхней областях раковой опухоли, тогда как активность фермента для НАД-зависимой реакции достигает наибольших значений в смежных областях. Таким образом, в целом распределение активности реакций НАДФГДГ и НАДГДГ противоположно: высокий уровень активности НАДФГДГ соответствует пониженному уровню НАДГДГ и наоборот.

Особенности метаболизма раковых клеток, соответственно, определяют биохимию в системе ТМЕ, что реализуется в метаболической конкуренции между раковыми клетками и клетками иммунной системы (рис. 87). Кроме того, некоторыми продуктами метаболизма раковых клеток являются вещества, которые оказывают ингибирующее влияние на эффекторные клетки противоопухолевого иммунитета и/или активирующее влияние на супрессирующие клетки иммунной системы. В частности, накопление молочной кислоты и CO_2 за счет метаболизма раковых клеток вызывает снижение pH в ТМЕ и, соответственно, подавляет пролиферативную активность Т-клеток, ухудшает продукцию цитокинов и ингибирует цитотоксическую активность Т-клеток, вызывая при этом радиорезистентность опухоли и способствуя миграции и инвазии опухолевых клеток (Barbieri L. et al., 2023; Bohn T. et al., 2018).

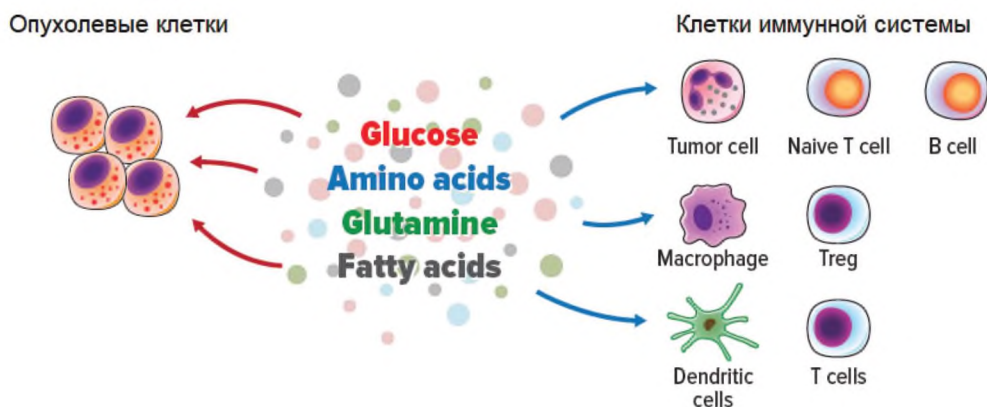


Рис. 144. Метаболическая конкуренция между раковыми клетками и клетками иммунной системы
(Xia L. et al., 2021)

Доказано, что высокая экспрессия индоламин-2,3-диоксигеназы [(IDO), indoleamine-2,3-dioxygenase, EC 1.13.11.52] и триптофан-2,3-диоксигеназы [(TDO), tryptophan 2,3-dioxygenase, EC 1.13.11.11] макрофагами и раковыми клетками способствует иммунной толерантности, опосредуя превращение триптофана в кинуренин (Adams S. et al., 2012; Zhang S. et al., 2022). Истощение триптофана и накопление кинуренина приводит к подавлению противоопухолевого иммунитета, реципрокно нарушая рост и выживание Т-эффекторных клеток и усиливая развитие и функцию Treg и супрессорных клеток миелоидного происхождения [(MDSC), myeloid-derived suppressor cells] (Nguyen N.T. et al., 2013; Xu X. et al., 2019). Внеклеточный цистеин и аргинин также являются важными питательными ресурсами, за которые конкурируют как Т-лимфоциты, так и раковые клетки. Цистеин вместе с глицином и глутаматом являются субстратами

для синтеза *de novo* восстановленного глутатиона (GSH), который является одним из наиболее важных клеточных антиоксидантов, контролируя уровни внутриклеточных АФК и перекисей (Савченко А.А., Борисов А.Г. 2012; Morales-Borges R.H. et al., 2022). В то же время катаболизм глюкозы и глутамина обеспечивает поступление в раковые клетки глицина и глутамата, тем самым стимулируя восстановительную способность через НАДФН (Altman B.J. et al., 2016; Belikov A.V. et al., 2015; Zhao H. et al., 2022). В связи с тем, что в Т-лимфоцитах отсутствует цистатионаза (цистатион гамма-лиаза: EC: 4.4.1.1 – фермент, превращающий метионин в цистеин), они становятся более уязвимыми к цистеиновому голоданию, чем раковые клетки (Srivastava M.K. et al., 2010; Yu M., Zhang S., et al., 2023). Показано, что стимуляция синтеза аргинина в Т-клетках способствует выработке ими провоспалительных цитокинов и формированию фенотипа клеток центральной памяти, а также усиливает противоопухолевый ответ (Geiger R. et al., 2016; Valvo V. et al., 2022). И наоборот, стимуляция ферментативной активности аргиназы (расщепляет аргинин на орнитин и мочевины) вызывает анергию Т-лимфоцитов (Weis-Banke S.E. et al., 2022).

При реализации стресса и/или повреждении клетки в ТМЕ высвобождают АТФ/АДФ и их катаболический продукт — аденозин, который через вовлечение пуриnergических рецепторов P2 вызывает иммуносупрессивные эффекты (Sekic C., Linden J., 2016; Chen S. et al., 2022). Рецепторы CD39 и CD73 представляют собой две эктонуклеотидазы, которые широко экспрессируются на плазматической мембране раковых клеток и раковых стромальных клетках и ответственны за превращение АДФ/АТФ в АМФ и аденозин. Соответственно, рецепторы CD39 и CD73 играют решающую роль в определении исхода противоопухолевого иммунитета за счет смещения провоспалительных эффектов, обусловленных АТФ, на противовоспалительные процессы, опосредованные аденозином (Jiang X. et al., 2023; Yang R. et al., 2020). Аденозиндезаминаза (ADA) превращает аденозин в инозин, прекращая аденозин-опосредованные иммуносупрессивные эффекты (Secord E., Hartog N.L., 2022). В соответствии с этим генетическая потеря ADA приводит к накоплению аденозина, что ведет к развитию тяжелого комбинированного иммунодефицита [(SCID), Severe combined immunodeficiency] (Козлов В.А. и соавт., 2020; Signa S. et al., 2022).

Таким образом, в процессе роста опухоль формирует клеточное и гуморальное микроокружение, ингибирующее противоопухолевую активность эффекторных клеток иммунной системы. Причем факторы ТМЕ действуют не только в зоне роста опухоли, но и дистантно, попадая в общий кровоток организма (Jeong J. et al., 2019; Romero-Garcia S. et al., 2016). Установлено, что за счет такого регуляторного воздействия при ряде онкологических заболеваний меняется субпопуляционный состав моноцитов с соответствующей модуляцией их функциональной активности и последующей дифференцировкой в макрофаги и ДК (Савченко А.А. и соавт., 2020; Черных Е.Р. и соавт., 2019). В связи с этим проведено исследование особенностей изменения субпопуляционного состава и

фагоцитарной активности моноцитов у больных раком почки (РП) при воздействии метаболитов *in vitro*. В качестве опухолевых продуктов метаболизма мы исследовали регуляторное влияние на моноциты таких метаболитов, как лактат, АДФ и глутамат. Связано это с тем, что их концентрация в ТМЕ значительно меняется, что приводит к снижению функциональной активности эффекторных клеток иммунной системы (Bhagat T.D. et al., 2019; Guerra L. et al., 2020; Romero-Garcia S. et al., 2016).

При исследовании субпопуляционного состава моноцитов без воздействия метаболитов (контроль) установлено, что у больных РП в крови повышается процентное содержание CD14⁺⁺CD16⁻-моноцитов (табл. 51).

Таблица 51

Субпопуляционный состав моноцитов крови (в %) у лиц контрольной группы и больных раком почки при воздействии метаболитов *in vitro* [Me (C25–C75)]

Показатели	Контрольная группа n=32	Больные РП n=38	p
Контроль			
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	66,8 (38,8–72,4)	81,7 (68,2–91,7)	<0,05
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	21,3 (9,0–49,1)	14,5 (9,5–33,8)	
CD14 ⁺ CD16 ⁺	7,9 (6,5–15,1)	5,8 (3,1–13,2)	
Лактат			
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	72,3 (60,1–83,4)*	91,7 (72,3–97,1)*	<0,05
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	15,5 (7,8–23,3)*	5,3 (3,1–12,6)**	<0,05
CD14 ⁺ CD16 ⁺	9,2 (3,3–15,7)	6,5 (3,0 – 12,2)	
АДФ			
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	76,4 (43,6–88,2)	95,0 (76,8–98,9)**	<0,05
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	13,4 (4,3–20,9)**	4,4 (1,7–12,7)**	<0,05
CD14 ⁺ CD16 ⁺	6,1 (1,1–8,9)*	4,1 (1,9–13,3)	
Глутамат			
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	74,7 (46,2–98,2)	89,1 (74,1–98,3)*	
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	15,6 (8,4–29,5)*	6,3 (2,–14,7)***	<0,05
CD14 ⁺ CD16 ⁺	5,9 (3,1 –13,1)	4,7 (2,9–9,4)	

Примечание: *, **, *** — p < 0,05, p < 0,01 и p < 0,001 относительно соответствующего фенотипа моноцитов при инкубации без метаболитов (контроль); p — статистически значимые различия между показателями больных РП и лиц контрольной группы.

Не обнаружено статистически значимых различий в абсолютном количестве моноцитов в крови у лиц контрольной группы и больных РП: в контроле — Me = 0,42×10⁶/л, C25 = 0,29×10⁶/л, C75 = 0,72×10⁶/л; при РП — Me = 0,48×10⁶/л, C25 = 0,33×10⁶/л, C75 = 0,81×10⁶/л, p = 0,326. Следовательно, увеличение относительного количества классических моноцитов при РП не связано с изменением

выхода моноцитов из костного мозга, а определяется регуляторным комплексом патологических факторов опухолевого роста. При инкубации с лактатом у больных РП выявляется повышение процентного уровня классических моноцитов относительно контрольных значений и снижение относительного содержания промежуточных моноцитов. При этом перераспределение субпопуляционного состава моноцитов за счет воздействия лактата *in vitro* у лиц контрольной группы и больных РП реализуется одинаково: повышение количества классических моноцитов и понижение содержания промежуточных относительно исходных значений (контроль). При инкубации с АДФ у больных РП обнаружено повышение относительного количества классических моноцитов и снижение промежуточных относительно контрольных значений. У лиц контрольной группы воздействие АДФ *in vitro* привело к понижению уровней промежуточных и неклассических моноцитов относительно исходных значений. В результате инкубации моноцитов с глутаматом *in vitro* у больных РП наблюдается повышение относительного количества классических моноцитов и понижение промежуточных моноцитов относительно исходных значений, тогда как у лиц контрольной группы выявляется только снижение уровня промежуточных моноцитов.

У больных РП при отсутствии метаболического воздействия относительно контрольных значений снижается величина ФИ у всех субпопуляций моноцитов, но при этом повышается ФЧ для CD14⁺⁺CD16⁻-клеток (табл. 52). При воздействии исследуемых метаболитов ФИ для всех субпопуляций моноцитов у больных был ниже, чем у лиц контрольной группы. При инкубации *in vitro* с лактатом и глутаматом у обследованных пациентов сохраняется повышенный уровень ФЧ для классических моноцитов. Воздействие лактата привело к увеличению величины ФЧ для промежуточных моноцитов, тогда как АДФ вызвал снижение ФЧ для неклассических моноцитов у больных РП относительно контрольного уровня. Относительно исходных значений у лиц контрольной группы возрастает ФИ для субпопуляции промежуточных моноцитов при инкубации с лактатом, а также для субпопуляции классических моноцитов при воздействии АДФ. Инкубация моноцитов с АДФ также привела к повышению ФЧ для CD14⁺CD16⁺-клеток у лиц контрольной группы. При РП инкубация с глутаматом *in vitro* вызывает повышение ФИ для субпопуляции промежуточных моноцитов относительно исходных значений, тогда как воздействие АДФ приводит к снижению ФИ для субпопуляции классических моноцитов, но повышает ФИ для субпопуляции промежуточных моноцитов.

Изменение метаболического состава ТМЕ реализуется в том числе дистанционно в регуляторном воздействии на клетки иммунной системы (включая моноциты) за счет различных механизмов: рецепторного, метаболического и эпигенетического (Bhagat T.D. et al., 2019; Guerra L. et al., 2020; Romero-García S. et al., 2016). Эпигенетический механизм модуляции функциональной активности клеток иммунной системы заключается в увеличении под воздействием лактата

Таблица 52

Фагоцитарная активность моноцитов крови у лиц контрольной группы и больных раком почки при воздействии метаболитов *in vitro* [Me (C25–C75)]

Показатели	Контрольная группа n=32		Больные РП n=38		p
	ФИ, %	ФЧ, о.е.	ФИ, %	ФЧ, о.е.	
Контроль					
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	17,43 (11,28–38,64)	3,88 (3,07–4,47)	3,18 (1,57–9,41)	5,16 (3,89–5,68)	ФИ <0,001 ФЧ <0,05
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	59,03 (9,41–88,13)	4,16 (3,16–5,22)	8,11 (3,10–13,70)	4,65 (3,28–5,91)	ФИ <0,001
CD14 ⁺ CD16 ⁺	16,66 (9,20–26,32)	4,41 (2,61–7,59)	6,98 (4,00–14,81)	4,05 (3,07–5,88)	ФИ <0,05
Лактат					
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	15,79 (9,62–43,51)	3,54 (3,28–4,24)	4,59 (2,10–9,88)	5,70 (4,14–6,71)	ФИ <0,05 ФЧ <0,001
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	72,51* (13,04–85,45)	4,35 (3,30–5,63)	12,01 (5,69–23,44)	5,62 (4,97–7,38)	ФИ <0,05 ФЧ <0,05
CD14 ⁺ CD16 ⁺	30,30 (10,71–34,37)	4,29 (3,35–5,64)	5,16 (2,23–9,11)	4,48 (3,63–7,41)	ФИ <0,01
АДФ					
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	10,75*** (7,51–24,23)	3,91 (3,06–5,92)	1,92** (1,41–3,54)	3,86 (3,34–4,72)	ФИ <0,001
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	45,61 (25,84–69,40)	4,29 (2,90–6,43)	14,39** (6,78–22,22)	4,03 (3,40–4,68)	ФИ <0,001
CD14 ⁺ CD16 ⁺	16,19 (9,43–25,71)	5,92* (4,40–9,28)	7,69 (3,13–14,28)	3,40 (3,04–4,97)	ФИ <0,05 ФЧ <0,05
Глутамат					
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	15,23 (13,25–31,00)	3,56 (3,10–5,76)	3,18 (1,65–8,29)	5,37 (4,51–8,20)	ФИ <0,001 ФЧ <0,05
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	45,40 (20,53–67,20)	5,13 (3,47–5,78)	10,52*** (5,00–22,22)	4,32 (3,24–5,31)	ФИ <0,01
CD14 ⁺ CD16 ⁺	13,04 (9,96–34,15)	3,56 (1,92–8,23)	5,26 (3,33–11,76)	3,52 (2,81–5,81)	ФИ <0,05

Примечание: то же, что и для табл. 8.1.

продукции α -кетоглутарата (α КГ), который в свою очередь активирует деметилазу ТЕТ (tet methylcytosine dioxygenase), что приводит к снижению метилирования цитозина и увеличению гидроксиметилирования во время дифференцировки *de novo* (Bhagat T.D. et al., 2019). Известно, что концентрация лактата и АДФ в ТМЕ повышается, уровень глутамата снижается (Bhagat T.D. et al., 2019; Guerra L. et al., 2020). Доказано, что при воздействии лактата на клетки иммун-

ной системы снижается пролиферативная и цитолитическая активность Т-клеток, повышается образование толерогенных ДК (Guerra L. et al., 2020; Romero-Garcia S. et al., 2016).

Клеточный стресс или апоптоз вызывает высвобождение АТФ, АДФ и других нуклеотидов во внеклеточное пространство. Внеклеточные нуклеотиды функционируют как аутокринные и паракринные сигнальные молекулы (Sekic C., Linden J., 2016). Регуляторное действие нуклеотиды осуществляют через пуриnergические рецепторы, которые экспрессированы на всех клетках иммунной системы (в том числе и на моноцитах) (Асадуллина И.А. и соавт., 2017; Layhadi J.A. et al., 2019). Доказано, что пуриnergическая передача сигналов, реализуемая нуклеотидами (особенно АТФ и аденозином в качестве молекул-трансммиттеров), играет важную роль в иммунной системе (Wang X., Chen D., 2018). Во внеклеточной среде АТФ преимущественно функционирует как провоспалительная молекула посредством активации рецепторов P2, тогда как аденозин в основном функционирует как противовоспалительная молекула посредством активации рецепторов P1. Смещение баланса между передачей P2 и P1 сигналов имеет решающее значение для того, чтобы клетки иммунной системы соответствующим образом проявляли свою функциональную активность.

Глутамат при канцерогенезе активно потребляется клетками опухоли, его недостаток в ТМЕ значительно ингибирует функциональную активность эффекторных клеток иммунной системы (Guerra L et al., 2020.). При этом показано, что глутамат, как один из наиболее важных источников углерода в цикле трикарбоновых кислот, занимает центральное место в метаболических процессах, которые впоследствии влияют на прогрессирование опухоли (Koda S. et al., 2023). Различные факторы могут влиять на экспрессию глутаматных рецепторов, либо осуществляя проопухолевый механизм, либо реализуя противоопухолевые процессы при раке. Следовательно, активация глутаматных рецепторов лигандом может играть роль в развитии опухоли, поскольку обширные исследования продемонстрировали экспрессию глутаматных рецепторов в широком спектре опухолевых клеток. Кроме того, глутамат и его рецепторы участвуют в регуляции развития и функционирования различных иммунных клеток, о чем свидетельствует экспрессия рецепторов на поверхности иммунных клеток (Xiong T. et al., 2022). Активация глутаматных рецепторов может повысить эффективность Т-клеток эффектора или уменьшить выработку цитокинов в MDSC, увеличивая противоопухолевый иммунный ответ (Koda S. et al., 2023). Эти рецепторы необходимы для взаимодействия между опухолевыми и иммунными клетками в микроокружении опухоли (ТМЕ) и регуляции противоопухолевых иммунных реакций.

Тем не менее опосредованные исследуемыми метаболитами изменения субпопуляционного состава моноцитов у больных РП однотипны: повышение процентного содержания субпопуляции классических моноцитов и снижение фракции промежуточных моноцитов. Причем способность дифференцироваться в зрелые и функционально активные ДК связывают именно с фракциями

промежуточных и неклассических моноцитов (клетки, экспрессирующие CD16+) (Черных Е.Р. и соавт., 2019; Padgett L.E. et al., 2020). В то же время фагоцитарная активность субпопуляций моноцитов у больных РП меняется уже в зависимости от воздействующего метаболита. Так, только под воздействием лактата повышается фагоцитарное число (ФЧ) для фракции промежуточных моноцитов и только при воздействии АДФ снижается ФЧ для субпопуляции неклассических моноцитов у больных РП относительно контрольных значений. АДФ-опосредованные изменения фагоцитарной активности также определяются разнонаправленным изменением величины фагоцитарного индекса (ФИ) для классических и промежуточных моноцитов у больных РП относительно исходных значений. В то же время глутамат вызывает увеличение величины ФИ для фракции промежуточных моноцитов у лиц данной группы.

Опосредованные метаболитами изменения в соотношении субпопуляционного состава моноцитов и их фагоцитарной активности обнаружены не только у больных РП, но и у здоровых людей (контрольная группа). Причем лактат у здоровых людей вызывает такие же изменения в соотношении субпопуляций моноцитов, как и у больных РП, но с особенностями фагоцитарной активности. В то же время реакция моноцитов здоровых людей на АДФ и глутамат значительно отличается от выявленной у больных РП. Различия и сходство в реакциях моноцитов на метаболиты у больных РП и здоровых людей могут определяться тем, что механизм действия лактата реализуется и на эпигеномном уровне, тогда как АДФ и глутамат регуляторное воздействие осуществляют через рецепторы и на внутриклеточный метаболизм (Асадуллина И.А. и соавт., 2017; Bhagat T.D. et al., 2019; Guerra L. et al., 2020; Romero-García S. et al., 2016).

Таким образом, у больных РП увеличено содержание классических моноцитов, функциональная активность которых характеризуется сниженным количеством клеток, вовлеченных в процесс фагоцитоза, но с повышенным значением ФЧ. Фракции промежуточных и неклассических моноцитов у больных также характеризуются пониженными уровнями клеток, вовлеченных в фагоцитоз. Инкубация с лактатом, АДФ и глутаматом вызывает однотипные изменения соотношения субпопуляций моноцитов у больных РП (повышение уровня классических и снижение содержания фракции промежуточных моноцитов), но различные со стороны их фагоцитарной активности. Повышение доли менее зрелых моноцитов при онкологическом заболевании может стимулировать их дифференцировку в незрелые (толерогенные) ДК. У здоровых людей только при воздействии лактата выявляются изменения субпопуляционного состава моноцитов, соответствующие выявленному у больных РП, но с увеличением количества промежуточных моноцитов, вступающих в фагоцитоз. Реакции моноцитов на метаболиты *in vitro* характеризуют наличие дистанционного метаболитического воздействия опухоли на клетки крови, что необходимо учитывать при разработке новых иммунотерапевтических методов. Соответственно, для получения моноцитов с более высокой функциональной активностью для осуществления на их

основе различных медицинских технологий (например, для разработки дендритноклеточных вакцин) необходим этап метаболической стимуляции, который должен осуществляться персонифицированно, с учетом исходных нарушений метаболизма клеток.

ДК являются профессиональными АПК, играющими центральную роль в поддержании врожденного иммунитета. Благодаря высокой экспрессии МНС антигенов I и II класса, костимуляторных молекул (CD80, CD86) и продукции широкого спектра цитокинов и хемокинов ДК обладают способностью активировать наивные Т-клетки и индуцировать антигенспецифический иммунный ответ (Савченко А.А. и соавт., 2019; Ghasemi M. et al., 2023). Наряду со способностью индуцировать активацию иммунокомпетентных клеток ДК могут также ингибировать иммунный ответ. Толерогенные/супрессорные свойства ДК обусловлены различными механизмами, в том числе способностью ДК экспрессировать коингибиторные молекулы и рецепторы (B7-H1, ILT-2, ILT-3, ILT-4, CD209, CD200R и HLA-G), продуцировать иммуносупрессивные цитокины (IL-10, TGF- β) и индуцировать генерацию регуляторных Т-клеток (Bourque J., Hawiger D., 2023; Iberg C.A., Hawiger D., 2020). Недавние исследования также показали, что ДК могут подавлять пролиферацию и оказывать непосредственный цитотоксический эффект на клетки опухолевых линий (Cheng X.Y., Li J.L., 2015). Противоопухолевая активность ДК опосредуется с участием различных молекул семейства фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α , lymphotoxin- α 1 β 2, FasL, TRAIL), а также перфорина и/или гранзима и имеет, по-видимому, большое значение, поскольку высвобождающиеся опухолевые антигены могут сразу же презентироваться ДК Т-лимфоцитам, обеспечивая запуск специфического иммунного ответа (Савченко А.А. и соавт., 2018; Marmonti E. et al., 2022).

Изменения в количественном содержании и функциональной активности ДК выявлены при многих заболеваниях (Савченко А.А. и соавт., 2018; Li J. et al., 2023; Zhang J. et al., 2023). При этом снижение антигенпрезентирующей активности ДК рассматривается в качестве возможного механизма персистенции вирусной и бактериальной инфекции, а также ускользания опухоли от иммунного надзора (Mulherkar T.H. et al., 2022; Wang Y. et al., 2022), тогда как нарушение толерогенных свойств ДК при гестации чревато угрозой преждевременного прерывания беременности (Gulic T. et al., 2023; Silalahi E.R. et al., 2022).

Способность ДК индуцировать антигенспецифичный иммунный ответ и цитотоксическую активность Т-лимфоцитов сделали эти клетки привлекательными кандидатами для иммунотерапии онкологических и инфекционных заболеваний. Действительно, исследования на животных и клинические испытания на человеке показали, что вакцинация миелоидными ДК, презентующими вирусные или опухолевые антигены, приводит к индукции специфического иммунного ответа, что сопровождается положительным клиническим эффектом (Jeng L.V. et al., 2022; Morisaki T. et al., 2022). С другой стороны, толерогенные

ДК представляют интерес в плане лечения аутоиммунных заболеваний, патологии беременности и трансплантации органов и тканей (Fu W. et al., 2021; Shima T. et al., 2020).

Изучению ДК и их клинической апробации во многом способствовала разработка методов генерации ДК *in vitro*. При этом выяснилось, что условия культивирования существенно влияют на свойства генерируемых ДК (Hopewell EL, Cox C., 2020; Kolostova K. et al. 2020). Традиционно ДК получают путем культивирования прилипающей фракции моноклеарных клеток (МНК) в присутствии двух ключевых цитокинов — GM-CSF и IL-4 (Hilkens C.M.U. et al., 2023; Sanseverino I. et al., 2023). Генерируемые таким образом незрелые миелоидные ДК (ИЛ4-ДК) обладают высокой способностью к захвату антигена, но слабой способностью активировать Т-клетки. Дальнейшее культивирование ДК в присутствии TNF- α , IL-1, LPS, CD40-лиганда или коктейля «дозревающих» стимулов ведет к созреванию ДК и повышению их способности стимулировать Т-клеточный ответ (Villar J. et al., 2023). Однако генерируемые *in vitro* ИЛ4-ДК обладают низкой миграционной активностью и в условиях дефицита ростовых факторов могут подвергаться обратной трансформации в моноциты.

Наряду с традиционным протоколом Santini S.M. и соавт. (2011) продемонстрировали, что частично зрелые ДК можно генерировать при замене IL-4 интерфероном- α (Santini S.M. et al., 2011). Интерферон- α , индуцированные ДК (IFN-ДК), генерируются быстрее по времени, обладают высокой поглотительной активностью, сохраняют стабильность в отсутствие цитокинов и превосходят ИЛ4-ДК по миграционной активности, способности стимулировать CD8+ Т-лимфоциты. Кроме того, IFN-ДК индуцируют более сбалансированный иммунный ответ, поскольку наряду с выраженной Th1-стимулирующей способностью обладают способностью умеренно стимулировать активность Th2-клеток (Liu P. et al., 2022). Учитывая также, что интерфероны способны усиливать цитотоксический потенциал ДК и IFN-ДК, по некоторым данным, могут обладать более выраженной цитотоксической активностью, применение этого типа ДК при опухолевых и вирусных заболеваниях представляется весьма перспективным.

В связи с этим разработана технология производства дендритной вакцины и метода оценки ее противоопухолевой активности, что определяется необходимостью улучшения эффективности лечения онкологических больных и повышения уровня их выживаемости и улучшения качества жизни.

Моноциты периферической крови получали стандартным методом адгезии к плоским поверхностям из моноклеарных клеток, выделенных из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина (Савченко А.А. и соавт., 2021). Выделенные моноциты помещали в среду RPMI-1640, содержащую 10% аутологичной сыворотки и провоспалительные цитокины — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) 50–200 нг/мл и интерферон- α (IFN- α) 100–2000 ед/мл.

Для получения незрелых ДК (НДК) моноциты инкубировали 5 сут. Для получения активированных (зрелых) ДК (АДК) на 5-е сутки в среду инкубации вносили фактор некроза опухоли- α (TNF- α) 5–50 нг/мл и лизат опухолевого материала. Инкубацию осуществляли 2 сут. Фенотипирование клеток проводилось методом пятицветной проточной цитометрии на цитофлюориметре FC-500 (Beckman Coulter, USA), используя меченые FITC анти-CD83, меченые PE анти-CD86, меченые ECD анти-CD80, меченые PC5 анти-CD45, меченые PC7 анти-CD14 (Beckman Coulter, USA).

С целью определения нарушения внутриклеточных обменных процессов и выделения «контрольных точек» метаболизма ДК у больных онкологическими заболеваниями было проведено биолюминесцентное исследование активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ. Данными методами определяли активности следующих оксидоредуктаз: Г6ФДГ, Г3ФДГ, ЛДГ и НАДН-ЛДГ, МДГ и НАДН-МДГ, НАДФМДГ, НАДФГДГ и НАДФН-ГДГ, НАДГДГ и НАДН-ГДГ, НАДИЦДГ, НАДФИЦДГ и ГР (Савченко А.А., 1991, 2015). Для этого суспензию моноцитов или ДК, содержащую клетки в количестве 1 млн/мл, после однократного замораживания–размораживания дополнительно разрушали путем осмотического лизиса при добавлении дистиллированной воды (1:5 по объему). В 150 мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат и кофактор, вносили 50 мкл суспензии лизированных клеток. После инкубации исследуемых проб при 37 °С в течение 30 мин (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)+) или 5 мин (для реакций с окислением НАДФН) к 200 мкл инкубационной смеси добавляли 50 мкл ФМН в концентрации $1,5 \times 10^{-5}$ М, 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида и 10 мкл ферментативной системы НАДФН:ФМНоксидоредуктаза-люцифераза. После смешивания биолюминесцентных реактивов и инкубационной пробы с помощью хемибиолюминесцентного анализатора БЛМ-3607 (ООО «МедБиоТех», г. Красноярск) производили измерение свечения. Ферментативная система НАДФН:ФМНоксидоредуктаза-люцифераза изготовлена из очищенных методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации люциферазы из *Photobacterium leiognathi* и оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* в Институте биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН г. Красноярска. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 104 клеток, где 1 Е = 1 мкмоль/мин.

Оптимальной концентрацией для получения НДК у лиц контрольной группы и больных РП было ГМ-КСФ 100 нг/мл и IFN- α 1000 ед/мл. Оптимальной концентрацией TNF- α при активации НДК и получения АДК было 20 нг/мл. Количество CD14–CD80–CD83+CD86+–клеток положительно взаимосвязано с концентрацией ГМ-КСФ ($r = 0,45$, $p = 0,047$). Количество CD14–CD80+CD83+CD86––клеток положительно взаимосвязано с концентрацией TNF- α ($r = 0,43$, $p = 0,046$). Для оптимальной дифференцировки моноцитов в НДК и АДК оптимальной концентрацией в инкубационной среде явилось содержание глутамата 125,2 мкМ и глицерола-3-фосфата — 18,7 мкМ. При данных

концентрациях цитокинов и субстратов выход НДК у лиц контрольной группы составил 40,5–62,7%, АДК — 90,0–98,7%. Для больных ПКР: НДК — 34,3–51,9%, АДК — 84,4–92,6%.

Характеризуя состояние метаболических реакций в ДК, можно отметить, что Г6ФДГ является ключевым и инициализирующим ферментом пентозофосфатного цикла, от активности которого зависит синтез широкого спектра макромолекул, необходимых для жизнедеятельности клетки (Савченко А.А. и соавт., 2014; Смирнова О.В. и соавт., 2008; Pes G.M., Dore M.P., 2022). Соответственно, снижение активности данного фермента в НДК определяет пониженную интенсивность наработки интермедиатов для реакций макромолекулярного синтеза. Другим ферментом, ответственным за анаболические процессы, является НАДФМДГ, который характеризует интенсивность реакций липидного анаболизма (Куртасова Л.М. и соавт., 2001; Ratledge C., 2014). Активность данного фермента также снижена в НДК. Реакции, катализируемые Г6ФДГ и НАДФМДГ, тесно связаны по коферменту с ГР, которая в глутатион-зависимой антиоксидантной системе осуществляет реакцию восстановления окисленного глутатиона (Куртасова Л.М. и соавт., 2006; Eweas A.F., Allam G., 2018). Соответственно, снижение содержания восстановленного кофермента приводит к снижению активности ГР в НДК.

Необходимо отметить, что Г6ФДГ также участвует в перераспределении потока глюкозо-6-фосфата с энергетических нужд клетки на пластические процессы (Куртасова Л.М. и соавт., 2002; Smirnova O.V. et al., 2011). В связи с этим можно предположить активацию субстратного потока по гликолизу. Однако в НДК активность терминальной реакции анаэробного гликолиза (НАДН-ЛДГ) также понижается. Следовательно, можно констатировать, что состояние анаэробного дыхания в незрелых ДК понижено.

Моноциты и ДК являются клетками, в которых энергетические процессы реализуются не только за счет анаэробного дыхания в цитоплазматическом компартменте, но и за счет аэробных процессов в митохондриальном компартменте (Møller S.H. et al., 2022; Palmer C.S. et al., 2016). Ключевым в системе аэробного дыхания является цикл трикарбоновых кислот — амфиболический процесс, в котором не только осуществляются окислительные превращения энергетических субстратов до конечных продуктов (CO_2 и H_2O), но и происходит образование субстратов для других метаболических путей (Куртасова Л.М. и соавт., 2003; Arnold P.K., Finley L.W.S., 2023). Одним из регуляторных ферментов цикла Кребса является НАДИЦДГ. Активность данного фермента в НДК снижена, что определяет накопление изоцитрата в митохондриальном компартменте, ингибирование цитратсинтазы и, соответственно, понижение интенсивности субстратного потока на начальном этапе лимонного цикла. НАДФИЦДГ определяется как вспомогательный фермент цикла трикарбоновых кислот, активность которого может привести к снижению уровня изоцитрата, снижению ингибирования

цитратсинтазы и активации субстратного потока по циклу (Куртасова Л.М. и соавт., 2003; Савченко А.А., Смирнова С.В., 2001). Однако в НДК активность этого фермента также снижена. Можно предположить, что ингибирование реакций начального этапа лимонного цикла может определяться недостаточным количеством субстратов, поступающих в митохондрии из цитоплазматического компартмента. Действительно, в НДК выявлена низкая интенсивность терминальных реакций гликолиза. Кроме того, обнаружено, что активность аэробной реакции ЛДГ, осуществляющей окисление лактата до пирувата, в НДК лиц контрольной группы также снижена.

Интенсивность митохондриального дыхания во многом зависит от малат-аспартатного шунта, который осуществляет перенос водорода в митохондрию и регенерацию цитоплазматического НАД⁺ из НАДН. Ключевую реакцию данной челночной системы катализирует НАДН-МДГ, активность которой в НДК снижена. Следовательно, ингибирование субстратного потока на начальных этапах цикла трикарбоновых кислот и пониженная интенсивность малат-аспартатного шунта митохондрий определяют сниженный уровень аэробного дыхания НДК.

Амфиболическое значение цикла Кребса определяется, в частности, работой интермедиатов для реакций аминокислотного обмена, отток которых с цикла осуществляют НАДН-ГДГ и НАДФН-ГДГ (Куртасова Л.М. и соавт., 2013; Савченко А.А., 1991; Zeng Q., Sang Y.M., 2023). В НДК активность обеих глутаматдегидрогеназ снижена, что характеризует низкий уровень оттока субстратов на реакции аминокислотного обмена. Можно предположить, что недостаточность субстратного стимулирования реакций аминокислотного обмена связана с низким уровнем субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот.

Состояние ряда основных метаболических процессов в АДК во многом соответствует представленному выше для НДК. В первую очередь это касается уровня энергетических процессов. Низкая активность НАДИЦДГ, НАДФИЦДГ и НАДН-МДГ в АДК также характеризует низкую активность субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот и, соответственно, пониженную интенсивность аэробного дыхания. Однако состояние реакций, реализующих амфиболическое значение лимонного цикла, в АДК другое. Так, только в АДК понижена активность НАДГДГ и НАДФГДГ, которые осуществляют перенос продуктов аминокислотного обмена на реакции цикла Кребса. В связи с тем, что в АДК также снижена и НАДН-ГДГ, можно констатировать, что реакции взаимосвязи между энергетическими процессами и обмена аминокислот понижены. По-видимому, это определяется как низким субстратным потоком по лимонному циклу, так и пониженным уровнем реакций аминокислотного обмена.

Таким образом, метаболизм ДК лиц контрольной группы характеризуется снижением активности дегидрогеназных реакций, определяющих уровень анаэробной и аэробной биоэнергетики. В АДК более выражены понижение активности вспомогательных дегидрогеназных реакций лимонного цикла и нарушение механизмов взаимодействия между циклом трикарбоновых кислот и реакциями

аминокислотного обмена. При этом в АДК снижение уровня анаэробного окисления глюкозы взаимосвязано с понижением уровня переноса субстратов с реакций липидного катаболизма. В то же время в НДК снижение интенсивности терминальных реакций гликолиза развивается на фоне понижения оттока субстратов на реакции пентозофосфатного цикла. По-видимому, за счет снижения уровня наработки НАДФН в пентозофосфатном цикле в НДК и наблюдается ингибирование ГР — фермента глутатионзависимой антиоксидантной системы. В ДК понижается активность ключевой реакции липидного анаболизма. В целом можно заключить, что если в НДК снижение энергетических процессов проявляется на фоне понижения и уровня пластических реакций, то в АДК ингибирование энергетических процессов в большей степени зависит от механизмов нарушения взаимосвязи реакций аминокислотного обмена с циклом Кребса.

Анализ уровней НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ ДК у больных ПКР позволяет отметить, что независимое от степени зрелости ДК снижение активности Г6ФДГ (ключевого и инициализирующего фермента пентозофосфатного цикла) может привести к ингибированию широкого спектра реакций макромолекулярного синтеза. Сниженный уровень пластических процессов ДК у больных ПКР также определяется низкой активностью НАДФМДГ. При этом обнаруженное понижение активности Г3ФДГ характеризует сниженный уровень реакций липидного катаболизма. Известно, что Г3ФДГ является ферментом, активность которого определяет перенос продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза (Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998; Савченко А.А. и соавт., 2010). Следовательно, в ДК больных ПКР выявляется низкая активность реакций липидного метаболизма. Необходимо отметить, что низкая активность Г6ФДГ в ДК выявляется на фоне повышения уровня ГР — фермента глутатион-зависимой антиоксидантной системы. Можно предположить, что в клетках повышается интенсивность перекисных процессов, следствием чего и является активация ГР. По-видимому, даже на фоне ингибирования ряда исследуемых НАДФ-зависимых дегидрогеназ в цитоплазматическом компартменте достаточно НАДФН для восстановления глутатиона. При пониженных уровнях оттока субстратов на пентозофосфатный цикл и притока с реакций липидного катаболизма, исходя из уровней активности НАДН-ЛДГ, интенсивность терминальных реакций анаэробного гликолиза снижена только в АДК.

Исследование активности ферментов митохондриального компартмента позволило установить значительные различия в реакциях, обеспечивающих аэробное дыхание ДК в зависимости от степени зрелости. Так, установлено, что в НДК высокий уровень МДГ характеризует активацию субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот. При этом высокая активность НАДН-ГДГ и НАДФН-ГДГ отражает и интенсификацию оттока субстратов на реакции аминокислотного обмена. Однако со стороны вспомогательных дегидрогеназных реакций в НДК выявляются разнонаправленные изменения активности. В то же время

в АДК выявляется снижение активности МДГ, сопровождающееся значительным ингибированием НАДФИЦДГ и НАДГДГ.

Таким образом, состояние метаболических процессов в ДК разной степени зрелости у больных ПКР значительно различается по реакциям, характеризующим интенсивность анаэробного и аэробного дыхания. В НДК при сохранении уровней терминальных реакций анаэробного гликолиза установлено повышение интенсивности субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот, но при разнонаправленном изменении активности вспомогательных дегидрогеназных реакций и оттоке субстратов на реакции аминокислотного обмена. В АДК установлено снижение активности дегидрогеназ, характеризующих состояние анаэробного гликолиза и субстратного потока по лимонному циклу. Независимо от степени зрелости ДК наблюдается ингибирование реакций пластического обмена. При стимуляции метаболических процессов ДК (как пластических, так и энергетических) повышается их функциональная активность, что в конечном случае определяет более высокий уровень противоопухолевой активности дендритноклеточной вакцины при реализации данной медицинской технологии.

Соответственно, при оптимизации производства *in vitro* и применения CAR Т-лимфоцитов для лечения онкологических заболеваний также необходимо использование механизмов метаболической модуляции. Как уже было определено выше, значительным критическим препятствием для использования CAR Т-терапии при лечении солидных опухолей является враждебное микроокружение опухоли (Peng J.J. et al., 2023; Sterner R.C., Sterner R.M., 2021). В целом к настоящему времени определено множество иммуносупрессивных механизмов, налагаемых опухолевыми клетками, что приводит к подавлению пролиферации, выживания и эффекторных функций Т-клеток (включая метаболические нарушения в ТМЕ). Таким образом, рациональная и эффективная иммунотерапия на основе CAR Т-клеток должна включать новые стратегии, которые улучшают метаболическую приспособленность Т-лимфоцитов для преодоления метаболических стрессов, вызванных ТМЕ.

Стандартный процесс производства CAR Т-клеток начинается с получения мононуклеарных клеток периферической крови пациента (PBMC) посредством лейкофереза с последующим обогащением Т-клеток, активацией и модификацией генов вирусными или невирусными методами (Lalu M.M. et al., 2023; Pensato U. et al., 2023). Эти генетически модифицированные Т-клетки размножаются до количества, необходимого для терапии, а затем криоконсервируются и/или сразу вводятся пациенту (рис. 145). Производство CAR Т-клеток требует контроля качества на протяжении всего процесса и регулируется правилами надлежащей производственной практики (GMP) (Kaiser A.D. et al., 2015; Levine B.L. et al., 2016; Wang X., Rivière I., 2016). Предполагается использовать следующие метаболические стратегии для оптимизации производственного процесса и достижения максимального уровня терапевтической эффективности CAR Т-клеток.

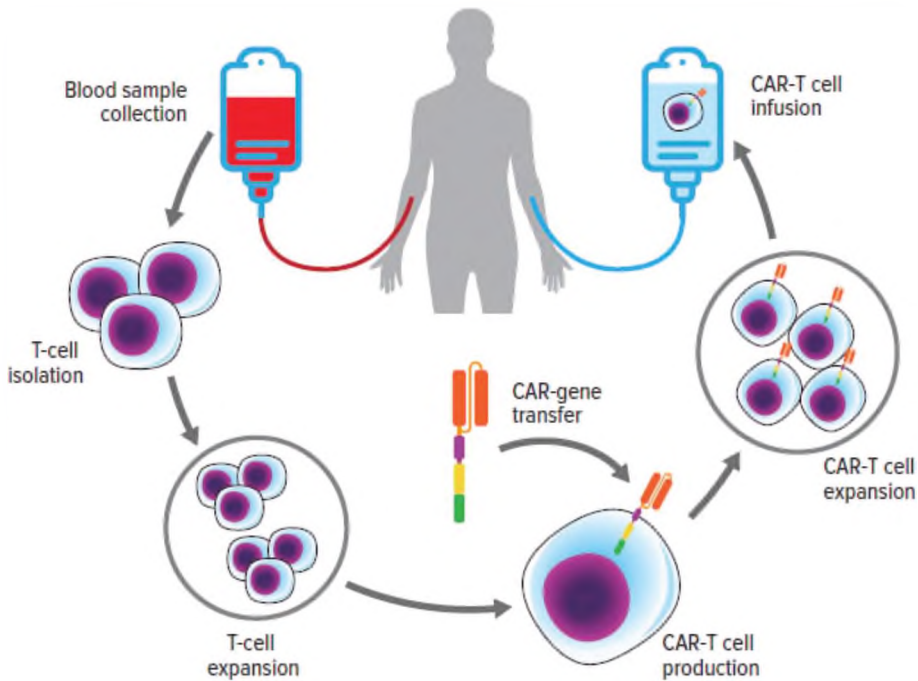


Рис. 145. Схема технологии производства химерного рецептора антигена Т-лимфоцитов

(Guerra E. et al., 2021)

CAR T-лимфоциты создаются путем объединения антигенсвязывающей области MAT с ключевыми внутриклеточными сигнальными доменами (Daei Sorkhabi A. et al., 2023; Poorebrahim M. et al., 2021). Он состоит из внеклеточного нацеливающего домена, распознающего опухолеспецифический антиген, который происходит из одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) переменной области тяжелой и переменной области легкой цепи из специфического моноклонального антитела (рис. 146). Нацеливающий домен позволяет CAR T-клеткам распознавать и связываться с антигеном, представленным раковыми клетками. Внутриклеточный сигнальный домен обычно происходит от субъединицы передачи сигнала костимулирующих рецепторов, таких как 4-1BB (CD137 — белок-рецептор надсемейства рецепторов TNF, кодируется геном TNFRSF9) и CD28, которые передают сигнал связывания внеклеточного лиганда в CAR T-клетки для активации нижестоящих сигнальных каскадов (Xu X. et al., 2019).

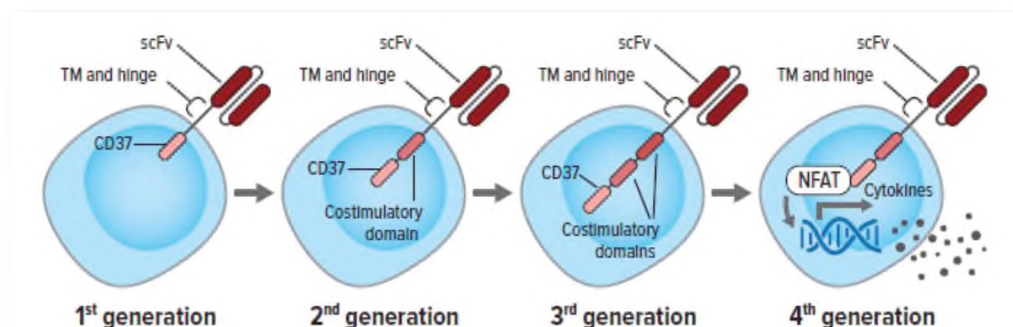


Рис. 146. Структура химерного рецептора антигена в CAR T-клетках
(Poorebrahim M. et al., 2021)

Оптимальная активация, перенос генов и условия культивирования необходимы для обеспечения необходимого количества и качества клеток для CAR-T-клеточной терапии. Из-за персонализированного характера терапии степень амплификации, дифференцировка и функциональная активация клеток могут иметь значительные индивидуальные особенности. Специально подобранный питательный состав для сред для культивирования клеток может значительно улучшить надежность и воспроизводимость клеточной экспансии. CAR T-клетки с костимулирующим доменом 4-1BB демонстрируют более высокую митохондриальную метаболическую активность, чем клетки с костимулирующим доменом CD28 (Kawalekar O.U. et al., 2016; Xu X. et al., 2019). Соответственно, митохондриальные характеристики, включая биогенез и мембранный потенциал, были предложены в качестве ключевых индикаторов метаболической приспособленности и эффекторной функции данных T-клеток (Amitrano A.M., Kim M., 2023; Sukumar M. et al., 2016). Усиление митохондриального биогенеза с помощью фармакологических, генетических или метаболических подходов значительно улучшает противоопухолевую активность T-клеток *in vivo* (Rad S.M.A.H. et al., 2022; Simula L. et al., 2022; Teijeira A. et al., 2018). С перспективой на будущее можно предложить разработку оригинального состава питательных сред, адаптированных к метаболическим предпочтениям CAR T-клеток с различными костимулирующими доменами.

Реакция иммунных клеток на изменения в метаболическом микроокружении опухоли представляет собой механизм «метаболической контрольной точки», который координирует внутриклеточный метаболический статус с клеточной сигнализацией и, соответственно, определяет уровень функциональной активности клеток иммунной системы (Amitrano A.M., Kim M., 2023; Chen X. et al., 2023; Wang R., Green D.R., 2012). Сигнальные киназы и факторы транскрипции, например такие, как AMPK (AMP-activated protein kinase) и HIF1 α (Hypoxia inducible factor 1 α), перепрограммируют метаболизм T- и B-лимфоцитов для модуляции их функции и опосредуют механизмы адаптивного иммунитета. Так, в

исследовании Shi L.Z. et al. (2011) было показано, что зависимость от HIF1 α активность гликолиза более выражено повышается в Th17-клетках, чем в Treg. При абляции HIF1 α или фармакологическом ингибировании гликолиза реципрокно уменьшаются количество и функциональная активность Th17-клеток, но индуцируется дифференцировка Treg. Таким образом, отредактированные программы передачи сигналов и транскрипции могут обеспечить участие точно настроенных метаболических процессов для поддержки пролиферации Т-клеток, связанной как с эффекторными функциями, так и с формированием клеток памяти.

Иммуносупрессивное ТМЕ является одним из критических барьеров для успешного лечения с помощью CAR Т-лимфоцитов. Во время опухолевой прогрессии и в результате повышенного гликолитического метаболизма раковых клеток солидные опухоли подвержены истощению питательных веществ, ацидозу и гипоксии из-за aberrантной васкуляризации. Поскольку гипоксия является ключевым аспектом ТМЕ, нацеливание на гипоксию может быть важной стратегией для продвижения терапии онкологических заболеваний CAR-Т-клетками. Гипоксия индуцирует стабилизацию фактора транскрипции HIF-1 α , который регулирует метаболизм и функцию Т-клеток (Chen X. et al., 2023; Shi L.Z. et al., 2011). В исследовании Juillerat A. et al. (2017) продемонстрированы методические подходы, включающие формирование HIF1 α -чувствительных CAR Т-клеток, способных реагировать на гипоксию, проявляя выраженную цитолитическую активность.

CAR Т-лимфоциты, экспрессирующие разные костимулирующие домены, демонстрируют разные метаболические характеристики, которые в свою очередь влияют на фенотипы Т-клеток памяти. CAR Т-клетки демонстрируют усиленный митохондриальный биогенез, что определяется фенотипами центральной памяти. Включение CD28 ζ в структуру CAR способствует дифференцировке эффекторной памяти и приводит к усилению аэробного гликолиза в CAR Т-клетках (Kawalekar O.U. et al., 2016). В дополнение к подходу инженерии структуры CAR состав цитокинов может быть оптимизирован для модуляции метаболических программ и стимулирования фенотипа Т-клеток центральной памяти, который связан с повышенной персистенцией CAR Т-клеток и противоопухолевым иммунитетом *in vivo* (Gargett T., Brown M.P., 2015). Т-клетки, активированные анти-CD3/CD28-антителом, с последующей экспансией в присутствии IL-15 и IL-7, также демонстрируют повышенную продукцию IFN γ , TNF α и IL-2, а также цитолитическую активность против клеток-мишеней, экспрессирующих CAR-специфический антиген (Gomez-Eerland R. et al., 2014). Было высказано предположение, что IL-15 способствует повышению резервной дыхательной способности (количество дополнительного АТФ, которое может быть произведено окислительным фосфорилированием в случае внезапного увеличения потребности в энергии) и интенсивности β -окисления жирных кислот за счет активации карнитин-пальмитоилтрансферазы.

Оптимизация питания растворов консервантов является важным фактором для обеспечения успешной реперфузии и терапии CAR T-клетками. Соответственно, питательный состав должен иметь факторы для регенерации АТФ, буферные ионы и удалять свободные радикалы в CAR T-клетках в течение периода хранения. Любое несоответствие между питательными составами, используемыми для хранения, и составами, используемыми для манипуляций с клетками *ex vivo*, потенциально может сделать CAR T-лимфоциты более восприимчивыми к повреждению при хранении.

Способность к клеточной пролиферации и персистенции CAR T-клеток в ТМЕ является лучшим предиктором клинической эффективности терапии. Вводимые метаболиты могут преодолеть ингибирующую эффекторные клетки микросреду и позволить CAR T-клеткам выживать и пролиферировать, обеспечивая оптимальное соотношение «эффектор–мишень» для удаления опухоли *in vivo*. Например, L-аргинин считается условно незаменимой аминокислотой, и его добавление усиливает противоопухолевый ответ адоптивно перенесенных T-клеток (Geiger R. et al., 2016).

Генетические и ферментативные подходы, которые позволяют превращать иммуносупрессивные метаболиты либо в инертные соединения, либо в провоспалительные соединения, являются многообещающими стратегиями перепрограммирования метаболического ТМЕ. Например, лактат, накопленный в ТМЕ, является продуктом жизнедеятельности раковых клеток, ингибирующим противоопухолевую активность эффекторных клеток иммунной системы (Wang Z. et al., 2023; Zhao S. et al., 2023). Однако известно, что лактат является ключевым источником углерода *in vivo* (цикл Кори) и может окисляться в митохондриях с выработкой энергии и питанием катаплеротических процессов цикла ЦТК (Савченко А.А., Борисов А.Г., 2012; Soeters P.B. et al., 2021). В исследовании Но Р.С. et al. (2015) было показано, что форсированная экспрессия фосфоенолпируваткарбоксихиназы 1 [(ПСК1), phosphoenolpyruvate carboxykinase 1], которая стимулирует глюконеогенез из лактата и, таким образом, облегчает стресс от ограничения глюкозы в ТМЕ, усиливает противоопухолевый T-клеточный ответ у экспериментальных животных. Кроме того, можно предположить, что измененный поток лактата за счет усиления экспрессии аэробной изоформы ЛДГ может сделать T-клетки способными метаболизировать данный субстрат и, соответственно, улучшать метаболическую приспособляемость CAR T-клеток в ТМЕ. Транспортёры нуклеозидов могут быстро удалять аденозин из внеклеточного нуклеозидного пула и направлять для поддержки синтеза РНК/ДНК. В связи с этим показано, что экспрессия транспортёров нуклеозидов с высоким сродством может отвлекать аденозин от формирования иммуносупрессивной пуриnergической сигнальной реакции, стимулируя пролиферацию T-лимфоцитов (Mullen N.J., Singh P.K., 2023; Pastor-Anglada M., Pérez-Torras S., 2018). Точно так же генетические стратегии, которые усиливают экспрессию и аффинность

транспорта ключевых доноров углерода и азота (прежде всего глюкозы и глутамина), могут давать избирательное преимущество Т-клеткам над опухолевыми клетками в ТМЕ.

В настоящее время разработан широкий спектр клеточных технологий, применяемых при лечении различных заболеваний. Использование механизмов модуляции клеточного метаболизма позволяет не только достичь необходимого уровня функциональной активности вводимых пациенту клеток, но и оптимизировать их жизнедеятельность и проявление функциональной активности в организме. Необходимо продолжать расшифровывать регуляторно-ферментативные механизмы основных метаболических путей, анализируя интенсивность субстратных потоков и оценивая последствия метаболического вмешательства в эти пути при реализации клеточных технологий. Таким образом, понимание того, как контроль над метаболическими путями (или с их помощью) клеток иммунной системы влияет на иммунный ответ, необходимо для избирательного усиления метаболической приспособленности эффекторных клеток и повышения метаболической уязвимости иммуносупрессивных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Имунопатологические состояния формируются за счет нарушения функционирования иммунной системы, от недостаточности реагирования на микроорганизмы до избыточного реагирования на эндогенные и экзогенные антигены, которые проявляются развитием различных заболеваний. Заболевания, связанные с нарушениями функции иммунной системы, во всем мире стабильно занимают первое место. Это бактериальные, вирусные, грибковые инфекции, онкологические, аллергические и аутоиммунные болезни; вялотекущие, рецидивирующие инфекционно-воспалительные заболевания дыхательного, желудочно-кишечного и урогенитального трактов, кожи и мягких тканей.

В основе развития иммунопатологических состояний и, как следствие, развития заболеваний ведущее значение принадлежит метаболическим процессам в клетках иммунной системы. Основные метаболические пути являются общими для большинства клеток организма и включают в себя три взаимосвязанных между собой процесса:

1) распад органических веществ (углеводы, жиры, белки) с аккумуляцией энергии — энергетическое звено;

2) синтез мономеров и макромолекул (с затратой энергии), в том числе функциональных молекул (цитокины, гормоны и т.д.), белков (включая ферменты), кофакторов и пр. — пластическое звено;

3) процесс обезвреживания и выведения токсичных продуктов, полученных в результате обмена веществ (продукты метаболизма), в том числе свободных радикалов — звено утилизации.

Многочисленные клинические наблюдения и эксперименты на животных моделях *in vivo* и клеточных системах *in vitro* показали, что метаболизм и иммунитет неразрывно переплетены. Исследования в этой области ускорились за последние два десятилетия. Становится все более очевидным, что метаболическое состояние клеток является критическим фактором, определяющим иммунную функцию. Функциональная активность клеток как врожденной, так и адаптивной иммунной системы зависит от метаболизма, что в конечном счете определяет направленность как местных, так и системных реакций иммунитета.

Все это требует развития технологий по диагностике иммунометаболических нарушений и их коррекции.

Учитывая, что основными переносчиками электронов в клетке являются пиридиновые нуклеотиды (коферменты дегидрогеназ) оксидоредуктазы, которые активно участвуют в биоэнергетических процессах и координации сопряженных метаболических потоков и в значительной степени обуславливают адаптивные изменения внутриклеточного обмена веществ, мы сосредоточили

свои исследования на изучении именно этих параметров метаболизма клеток иммунной системы.

Активность ферментов в клетках иммунной системы может быть исследована широким спектром аналитических методов. Однако наиболее перспективными являются методы, реализуемые с помощью люминесцентного анализа. С учетом этого нами был разработан и сертифицирован метод биолюминесцентного анализа. Биолюминесценция — процесс свечения живых организмов, связанный с процессами их жизнедеятельности. В основе лежит катализируемая специфическим ферментом реакция светоизлучения — механизм реакций, сопровождающихся выделением квантов света за счет окисления низкомолекулярного субстрата, называемого люциферинном, в присутствии фермента люциферазы. Это высокочувствительный метод, позволяющий определять концентрацию различных метаболитов и широкий спектр ферментов, характеризующих самые разные метаболические процессы.

В течение почти 30 лет проведены комплексные исследования, доказывающие, что при различных иммунопатологических состояниях значительно изменяются метаболические параметры клеток иммунной системы. Так, например, уже на I стадии НМРЛ обнаружено ингибирование анаэробных и аэробных энергетических процессов при снижении активности дегидрогеназных реакций, определяющих состояние пластических и анаболических процессов. На II стадии заболевания выявляется восстановление интенсивности анаэробного окисления глюкозы при выраженных нарушениях метаболического состояния митохондриального компартмента лимфоцитов крови (повышенная активность НАДИЦДГ и ингибирование МДГ). В лимфоцитах крови больных с III стадией заболевания сохраняется снижение активности ключевой реакции липидного анаболизма, но при восстановлении активности Г6ФДГ и интенсивности гликолиза. При этом выявленные уровни активности метаболических ферментов митохондриального компартмента лимфоцитов позволяют предположить снижение интенсивности аэробных дыхательных процессов. На IV стадии НМРЛ восстанавливается уровень метаболических реакций, определяющих интенсивность пластических и анаболических процессов, но при выраженном снижении активности анаэробного окисления глюкозы и аэробных процессов. При исследовании активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ у больных раком легкого в зависимости от гистологического типа опухоли обнаружено, что состояние метаболизма лимфоцитов крови у больных МРЛ значительно отличается от интенсивности обменных процессов при ПКР и аденокарциномой. При этом независимо от гистологического типа опухоли у больных раком легкого снижается интенсивность анаэробных и аэробных процессов в лимфоцитах. Особенностью состояния метаболизма лимфоцитов у больных аденокарциномой является снижение уровня ключевой и инициализирующей реакции пентозофосфатного цикла и повышение активности глутатион-зависимой антиоксидантной системы.

В лимфоцитах регионарных лимфоузлов при мелкоклеточном раке легкого значительно повышены активность пластических процессов, катаболических реакций липидного обмена и уровень анаэробных и аэробных реакций. При сравнении уровней активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов лимфоузлов корня легкого у больных с различным гистологическим вариантом НМРЛ выявлены менее значительные различия, они выражаются в снижении интенсивности гликолиза и аэробных реакций при аденокарциноме по сравнению с ПКР.

Значительные иммунометаболические изменения определяются и при вирусных инфекциях. Мы считаем, что вторичное иммунодефицитное состояние характеризуется не только и не столько снижением количества Т- и В-клеток и нарушением соотношения их субпопуляций, сколько функциональной несостоятельностью лимфоцитов. В «микропатогенезе» герпетической инфекции на клеточном уровне важное место занимает патологическое действие, которое оказывает весь процесс вирусной репродукции на клеточные мембраны, в том числе цитоплазматические и митохондриальные; при этом меняется проницаемость мембран, а вследствие этого — и транспорт веществ, регулирующих определенные звенья метаболизма. Поскольку митохондрии обладают собственной ДНК и зависимой от нее системой синтеза РНК, они имеют все необходимое для автономного биосинтеза белка. Вполне естественно, что этот биосинтез, в нормальных условиях полностью согласованный с функцией клеточного генома, при систематическом нарушении функции митохондриальных мембран резко меняется и может служить источником патологических продуктов, репрессирующих или депрессирующих метаболические процессы, ингибируя функциональную активность клеток иммунной системы. Например, у лиц с РГВИ при ремиссии заболевания в лимфоцитах периферической крови снижаются интенсивность гликолиза, интенсивность субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот, дезактивируются глицеролфосфатный и малатаспартатный челночные механизмы в митохондриях и, как следствие этого, угнетается клеточное дыхание.

Значительные изменения иммунометаболических параметров определяются у больных бактериальными инфекциями. Независимо от степени тяжести РГП в лимфоцитах периферической крови снижены интенсивность анаэробного и аэробного дыхания, реактивность глутатион-зависимой антиоксидантной системы, а также уровень липидного анаболизма и субстратного взаимодействия между циклом трикарбоновых кислот и реакциями аминокислотного обмена. При средней степени тяжести РГП выявляется более выраженная реакция метаболизма лимфоцитов крови, характеризующаяся ингибированием ключевой и инициализирующей реакции пентозофосфатного цикла и аэробной реакции ЛДГ. В то же время при тяжелой степени тяжести РГП в лимфоцитах крови выявляется более выраженное снижение активности НАДФ-

зависимой глутаматдегидрогеназной реакции. Также установлены особенности метаболических механизмов хемилюминесцентной реакции нейтрофильных гранулоцитов у больных РГП в зависимости от исхода заболевания. Обнаружено, что при неблагоприятном исходе РГП в нейтрофильных гранулоцитах активированы ферментативные реакции, характеризующие интенсивность анаэробных и аэробных процессов.

ДТЗ и АИТ являются наиболее распространенными органоспецифическими аутоиммунными заболеваниями. АИТ и ДТЗ имеют сходную этиологию — аутоиммунный процесс, но различный патогенез, специфичность которого на уровне организма проявляется в том числе и уровнем тиреоидных гормонов. В основе патогенеза данных патологий лежит аутоиммунный процесс, исходом которого является гипертиреоз (при ДТЗ) и гипотиреоз (при АИТ). Анализ полученных результатов проведен нами исходя из предположения, что общие изменения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови характеризуют аутоиммунный процесс, в то время как специфические особенности метаболизма клеток определяются регуляторным воздействием разных доз тиреоидных гормонов. При этом выраженных различий со стороны метаболизма лимфоцитов в зависимости от АТкТПО у больных ДТЗ не обнаружено. Метаболизм лимфоцитов при ДТЗ в целом характеризуется высоким уровнем активности глутаматдегидрогеназ, осуществляющих субстратное взаимодействие цикла трикарбоновых кислот и реакций аминокислотного обмена, малат-аспартатного шунта и глутатионредуктазы. Только у больных ДТЗ с уровнем АТкТПО меньше 100 мЕд/л выявляется снижение активности НАДФИЦДГ. С помощью корреляционного анализа установлена разнонаправленность в регуляторном влиянии на метаболизм лимфоцитов высокого уровня тиреоидных гормонов и АТкТПО. У больных ДТЗ с уровнем АТкТПО больше 100 мЕд/л выявляется усиление дизрегуляторных процессов, проявляющееся в полной потере взаимосвязей концентрации АТкТПО с иммунологическими показателями и уровнями активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов.

При исследовании активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у больных истинной аллергией и псевдоаллергией обнаружено увеличение интенсивности реакций, определяющих функции пентозофосфатного цикла, гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. Увеличение активности ферментов, отражающих интенсивность анаэробного и аэробного дыхания лимфоцитов, у больных истинной аллергией выше, чем у лиц с псевдоаллергией. В связи с этим предполагается, что для реализации повышенной функциональной активности лимфоцитов при истинной аллергии необходимо выраженное увеличение энергетических процессов. В то же время изменение активности исследуемых НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов у лиц с псевдоаллергией определяется выбросом в кровь медиаторов аллергии.

Таким образом, учитывая высокую информативность метаболических показателей для характеристики функционального состояния клеток иммунной системы, исследование метаболических параметров позволит улучшить диагностику иммунных нарушений, правильно выбрать тактику иммунокорригирующей терапии, оценить эффект действия различных иммуномодуляторов и разработать иммунореабилитационные мероприятия с учетом выявленных метаболических нарушений.

Метаболическая терапия достаточно успешно используется в кардиологии и неврологии. Практикующие врачи эмпирически применяют ее и при лечении иммуноопосредованных заболеваний. С учетом влияния на метаболизм клетки можно выделить следующие группы препаратов:

1) препараты, преимущественно влияющие на энергетические процессы клетки (энергетики);

2) средства, направленные на пластические реакции клетки (пластики);

3) средства, устраняющие продукты метаболизма в клетки (утилизаторы).

С позиций биохимических реакций в каждой группе выделяются препараты, действующие на регуляцию какой-либо метаболической реакции (гормоны, ферменты и коферменты) и субстраты этой реакции (естественные метаболиты).

Учитывая выявленные метаболические изменения в клетках иммунной системы при различных иммунопатологических состояниях, обосновано применение препаратов, корригирующих метаболические нарушения клеток иммунной системы. Подобный подход позволит практическим врачам проводить эффективные лечебные мероприятия и реализовать надежные методы профилактики с учетом индивидуальных особенностей больного.

Таким образом, технологии исследования метаболизма клеток иммунной системы и иммунометаболическая терапия с позиций доказательной медицины показали свою состоятельность и эффективность в диагностике иммунометаболических нарушений и определения оптимальных методов лечения с четкими критериями применения препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Асадуллина И.А., Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В. Роль аденозинтрифосфата в регуляции процессов дегрануляции нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека *in vitro* // Российский иммунологический журнал.–2017.–Т. 20, № 2.–С. 96-99.
2. Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Проценко С.А., Новик А.В., Данилова А.Б., Авдонкина Н.А., Пипиа Н.П., Зозуля А.Ю., Емельянова Н.В., Кузнецова А.И., Блохина М.Л., Просекина Е.А., Скачкова О.В., Гирдюк Д.В., Анохина Е.М., Семенова А.И., Латипова Д.Х., Телетаева Г.М., Кулева С.А., Семиглазов В.Ф., Новиков С.Н., Рогачев М.В., Беляев А.М. Дендритноклеточные вакцины в иммунотерапии больных солидными опухолями.– СПб.: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2020. – 128 с.
3. Беленюк В.Д., Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В. Зависимость фенотипа Т-лимфоцитов крови от исхода распространенного гнойного перитонита // Российский иммунологический журнал.–2019.–Т. 13(22), № 4.–С. 65-72.
4. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
5. Борисов А.Г. Кластерный анализ типов иммунных нарушений при инфекционно-воспалительных заболеваниях// Российский иммунологический журнал.–2014.–Т. 8(17), № 4.–С. 1002–1011.
6. Борисов А.Г. Клиническая характеристика нарушения функции иммунной системы // Медицинская иммунология.–2013.–Т. 15, № 1.–С.45-50.
7. Борисов А.Г., Савченко А.А., Кудрявцев И.В. Особенности иммунного реагирования при вирусных инфекциях// Инфекция и иммунитет.–2015.–Т. 5, № 2. - С. 148-156.
8. Борисов А.Г., Савченко А.А., Смирнова С.В. К вопросу о классификации нарушений функционального состояния иммунной системы // Сибирский медицинский журнал.–2008.–Т. 23, № 3, (выпуск 1).–С.13-18.
9. Борисов А.Г., Савченко А.А., Соколовская В.К. Заболеваемость, связанная с нарушениями функции иммунной системы (на примере Красноярского края) // Здравоохранение Российской Федерации.–2014.–Т. 58, № 6.–С. 38-41.
10. Борисов А.Г., Савченко А.А., Черданцев Д.В., Здзитовецкий Д.Э., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д., Шапкина В.А. Типы иммунного реагирования при распространенном гнойном перитоните // Хирургия им. Н.И. Пирогова.–2016.–№ 9.–С.28-34.
11. Борисов С.А., Савченко А.А., Каспаров Э.В., Борисов А.Г. Особенности фенотипа Т-лимфоцитов у больных с пролежнями // Политравма.–2021.–№ 2.–С. 67-74.
12. Валутите Д.Э., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Козлов К.В., Борисов А.Г., Назаров В.Д., Тотолян А.А. Выявление мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита С у пациентов с неэффективной терапией препаратами прямого противовирусного действия // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.–2021.–Т. 986 № 1.–С. 18-27.
13. Грицинская В.Л., Гордиец А.В., Галактионова М.Ю., Савченко А.А., Манчук В.Т. Характеристика адаптационных возможностей первоклассников // Сибирский медицинский журнал (Иркутск).–2003.–№ 3.–С. 75-78.
14. Инжеваткин Е.В., Савченко А.А. Пространственная метаболическая неоднородность солидной карциномы Эрлиха // Доклады Академии наук.–2019.–Т. 486, № 5.–С. 626-630.
15. Кадричева С.Г., Савченко А.А., Догадин С.А. Активность неспецифической эстеразы и α -глицерофосфатдегидрогеназы в лимфоцитах крови у больных аутоиммунным тиреоидитом // Проблемы эндокринологии.–2003.–Т. 49, № 3.–С. 14-18.
16. Каспаров Э.В., Савченко А.А., Кудлай Д.А., Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Тихонова Е.П., Борисов А.Г. Клиническая иммунология. Реабилитация иммунной системы.–Красноярск: Версо, 2022.–194 с.
17. Козлов В.А., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Козлов И.Г., Кудлай Д.А., Продеус А.П., Борисов А.Г. Клиническая иммунология.–Красноярск: Поликор, 2020.– 345 с.

18. Козлов В.А., Тихонова Е.П., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Андропова Н.В., Анисимова Е.Н., Головкин А.С., Демина Д.В., Здзитовецкий Д.Э., Калинина Ю.С., Каспаров Э.В., Козлов И.Г., Корсунский И.А., Кудлай Д.А., Кузьмина Т.Ю., Миноранская Н.С., Продеус А.П., Старикова Э.П., Черданцев Д.В., Чесноков А.Б., Шестерня П.А., Борисов А.Г. Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов.–Красноярск: Поликор, 2021.– 560 с.
19. Коленчукова О.А., Савченко А.А., Кузнецов С.А., Борисов А.Г., Бородин Н.А., Отто В.С. Состояние иммунного статуса и метаболизма лимфоцитов у больных острым и хроническим гайморитами // Сибирский медицинский журнал.–2008.–Т. 23, № 3, Вып. 1.– С.23-25.
20. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Волков А.Е., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Полевщиков А.В. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки // Тихоокеанский медицинский журнал.–2015.–№ 2.– С. 30-35.
21. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Давыдова А.Я., Кробинец И. И., Савченко А.А., Серебрякова М.К. Особенности экспрессии CD38 Т-лимфоцитами периферической крови // Российский иммунологический журнал.–2015.–Т. 9(18), № 2(2).–С. 42-47.
22. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Васильева Е.В., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян Арег А. Фенотипическая характеристика цитотоксических Т-лимфоцитов: регуляторные и эффекторные молекулы. Медицинская иммунология.–2018.–Т. 20, № 2.–С. 227-240.
23. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Рак А.Я., Савченко А.А., Серебрякова М.К. Особенности экспрессии поверхностных рецепторов семейства KLR цитотоксическими Т-клетками различного уровня дифференцировки // Российский иммунологический журнал.– 2016.–Т. 10 (19), № 3.–С.297-302.
24. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян А.А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции // Медицинская иммунология.–2016.–Т. 18, № 3.–С. 239-250.
25. 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.–Т. 17, № 6.–С. 525-538.
26. Куртасова Л.М., Манчук В.Т., Савченко А.А. Основы метаболической иммунореабилитации детей с атопическим дерматитом.–Красноярск: Изд-во КрасГМУ, 2002.– 153 с.
27. Куртасова Л.М., Савченко А.А., Манчук В.Т. Метаболические аспекты иммунных нарушений у детей с заболеваниями органов дыхания.–Новосибирск: Наука, 2001.– 108 с.
28. Куртасова Л.М., Савченко А.А., Манчук В.Т. Метаболические аспекты иммунореабилитации детей с атопическими заболеваниями.–Новосибирск: Наука, 2006.– 222 с.
29. Куртасова Л.М., Савченко А.А., Шмидт А.Р. Структурно-метаболические особенности иммунокомпетентных клеток у детей раннего возраста с атопической бронхиальной астмой // Аллергология.–2003.–№ 4.–С. 17-21.
30. Куртасова Л.М., Савченко А.А., Шмидт А.Р., Чесноков А.Б., Ольховский И.А. Оценка метаболического состояния и функциональной активности иммунокомпетентных клеток у детей с рецидивирующей герпесвирусной инфекцией // Клиническая лабораторная диагностика.–2003.–№ 2.–С. 16.
31. Куртасова Л.М., Толстикова А.Е., Савченко А.А. Иммунологические показатели, ферментный профиль лимфоцитов и функциональная активность нейтрофилов крови у детей с инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр // Вестник Российской академии медицинских наук.–2013.–Т. 68, № 7.–С. 42-46

32. Мерабишвили В.М., Беляев А.М. Состояние онкологической помощи в России: динамика пятилетней выживаемости больных злокачественными новообразованиями и её ранговое распределение по всем локализациям опухолей. Популяционное исследование на уровне северо-западного федерального округа // Проблемы онкологии.–2023.–Т. 69, № 2.–С. 227-237.
33. Петухов А.В., Маркова В.А., Моторин Д.В., Титов А.К., Белозерова Н.С., Гершович П.М., Карабельский А.В., Иванов Р.А., Зайкова Е.К., Смирнова Е.Ю., Бутылин П.А., Зарицкий А.Ю. Получение CAR T-лимфоцитов, специфичных к CD19, и оценка их функциональной активности in vitro // Онкогематология.–2018.–Т. 11, № 1.–С. 1-9.
34. Савченко А.А. Биоломинесцентное определение активности НАД- и НАДФ-зависимых глутаматдегидрогеназ лимфоцитов // Лабораторное дело.–1991.–№ 11.–С. 22-25.
35. Савченко А.А. Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биоломинесцентным методом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.–2015.–Т. 159, № 5.–С. 656-660.
36. Савченко А.А., Борисов А.Г. Основы клинической иммунометаболомики.–Новосибирск: Наука, 2012.– 263 с.
37. Савченко А.А., Борисов А.Г. Особенности состояния клеточного и гуморального иммунитета при остром и хроническом вирусном гепатите В // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.–2012.–№ 3 (85).–С. 53-57.
38. Савченко А.А., Борисов А.Г. Показатели иммунной системы и активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов у лиц, длительно контактирующих с радиоактивными и химическими веществами // Иммунология.–1996.–№ 4.–С. 55-57.
39. Савченко А.А., Борисов А.Г., Беленюк В.Д., Мошев А.В. Изменение субпопуляционного состава и фагоцитарной активности моноцитов у больных раком почки при воздействии метаболитов in vitro // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.–2021.–Т. 171, № 3.–С. 344-348.
40. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Гвоздев И.И. Особенности влияния активности внутриклеточных ферментов на состояние респираторного взрыва нейтрофилов при последующем развитии сепсиса у больных с распространенным гнойным перитонитом // Российский иммунологический журнал.–2018.–Т. 12(21), № 2.–С. 160-169.
41. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Гвоздев И.И. Особенности цитокиновой регуляции респираторного взрыва нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных распространенным гнойным перитонитом // Медицинская иммунология.–2016.–Т. 18, № 5.–С. 475-482.
42. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Кудрявцев И.В. Состояние клеточного и гуморального иммунитета в зависимости от исхода распространенного гнойного перитонита // Инфекция и иммунитет.–2015.–Т. 5, № 1.–С. 63-70.
43. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Лузан Н.А. Особенности состояния клеточного и гуморального иммунитета у больных распространенным гнойным перитонитом // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.–2012.–№ 3(85), часть 2.–С. 159-163.
44. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Лузан Н.А. Хемилуминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов и уровни концентрации цитокинов у больных распространенным гнойным перитонитом // Цитокины и воспаление.–2013.–№ 1-2.–С. 115-119.
45. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Медведев А.Ю., Гвоздев И.И. Зависимость респираторного взрыва нейтрофилов от состояния их метаболизма у больных с разной степенью тяжести острого деструктивного панкреатита // Медицинская иммунология.–2019.–Т.21, № 1.–С. 77-88.
46. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д. Особенности фенотипа НКТ-клеток в зависимости от исхода распространенного гнойного перитонита // Инфекция и иммунитет.–2022.–Т. 12, № 6.–С. 1040-1050.

47. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д. Фенотип НК-клеток в динамике послеоперационного периода у больных перитонитом в зависимости от исхода заболевания // Инфекция и иммунитет.–2019.–Т. 9, № 3-4.–С. 539-548.
48. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В. Особенности фенотипа дендритных клеток, дифференцированных из моноцитов крови, у больных раком почки // Медицинская иммунология.–2018.–Т. 20, № 2.–С. 215-226.
49. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В. Взаимосвязь фенотипа и метаболизма нейтрофилов крови у больных раком почки // Медицинская иммунология.–2020.–Т. 22, № 5.–С. 887-896.
50. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В., Черданцев Д.В., Первова О.В. Взаимосвязь фенотипа и метаболизма нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода // Инфекция и иммунитет.–2017.–№ 3.–С. 259-270.
51. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Мошев А.В. Зависимость фенотипа и хемилуминесцентной активности моноцитов от количества Т-регуляторных клеток у больных раком почки // Медицинская иммунология.–2020.–Т. 22, № 2.–С. 347-356.
52. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Мошев А.В. Зависимость фенотипа и хемилуминесцентной активности моноцитов от количества Т-регуляторных клеток у больных раком почки // Медицинская иммунология.–2020.–Т. 22, № 2.–С. 347-356.
53. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Мошев А.В. Зависимость фенотипа дендритных клеток от содержания провоспалительных моноцитов крови у больных раком почки // Медицинская иммунология.–2019.–Т. 21, № 4.–С. 689-702.
54. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Мошев А.В. Роль Т- и В-клеточного иммунитета в патогенезе онкологических заболеваний // Вопросы онкологии.–2015.–Т. 61, № 6.–С. 867-875.
55. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Кудрявцев И.В., Мошев А.В., Гвоздев И.И., Тоначева О.Г. Особенности взаимосвязи фенотипа и хемилуминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных раком почки // Медицинская иммунология.–2016.–Т. 18, № 3.–С. 259-268.
56. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Мошев А.В., Кудрявцев И.В., Тоначева О.Г., Кошечев В.Н. Фенотипический состав и хемилуминесцентная активность моноцитов у больных почечно-клеточным раком // Медицинская иммунология.–2015.–Т. 17, № 2.–С. 141-150.
57. Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д. Особенности фенотипа Т-лимфоцитов в динамике послеоперационного периода у больных перитонитом в зависимости от исхода заболевания // Инфекция и иммунитет.–2019.–Т.9, № 1.–С. 115-127.
58. Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В. Особенности фенотипа и активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у больных распространенным гнойным перитонитом в прогнозе развития сепсиса // Инфекция и иммунитет.–2018.–Т. 8, № 3.–С. 369-376.
59. Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д. Регуляторное влияние моноцитов крови на популяционный состав гранулоцитарных лейкоцитов и состояние их респираторного взрыва при распространенном гнойном перитоните // Инфекция и иммунитет.–2018.–Т. 8, № 2.–С. 201-210.
60. Савченко А.А., Гвоздев И.И., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Мошев А.В. Особенности фагоцитарной активности и состояния респираторного взрыва нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода // Инфекция и иммунитет.–2017.–Т. 1.–С. 51-60.
61. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А. Г. Взаимосвязь показателей клеточного и гуморального иммунитета с уровнем содержания цитокинов при распространенном

- гнояном перитоните // Российский иммунологический журнал.–2015.–Т. 9(18), № 3.–С. 359-365.
62. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните.–Новосибирск: Наука, 2013.–142 с.
63. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Особенности состояния клеточного и гуморального иммунитета и уровни концентрации цитокинов у больных с распространенным гнойным перитонитом // Сибирское медицинское обозрение.–2013.–№ 1.–С. 24-28.
64. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная и энзиматическая активность нейтрофильных гранулоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от исхода заболевания // Вестник Российской академии медицинских наук.–2014.–Т. 69, № 5-6.–С. 23-28.
65. Савченко А.А., Каспаров Э.В., Арутюнян С.С., Борисов А.Г., Гвоздев И.И. Зависимость респираторного взрыва нейтрофилов от состояния их метаболических процессов у больных хроническими эндометритами и аднекситами // Российский иммунологический журнал.–2018.–Т. 12(21), № 3.–С. 412-422.
66. Савченко А.А., Каспаров Э.В., Арутюнян С.С., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В. Взаимосвязь содержания Th- и T-регуляторных клеток в крови и хемилюминесцентной активности нейтрофилов у больных хроническим эндометритом и аднекситом // Медицинская иммунология.–2018.–Т. 20, № 1.–С. 61-72.
67. Савченко А.А., Каспаров Э.В., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Гвоздев И.И. Биоломинесцентный метод прогноза исхода распространенного гнойного перитонита. (Медицинская технология).–Красноярск: ООО «Версона», 2018.–16 с.
68. Савченко А.А., Каспаров Э.В., Борисов С.А., Мастерова А.А., Борисов А.Г. Эффективность детоксикации для коррекции системного воспалительного ответа при иммунореабилитации онкологических больных // Цитокины и воспаление.–2022.–Т. 19, № 1-4.–С. 61-68.
69. Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Борисов А.Г. Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний // Инфекция и иммунитет.–2017.–Т. 7, № 4.–С. 327-340.
70. Савченко А.А., Модестов А.А., Мошев А.В., Тоначева О.Г., Борисов А.Г. Цитометрический анализ НК- и НКТ-клеток у больных почечноклеточным раком// Российский иммунологический журнал.–2014.–Т. 8(17), № 4.–С. 1012-1019.
71. Савченко А.А., Смирнова С.В. Особенности уровней активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у больных истинной аллергией и псевдоаллергией // Вестник новых медицинских технологий.–2001.–Т. 8, № 2.–С.64-67.
72. Савченко А.А., Смирнова С.В., Борисов А.Г. Метаболическое состояние лимфоцитов крови у пришлых жителей Эвенкии, здоровых и с нарушениями иммунореактивности // Бюллетень Сибирского отделения РАМН.–1997.–№4.–С. 32-36.
73. Савченко А.А., Смирнова С.В., Борисов А.Г. Содержание АТФ и активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах при иммунодефицит-ассоциированных заболеваниях у пришлых жителей Эвенкии // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.–2010.–Т. 30, № 3.–С. 33-38.
74. Савченко А.А., Цхай В.Б., Круглова Д.Ю., Борисов А.Г. Некоторые иммунологические показатели при патологии шейки матки, ассоциированной с папилломавирусной инфекцией // Медицинская иммунология.–2012.–Т. 14, № 3.–С. 207-212.
75. Савченко А.А., Черданцев Д.В., Первова О.В., Гвоздев И.И., Борисов А.Г., Шапкина В.А. Клиническое состояние и хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода // Бюллетень сибирской медицины.–2014.–Т. 13, № 6.–С. 10-19.
76. Серебрякова М.К., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Прозоровская Е.Л., Савченко А.А., Кудрявцев И. В. Эффекторные и регуляторные молекулы Т-хелперов различного уровня

- дифференцировки // Российский иммунологический журнал.–2015.–Т. 9(18), № 2(2).–С. 99-104.
77. Смирнова О.В., Манчук В.Т., Савченко А.А. Состояние иммунного статуса и активность ферментов в лимфоцитах крови у больных на разных стадиях острого лимфобластного лейкоза // Медицинская иммунология.–2008.–Т. 10, № 6.–С. 543-550.
78. Тихонова Е.П., Савченко А., Кузьмина Т.Ю., Калинина Ю.С., Дьяченко Н.А., Мастерова А.А., Беленюк В.Д., Борисов А.Г., Попилов М.А. Детоксикация при иммунореабилитации больных, переболевших новой коронавирусной инфекцией COVID-19 // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.–2021.–Т. 10, № 4.–С. 29-37.
79. Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия.–М.: Медицина, 1983.–320 с.
80. Черданцев Д.В., Первова О.В., Шапкина В.А., Дятлов В.Ю., Трофимович Ю.Г., Борисов А.Г., Беленюк В.Д., Гвоздев И.И., Амелыченко А.А. Современный подход к лечению пациентов с распространенным гнойным перитонитом // Сибирское медицинское обозрение.–2016.–№ 6.–С. 1-8.
81. Черных Е.Р., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Сахо Л.В., Останин А.А. Фенотип и функции дендритных клеток человека, генерированных из субпопуляций моноцитов CD14⁺, опозитных по экспрессии CD16 // Бюллетень сибирской медицины.–2019.–Т. 18, № 1.–С. 266-276.
82. Чучалин А.Г., Яблонский П.К., Рубаник Т.В., Чернявская О.А., Наумов В.В., Корнева Л.И., Куделя Л.М., Петухова А.Ю., Масалкина О.В., Аргамасова Ю.В., Игнатова Г.Л., Борисов А.Г., Касьянова Т.Р., Сулейманова А.К. Эффективность и безопасность применения бовгиалуронидазы азоксимера (Лонгидаза) у пациентов с постковидным синдромом: результаты открытого проспективного контролируемого сравнительного многоцентрового клинического исследования DISSOLVE // Пульмонология.–2023.–Т. 33, № 1.–С. 52-63.
83. Abdel-Mohsen M.A., El-Braky A.A., Ghazal A.A.E., Shamseya M.M. Autophagy, apoptosis, vitamin D, and vitamin D receptor in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus // Medicine (Baltimore).–2018.–Vol. 97, no. 12.–e0172.
84. Abobaker A., Alzwi A., Alraied A.H.A. Overview of the possible role of vitamin C in management of COVID-19 // Pharmacol. Rep.–2020.–Vol. 72, no. 6.–P. 1517-1528.
85. Acharya P., Dalia T., Ranka S., Sethi P., Oni O.A., Safarova M.S., Parashara D., Gupta K., Barua R.S. The Effects of Vitamin D Supplementation and 25-Hydroxyvitamin D Levels on the Risk of Myocardial and Mortality // J. Endocr. Soc.–2021.–Vol. 5, no. 10.–bvab124.
86. Adamo S., Chevrier S., Cervia C., Zurbuchen Y., Raeber M.E., Yang J., Sivapatham S., Jacobs A., Baechli E., Rudiger A., Stüssi-Helbling M., Huber L.C., Schaer D.J., Bodenmiller B., Boyman O., Nilsson J. Profound dysregulation of T cell homeostasis and function in patients with severe COVID-19 // Allergy.–2021.–Vol. 76, no. 9.–P. 2866-2881.
87. Adams S., Braidy N., Bessede A., Brew B.J., Grant R., Teo C., Guillemin G.J. The kynurenine pathway in brain tumor pathogenesis // Cancer Res.–2012.–Vol. 72, no. 22.–P. 5649-5657.
88. Agarwala S.S., Keilholz U., Gilles E., Bedikian A.Y., Wu J., Kay R., Stein C.A., Itri L.M., Suci S., Eggermont A.M. LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951) // Eur. J. Cancer.–2009.–Vol. 45, no. 10.–P. 1807-1814.
89. Agliano F., Ménoret A., Vella A.T. Evaluating the glycolytic potential of mouse costimulated effector CD8⁺ T cells ex vivo // STAR Protoc.–2022.–Vol. 3, no. 2.–101441.
90. Ajaz S., McPhail M.J., Singh K.K., Mujib S., Trovato F.M., Napoli S., Agarwal K. Mitochondrial metabolic manipulation by SARS-CoV-2 in peripheral blood mononuclear cells of patients with COVID-19 // Am. J. Physiol. Cell. Physiol.–2021.–Vol. 320, no. 1.–C57-C65.
91. Ali N. Role of vitamin D in preventing of COVID-19 infection, progression and severity // J. Infect. Public. Health.–2020.–Vol. 13, no. 10.–P. 1373-1380.
92. Allen R.C. Neutrophil Leukocyte: Combustive Microbicidal Action and Chemiluminescence // J. Immunol. Res.–2015.–Vol. 2015.–794072.

93. Alonso D., Nungester W.J. Comparative study of host resistance of guinea pigs and rats. V. The effect of pneumococcal products on glycolysis and oxygen uptake by polymorphonuclear leucocytes // *J. Infect. Dis.*–1956.–Vol. 99, no. 2.–P. 174-181.
94. Altieri B., Grant W.B., Della Casa S., Orio F., Pontecorvi A., Colao A., Sarno G., Muscogiuri G. Vitamin D and pancreas: The role of sunshine vitamin in the pathogenesis of diabetes mellitus and pancreatic cancer // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*–2017.–Vol. 57, no. 16.–P. 3472-3488.
95. Altman B.J., Stine Z.E., Dang C.V. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy // *Nat. Rev. Cancer.*–2016.–Vol. 16, no. 10.–P. 619-634.
96. Alvarado C., Alvarez P., Puerto M., Gausserès N., Jiménez L., De la Fuente M. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice // *Nutrition.*–2006.–Vol. 22, no. 7-8.–P. 767-777.
97. Ames B.N. Low micronutrient intake may accelerate the degenerative diseases of aging through allocation of scarce micronutrients by triage // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*–2006.–Vol. 103, no. 47.–P. 17589-17594.
98. Amitrano A.M., Kim M. Metabolic Challenges in Anticancer CD8 T Cell Functions // *Immune Netw.*–2023.–Vol. 23, no. 1.–e9.
99. Anastasi E., Ialongo C., Labriola R., Ferraguti G., Lucarelli M., Angeloni A. Vitamin K deficiency and covid-19 // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*–2020.–Vol. 80, no. 7.–P. 525-527.
100. Andersen J.V., Schousboe A. Glial Glutamine Homeostasis in Health and Disease // *Neurochem. Res.*–2023.–Vol. 48, no. 4.–P. 1100-1128.
101. Appelberg S., Gupta S., Svensson Akusjärvi S., Ambikan A.T., Mikaeloff F., Saccon E., Végvári Á., Benfeitas R., Sperk M., Ståhlberg M., Krishnan S., Singh K., Penninger J.M., Mirazimi A., Neogi U. Dysregulation in Akt/mTOR/HIF-1 signaling identified by proteo-transcriptomics of SARS-CoV-2 infected cells // *Emerg. Microbes. Infect.*–2020.–Vol. 9, no. 1.–P. 1748-1760.
102. Aranda A., Sequedo L., Tolosa L., Quintas G., Burello E., Castell J.V., Gombau L. Dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells // *Toxicol. In Vitro.*–2013.–Vol. 27, no 2.–P. 954-963.
103. Arias-Alpizar K., Sánchez-Cano A., Prat-Trunas J., de la Serna Serna E., Alonso O., Sulleiro E., Sánchez-Montalvá A., Diéguez A., Baldrich E. Malaria quantitative POC testing using magnetic particles, a paper microfluidic device and a hand-held fluorescence reader // *Biosens. Bioelectron.*–2022.–Vol. 215.–114513.
104. Arnold P.K., Finley L.W.S. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle // *J. Biol. Chem.*–2023.–Vol. 299, no. 2.–102838.
105. Arslan C., Piriñç A., Eker N., Sur E., Ündağ İ., Kuşat T. Dietary encapsulated essential oil mixture influence on apparent nutrient digestibility, serum metabolic profile, lymphocyte histochemistry and intestinal morphology of laying hens // *Anim. Biosci.*–2022.–Vol. 35, no. 5.–P. 740-751.
106. Badawy A.A. Tryptophan availability for kynurenine pathway metabolism across the life span: Control mechanisms and focus on aging, exercise, diet and nutritional supplements // *Neuropharmacology.*–2017.–Vol. 112 (Pt B).–P. 248-263.
107. Bafadam S., Beheshti F., Khodabakhshi T., Asghari A., Ebrahimi B., Sadeghnia H.R., Mahmoudabady M., Niazmand S., Hosseini M. Trigonella foenum-graceum seed (Fenugreek) hydroalcoholic extract improved the oxidative stress status in a rat model of diabetes-induced memory impairment // *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.*–2019.–Vol. 39, no. 2: /j/hmbei.2019.39.issue-2/hmbei-2018-0074/hmbei-2018-0074.xml. doi: 10.1515/hmbei-2018-0074
108. Barabutis N., Khangoora V., Marik P.E., Catravas J.D. Hydrocortisone and Ascorbic Acid Synergistically Prevent and Repair Lipopolysaccharide-Induced Pulmonary Endothelial Barrier Dysfunction // *Chest.*–2017.–Vol. 152, no. 5.–P. 954-962.

109. Barberis E., Timo S., Amede E., Vanella V.V., Puricelli C., Cappellano G., Raineri D., Cittone M.G., Rizzi E., Pedrinelli A.R., Vassia V., Casciaro F.G., Priora S., Nerici I., Galbiati A., Hayden E., Falasca M., Vaschetto R., Sainaghi P.P., Dianzani U., Rolla R., Chiocchetti A., Baldanzi G., Marengo E., Manfredi M. Large-Scale Plasma Analysis Revealed New Mechanisms and Molecules Associated with the Host Response to SARS-CoV-2 // *Int. J. Mol. Sci.*–2020.–Vol. 21, no. 22.–P. 8623.
110. Barbieri L., Veliça P., Gameiro P.A., Cunha P.P., Foskolou I.P., Rullman E., Bargiela D., Johnson R.S., Rundqvist H. Lactate exposure shapes the metabolic and transcriptomic profile of CD8+ T cells // *Front. Immunol.*–2023.–Vol. 14.–1101433.
111. Barrea L., Frias-Toral E., Pugliese G., Garcia-Velasquez E., DE Los Angeles Carignano M., Savastano S., Colao A., Muscogiuri G. Vitamin D in obesity and obesity-related diseases: an overview // *Minerva Endocrinol (Torino)*.–2021.–Vol. 46, no. 2.–P. 177-192.
112. Barrea L., Muscogiuri G., Annunziata G., Laudisio D., de Alteriis G., Tenore G.C., Colao A., Savastano S. A New Light on Vitamin D in Obesity: A Novel Association with Trimethylamine-N-Oxide (TMAO) // *Nutrients*.–2019.–Vol. 11, no. 6.–P. 1310.
113. Barrea L., Muscogiuri G., Frias-Toral E., Laudisio D., Pugliese G., Castellucci B., Garcia-Velasquez E., Savastano S., Colao A. Nutrition and immune system: from the Mediterranean diet to dietary supplementary through the microbiota // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*–2021.–Vol. 61, no. 18.–P. 3066-3090.
114. Barrea L., Muscogiuri G., Laudisio D., Pugliese G., de Alteriis G., Colao A., Savastano S. Influence of the Mediterranean Diet on 25- Hydroxyvitamin D Levels in Adults // *Nutrients*.–2020.–Vol. 12, no. 5.–P. 1439.
115. Bartolini D., Stabile A.M., Bastianelli S., Giustarini D., Pierucci S., Busti C., Vacca C., Gidari A., Francisci D., Castronari R., Mencacci A., Di Cristina M., Focaia R., Sabbatini S., Rende M., Gioiello A., Cruciani G., Rossi R., Galli F. SARS-CoV2 infection impairs the metabolism and redox function of cellular glutathione // *Redox Biol.*–2021.–Vol. 45.–102041.
116. Batah S.S., Fabro A.T. Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians // *Respir. Med.*–2021.–Vol. 176.–106239.
117. Bedard K., Krause K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology // *Physiol. Rev.*–2007.–Vol. 87, no. 1.–P. 245-313.
118. Belikov A.V., Schraven B., Simeoni L. T cells and reactive oxygen species // *J. Biomed. Sci.*–2015.–Vol. 22.–P. 85.
119. Bender D.A. Effects of a dietary excess of leucine on the metabolism of tryptophan in the rat: a mechanism for the pellagragenic action of leucine // *Br. J. Nutr.*–1983.–Vol. 50, no. 1.–P. 25-32.
120. Beutler B. Innate immunity: an overview // *Mol. Immunol.*–2004.–Vol. 40.–P. 845-859.
121. Bhagat T.D., Von Ahrens D., Dawlaty M., Zou Y., Baddour J., Achreja A., Zhao H., Yang L., Patel B., Kwak C., Choudhary G.S., Gordon-Mitchell S., Aluri S., Bhattacharyya S., Sahu S., Bhagat P., Yu Y., Bartenstein M., Giricz O., Suzuki M., Sohal D., Gupta S., Guerrero P.A., Batra S., Goggins M., Steidl U., Greally J., Agarwal B., Pradhan K., Banerjee D., Nagrath D., Maitra A., Verma A. Lactate-mediated epigenetic reprogramming regulates formation of human pancreatic cancer-associated fibroblasts // *Elife*.–2019.–Vol. 8.–e50663.
122. Bharadwaj S., Singh M., Kirtipal N., Kang S.G. SARS-CoV-2 and Glutamine: SARS-CoV-2 Triggered Pathogenesis via Metabolic Reprogramming of Glutamine in Host Cells // *Front. Mol. Biosci.*–2021.–Vol. 7.–627842.
123. Bieganowski P., Brenner C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD+ in fungi and humans // *Cell*.–2004.–Vol. 117, no. 4.–P. 495-502.
124. Bifulco M., Gazzerro P. Statin therapy in COVID-19 infection: much more than a single pathway // *Eur. Heart J. Cardiovasc. Pharmacother.*–2020.–Vol. 6, no. 6.–P. 410-411.

125. Bilezikian J.P., Bikle D., Hewison M., Lazaretti-Castro M., Formenti A.M., Gupta A., Madhavan M.V., Nair N., Babalyan V., Hutchings N., Napoli N., Accili D., Binkley N., Landry D.W., Giustina A. Mechanisms in endocrinology: Vitamin D and COVID-19 // *Eur. J. Endocrinol.*–2020.–Vol. 183, no. 5.–R133-R147.
126. Biltibo E., Berdeja J.G. SOHO State-of-the-Art Updates and Next Questions | BCMA-Directed CAR T-Cells: Early Results and Future Directions // *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*–2023.–S2152-2650(23)00034-4.
127. Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.C., Uhl S., Hoagland D., Møller R., Jordan T.X., Oishi K., Panis M., Sachs D., Wang T.T., Schwartz R.E., Lim J.K., Albrecht R.A., tenOever B.R. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19 // *Cell.*–2020.–Vol. 181, no. 5.–P. 1036-1045.
128. Boergeling Y., Ludwig S. Targeting a metabolic pathway to fight the flu // *FEBS J.*–2017.–Vol. 284, no. 2.–P. 218-221.
129. Bohn T., Rapp S., Luther N., Klein M., Bruehl T.J., Kojima N., Aranda Lopez P., Hahlbrock J., Muth S., Endo S., Pektor S., Brand A., Renner K., Popp V., Gerlach K., Vogel D., Lueckel C., Arnold-Schild D., Pouyssegur J., Kreutz M., Huber M., Koenig J., Weigmann B., Probst H.C., von Stebut E., Becker C., Schild H., Schmitt E., Bopp T. Tumor immunoevasion via acidosis-dependent induction of regulatory tumor-associated macrophages // *Nat. Immunol.*–2018.–Vol. 19, no. 12.–P. 1319-1329.
130. Bojkova D., Klann K., Koch B., Widera M., Krause D., Ciesek S., Cinatl J., Münch C. Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets // *Nature.*–2020.–Vol. 583, no. 7816.–P. 469-472.
131. Botman D., Tigchelaar W., Van Noorden C.J. Determination of phosphate-activated glutaminase activity and its kinetics in mouse tissues using metabolic mapping (quantitative enzyme histochemistry) // *J. Histochem. Cytochem.*–2014.–Vol. 62, no. 11.–P. 813-826.
132. Bourque J., Hawiger D. Life and death of tolerogenic dendritic cells // *Trends Immunol.*–2023.–Vol. 44, no. 2.–P. 110-118.
133. Bozonet S.M., Carr A.C., Pullar J.M., Vissers M.C. Enhanced human neutrophil vitamin C status, chemotaxis and oxidant generation following dietary supplementation with vitamin C-rich SunGold kiwifruit // *Nutrients.*–2015.–Vol. 7, no. 4.–P. 2574-2588.
134. Brown B., Ojha V., Fricke I., Al-Sheboul S.A., Imarogbe C., Gravier T., Green M., Peterson L., Koutsaroff I.P., Demir A., Andrieu J., Leow C.Y., Leow C.H. Innate and Adaptive Immunity during SARS-CoV-2 Infection: Biomolecular Cellular Markers and Mechanisms // *Vaccines.*–2023.–Vol. 11.–P. 408.
135. Brown M.S., Goldstein J.L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor // *Cell.*–1997.–Vol. 89, no. 3.–P. 331-340.
136. Butt J.H., Gerds T.A., Schou M., Kragholm K., Phelps M., Havers-Borgersen E., Yafasova A., Gislason G.H., Torp-Pedersen C., Køber L., Fosbøl E.L. Association between statin use and outcomes in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): a nationwide cohort study // *BMJ Open.*–2020.–Vol. 10, no. 12.–e044421.
137. Calder P.C., Carr A.C., Gombart A.F., Eggersdorfer M. Optimal Nutritional Status for a Well-Functioning Immune System Is an Important Factor to Protect against Viral Infections // *Nutrients.*–2020.–Vol. 12, no. 4.–P. 1181.
138. Callard F., Perego E. How and why patients made Long Covid // *Soc. Sci. Med.*–2021.–Vol. 268.–113426.
139. Canzano P., Brambilla M., Porro B., Cosentino N., Tortorici E., Vicini S., Poggio P., Cascella A., Pengo M.F., Veglia F., Fiorelli S., Bonomi A., Cavalca V., Trabattoni D., Andreini D., Omodeo Salè E., Parati G., Tremoli E., Camera M. Platelet and Endothelial Activation as Potential Mechanisms Behind the Thrombotic Complications of COVID-19 Patients // *JACC Basic Transl. Sci.*–2021.–Vol. 6, no. 3.–P. 202-218.

140. Cao X., Zhang Y., Zhou Q., Sun S., He M., Wang X., Ma P., Yang X., Lv L., Zhan L. Establishment of a Novel Mouse Hepatocellular Carcinoma Model for Dynamic Monitoring of Tumor Development by Bioluminescence Imaging // *Front. Oncol.*–2022.–Vol. 12.–794101.
141. Carlsten C., Sagoo G.S., Frodsham A.J., Burke W., Higgins J.P. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and lung cancer: a literature-based systematic HuGE review and meta-analysis // *Am. J. Epidemiol.*–2008.–Vol. 167, no. 7.–P. 759-774.
142. Carpagnano G.E., Di Lecce V., Quaranta V.N., Zito A., Buonamico E., Capozza E., Palumbo A., Di Gioia G., Valerio V.N., Resta O. Vitamin D deficiency as a predictor of poor prognosis in patients with acute respiratory failure due to COVID-19 // *J. Endocrinol. Invest.*–2021.–Vol. 44, no. 4.–P. 765-771.
143. Carr A.C., Maggini S. Vitamin C and Immune Function // *Nutrients.*–2017.–Vol. 9, no. 11.–P. 1211.
144. Carracedo A., Cantley L.C., Pandolfi P.P. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight // *Nat. Rev. Cancer.*–2013.–Vol. 13, no. 4.–P. 227-232.
145. Cekic C., Linden J. Purinergic regulation of the immune system // *Nat. Rev. Immunol.*–2016.–Vol. 16, no. 3.–P. 177-192.
146. Cengiz M., Borku Uysal B., Ikitimur H., Ozcan E., Islamoğlu M.S., Aktepe E., Yavuzer H., Yavuzer S. Effect of oral l-Glutamine supplementation on Covid-19 treatment // *Clin. Nutr. Exp.*–2020.–Vol. 33.–P. 24-31.
147. Chang C.H., Curtis J.D., Maggi L.B. Jr., Faubert B., Villarino A.V., O'Sullivan D., Huang S.C., van der Windt G.J., Blagih J., Qiu J., Weber J.D., Pearce E.J., Jones R.G., Pearce E.L. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis // *Cell.*–2013.–Vol. 153, no. 6.–P. 1239-1251.
148. Chen S., Zhang S., Wang Z., Li J., Yuan Y., Li T., Zuo M., Feng W., Li W., Chen M., Liu Y. Purine metabolism-related gene expression signature predicts survival outcome and indicates immune microenvironment profile of gliomas // *Front. Pharmacol.*–2022.–Vol. 13.–1038272.
149. Chen X., Liu L., Kang S., Gnanaprakasam J.R., Wang R. The lactate dehydrogenase (LDH) isoenzyme spectrum enables optimally controlling T cell glycolysis and differentiation // *Sci. Adv.*–2023.–Vol. 9, no. 12.–eadd9554.
150. Chen Y., Luo G., Yuan J., Wang Y., Yang X., Wang X., Li G., Liu Z., Zhong N. Vitamin C mitigates oxidative stress and tumor necrosis factor-alpha in severe community-acquired pneumonia and LPS-induced macrophages // *Mediators Inflamm.*–2014.–Vol. 2014.–426740.
151. Cheng X.Y., Li J.L. Biological activity of cytotoxic dendritic cells cocultured with cytokine-induced killer cells and their effect on acute leukemia cells // *Genet. Mol. Res.*–2015.–Vol. 14, no. 4.–P. 13208-13214.
152. Codo A.C., Davanzo G.G., Monteiro L.B., de Souza G.F., Muraro S.P., Virgilio-da-Silva J.V., Prodonoff J.S., Carregari V.C., de Biagi Junior C.A.O., Crunfli F., Jimenez Restrepo J.L., Vendramini P.H., Reis-de-Oliveira G., Bispo Dos Santos K., Toledo-Teixeira D.A., Parise P.L., Martini M.C., Marques R.E., Carmo H.R., Borin A., Coimbra L.D., Boldrini V.O., Brunetti N.S., Vieira A.S., Mansour E., Ulaf R.G., Bernardes A.F., Nunes T.A., Ribeiro L.C., Palma A.C., Agrela M.V., Moretti M.L., Sposito A.C., Pereira F.B., Velloso L.A., Vinolo M.A.R., Damasio A., Proença-Módena J.L., Carvalho R.F., Mori M.A., Martins-de-Souza D., Nakaya H.I., Farias A.S., Moraes-Vieira P.M. Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 α /Glycolysis-Dependent Axis // *Cell. Metab.*–2020.–Vol. 32, no. 3.–P. 498-499.
153. Colunga Biancatelli R.M.L., Berrill M., Catravas J.D., Marik P.E. Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19) // *Front. Immunol.*–2020.–Vol. 11.–1451.
154. Colunga Biancatelli R.M.L., Berrill M., Marik P.E. The antiviral properties of vitamin C // *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*–2020.–Vol. 18, no. 2.–P. 99-101.

155. Comandatore A., Franczak M., Smolenski R.T., Morelli L., Peters G.J., Giovannetti E. Lactate Dehydrogenase and its clinical significance in pancreatic and thoracic cancers // *Semin. Cancer Biol.*–2022.–Vol. 86, Pt. 2.–P. 93-100.
156. Conti V., Corbi G., Sabbatino F., De Pascale D., Sellitto C., Stefanelli B., Bertini N., De Simone M., Liguori L., Di Paola I., De Bernardo M., Tesse A., Rosa N., Pagliano P., Filippelli A. Long COVID: Clinical Framing, Biomarkers, and Therapeutic Approaches // *J. Pers. Med.*–2023.–Vol. 13, no 2.–P. 334.
157. Croasdell Lucchini A., Gachanja N.N., Rossi A.G., Dorward D.A., Lucas C.D. Epithelial Cells and Inflammation in Pulmonary Wound Repair // *Cells.*–2021.–Vol. 10, no. 2.–P. 339.
158. Crook H., Raza S., Nowell J., Young M., Edison P. Long covid-mechanisms, risk factors, and management // *BMJ.*–2021.–Vol. 374.–n1648.
159. Crowe F.L., Steur M., Allen N.E., Appleby P.N., Travis R.C., Key T.J. Plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in meat eaters, fish eaters, vegetarians and vegans: results from the EPIC-Oxford study // *Public Health Nutr.*–2011.–Vol. 14, no. 2.–P. 340-346.
160. Cruzat V., Macedo Rogero M., Noel Keane K., Curi R., Newsholme P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation // *Nutrients.*–2018.–Vol. 10, no. 11.–P. 1564.
161. Cui Z., Li Y., Gao Y., Kong L., Lin Y., Chen Y. Cancer-testis antigen lactate dehydrogenase C4 in hepatocellular carcinoma: a promising biomarker for early diagnosis, efficacy evaluation and prognosis prediction // *Aging (Albany NY).*–2020.–Vol. 12, no. 19.–P. 19455-19467.
162. Daei Sorkhabi A., Mohamed Khosroshahi L., Sarkesh A., Mardi A., Aghebati-Maleki A., Aghebati-Maleki L., Baradaran B. The current landscape of CAR T-cell therapy for solid tumors: Mechanisms, research progress, challenges, and counterstrategies // *Front. Immunol.*–2023.–Vol. 14.–1113882.
163. D'Alessandro A., Thomas T., Akpan I.J., Reisz J.A., Cendali F.I., Gamboni F., Nemkov T., Thangaraju K., Katneni U., Tanaka K., Kahn S., Wei A.Z., Valk J.E., Hudson K.E., Roh D., Moriconi C., Zimring J.C., Hod E.A., Spitalnik S.L., Buehler P.W., Francis R.O. Biological and Clinical Factors Contributing to the Metabolic Heterogeneity of Hospitalized Patients with and without COVID-19 // *Cells.*–2021.–Vol. 10, no. 9.–P. 2293.
164. Damascena A.D., Azevedo L.M.G., Oliveira T.A., Santana J.D.M., Pereira M. Addendum to vitamin D deficiency aggravates COVID-19: systematic review and meta-analysis // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*–2023.–Vol. 63, no. 4.–P. 557-562.
165. Daneshkhan A., Agrawal V., Eshein A., Subramanian H., Roy H.K., Backman V. Evidence for possible association of vitamin D status with cytokine storm and unregulated inflammation in COVID-19 patients // *Aging Clin. Exp. Res.*–2020.–Vol. 32, no. 10.–P. 2141-2158.
166. Dang C.V. MYC on the path to cancer // *Cell.*–2012.–Vol. 149, no. 1.–P. 22-35.
167. De la Fuente M., Hernanz A., Guayerbas N., Victor V.M., Arnalich F. Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women // *Free Radic. Res.*–2008.–Vol. 42, no. 3.–P. 272-280.
168. De la Fuente M., Sánchez C., Vallejo C., Díaz-Del Cerro E., Arnalich F., Hernanz A. Vitamin C and vitamin E plus E improve the immune function in the elderly // *Exp. Gerontol.*–2020.–Vol. 142.–111118.
169. De la Serna E., Arias-Alpízar K., Borgheti-Cardoso L.N., Sanchez-Cano A., Sulleiro E., Zarzuela F., Bosch-Nicolau P., Salvador F., Molina I., Ramírez M., Fernández-Busquets X., Sánchez-Montalvá A., Baldrich E. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria in 1 h using a simplified enzyme-linked immunosorbent assay // *Anal. Chim. Acta.*–2021.–Vol. 1152.–338254.
170. De Rosa V., Galgani M., Porcellini A., Colamatteo A., Santopaulo M., Zuchegna C., Romano A., De Simone S., Procaccini C., La Rocca C., Carrieri P.B., Maniscalco G.T., Salvetti M., Buscarinu M.C., Franzese A., Mozzillo E., La Cava A., Matarese G. Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants // *Nat. Immunol.*–2015.–Vol. 16, no. 11.–P. 1174-1184.

171. Dean M.J., Ochoa J.B., Sanchez-Pino M.D., Zabaleta J., Garai J., Del Valle L., Wyczechowska D., Baiamonte L.B., Philbrook P., Majumder R., Vander Heide R.S., Dunkenberger L., Thylur R.P., Nossaman B., Roberts W.M., Chapple A.G., Wu J., Hicks C., Collins J., Luke B., Johnson R., Koul H.K., Rees C.A., Morris C.R., Garcia-Diaz J., Ochoa A.C. Severe COVID-19 Is Characterized by an Impaired Type I Interferon Response and Elevated Levels of Arginase Producing Granulocytic Myeloid Derived Suppressor Cells // *Front. Immunol.*–2021.–Vol. 12.–695972.
172. DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C.B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation // *Cell. Metab.*–2008.–Vol. 7, no. 1.–P. 11-20.
173. Desousa B.R., Kim K.K., Jones A.E., Ball A.B., Hsieh W.Y., Swain P., Morrow D.H., Brownstein A.J., Ferrick D.A., Shirihai O.S., Neilson A., Nathanson D.A., Rogers G.W., Dranka B.P., Murphy A.N., Affourtit C., Bensinger S.J., Stiles L., Romero N., Divakaruni A.S. Calculation of ATP production rates using the Seahorse XF Analyzer // *EMBO Rep.*–2023.–e56380.
174. Dias S.S.G., Soares V.C., Ferreira A.C., Sacramento C.Q., Fintelman-Rodrigues N., Temerozo J.R., Teixeira L., Nunes da Silva M.A., Barreto E., Mattos M., de Freitas C.S., Azevedo-Quintanilha I.G., Manso P.P.A., Miranda M.D., Siqueira M.M., Hottz E.D., Pão C.R.R., Bou-Habib D.C., Barreto-Vieira D.F., Bozza F.A., Souza T.M.L., Bozza P.T. Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators // *PLoS Pathog.*–2020.–Vol. 16, no. 12.–e1009127.
175. Diem S., Kasenda B., Spain L., Martin-Liberal J., Marconcini R., Gore M., Larkin J. Serum lactate dehydrogenase as an early marker for outcome in patients treated with anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma // *Br. J. Cancer.*–2016.–Vol. 114, no. 3.–P. 256-261.
176. Dolgushin M.V. Cytochemical Evaluation of the Toxic Effects of Combined Antituberculosis Substances on Metabolic State of Blood Lymphocytes // *Bull. Exp. Biol. Med.*–2020.–Vol. 168, no. 4.–P. 470-473.
177. Donnelly R.P., Loftus R.M., Keating S.E., Liou K.T., Biron C.A., Gardiner C.M., Finlay D.K. mTORC1-dependent metabolic reprogramming is a prerequisite for NK cell effector function // *J. Immunol.*–2014.–Vol. 193, no. 9.–P. 4477-4484.
178. Dos Santos D.R., Souza R.O., Dias L.B., Ribas T.B., de Oliveira L.C.F., Sumida D.H., Dornelles R.C.M., Nakamune A.C.M.S., Chaves-Neto A.H. The effects of storage time and temperature on the stability of salivary phosphatases, transaminases and dehydrogenase // *Arch. Oral. Biol.*–2018.–Vol. 85.–P. 160-165.
179. Doughty C.A., Bleiman B.F., Wagner D.J., Dufort F.J., Mataraza J.M., Roberts M.F., Chiles T.C. Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth // *Blood.*–2006.–Vol. 107, no. 11.–P. 4458-4465.
180. Dufort F.J., Gumina M.R., Ta N.L., Tao Y., Heyse S.A., Scott D.A., Richardson A.D., Seyfried T.N., Chiles T.C. Glucose-dependent de novo lipogenesis in B lymphocytes: a requirement for atp-citrate lyase in lipopolysaccharide-induced differentiation // *J. Biol. Chem.*–2014.–Vol. 289, no. 10.–P. 7011-7024.
181. Entrenas Castillo M., Entrenas Costa L.M., Vaquero Barrios J.M., Alcalá Díaz J.F., López Miranda J., Bouillon R., Quesada Gomez J.M. Effect of calcifediol treatment and best available therapy versus best available therapy on intensive care unit admission and mortality among patients hospitalized for COVID-19: A pilot randomized clinical study // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*–2020.–Vol. 203.–105751.
182. Evans R.M., Lippman S.M. Shining Light on the COVID-19 Pandemic: A Vitamin D Receptor Checkpoint in Defense of Unregulated Wound Healing // *Cell. Metab.*–2020.–Vol. 32, no. 5.–P. 704-709.

183. Everts B., Amiel E., Huang S.C., Smith A.M., Chang C.H., Lam W.Y., Redmann V., Freitas T.C., Blagih J., van der Windt G.J., Artyomov M.N., Jones R.G., Pearce E.L., Pearce E.J. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation // *Nat. Immunol.*–2014.–Vol. 15, no. 4.–P. 323-332.
184. Eweas A.F., Allam G. Targeting thioredoxin glutathione reductase as a potential antischistosomal drug target // *Mol. Biochem. Parasitol.*–2018.–Vol. 225.–P. 94-102.
185. Fajgenbaum D.C., Rader D.J. Teaching Old Drugs New Tricks: Statins for COVID-19? // *Cell Metab.*–2020.–Vol. 32, no. 2.–P. 145-147.
186. Fallah J., Rini B.I. HIF Inhibitors: Status of Current Clinical Development // *Curr. Oncol. Rep.*–2019.–Vol. 21, no. 1.–P. 6.
187. Fan S.N., Li X.Q., Ma F.H., Yang M.H., Su J., Chen X. Sulfur quantum dot based fluorescence assay for lactate dehydrogenase activity detection // *J. Photoch. Photobio. A.*–2022.–Vol. 430.–113989.
188. Farjana M., Moni A., Sohag A.A.M., Hasan A., Hannan M.A., Hossain M.G., Uddin M.J. Repositioning Vitamin C as a Promising Option to Alleviate Complications associated with COVID-19 // *Infect. Chemother.*–2020.–Vol. 52, no. 4.–P. 461-477.
189. Fatemi A., Ardehali S.H., Eslamian G., Noormohammadi M., Malek S. Association of vitamin D deficiency with COVID-19 severity and mortality in Iranian people: a prospective observational study // *Acute Crit. Care.*–2021.–Vol. 36, no. 4.–P. 300-307.
190. Fath M.K., Naderi M., Hamzavi H., Ganji M., Shabani S., Ghahroodi F.N., Khalesi B., Pourzardosht N., Hashemi Z.S., Khalili S. Molecular mechanisms and therapeutic effects of different vitamins and minerals in COVID-19 patients // *J. Trace Elem. Med. Biol.*–2022.–Vol. 73.–127044.
191. Feingold K.R., Grunfeld C. Effect of inflammation on HDL structure and function // *Curr. Opin. Lipidol.*–2016.–Vol. 27, no. 5.–P. 521-530.
192. Feingold K.R., Shigenaga J.K., Kazemi M.R., McDonald C.M., Patzek S.M., Cross A.S., Moser A., Grunfeld C. Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages // *J. Leukoc. Biol.*–2012.–Vol. 92, no. 4.–P. 829-839.
193. Fiorentino G., Coppola A., Izzo R., Annunziata A., Bernardo M., Lombardi A., Trimarco V., Santulli G., Trimarco B. Effects of adding L-arginine orally to standard therapy in patients with COVID-19: A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. Results of the first interim analysis // *EClinicalMedicine.*–2021.–Vol. 40.–101125.
194. Folkes L.K., Patel K.B., Wardman P., Wrona M. Kinetics of reaction of nitrogen dioxide with dihydorhodamine and the reaction of the dihydorhodamine radical with oxygen: implications for quantifying peroxynitrite formation in cells // *Arch. Biochem. Biophys.*–2009.–Vol. 484, no. 2.–P. 122-126.
195. Forcados C., Joaquina S., Casey N.P., Caulier B., Wälchli S. How CAR T Cells Breathe // *Cells.*–2022.–Vol. 11, no. 9.–P. 1454.
196. Forman H.J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis // *Mol. Aspects Med.*–2009.–Vol. 30, no. 1-2.–P. 1-12.
197. Fowler A.A. 3rd., Syed A.A., Knowlson S., Sculthorpe R., Farthing D., DeWilde C., Farthing C.A., Larus T.L., Martin E., Brophy D.F., Gupta S.; Medical Respiratory Intensive Care Unit Nursing; Fisher B.J., Natarajan R. Phase I safety trial of intravenous ascorbic acid in patients with severe sepsis // *J. Transl. Med.*–2014.–Vol. 12.–P. 32.
198. Frank L.A. Ca²⁺-regulated photoproteins: effective immunoassay reporters // *Sensors (Basel).*–2010.–Vol. 10, no. 12.–P. 11287-11300.
199. Frank L.A., Petunin A.I., Vysotski E.S. Bioluminescent immunoassay of thyrotropin and thyroxine using obelin as a label // *Anal. Biochem.*–2004.–Vol. 325, no. 2.–P. 240-246.
200. Fregni M., Ciribilli Y., Zawacka-Pankau J.E. The Therapeutic Potential of the Restoration of the p53 Protein Family Members in the EGFR-Mutated Lung Cancer // *Int. J. Mol. Sci.*–2022.–Vol. 23, no. 13.–P. 7213.

201. Freigang S., Ampenberger F., Weiss A., Kanneganti T.D., Iwakura Y., Hersberger M., Kopf M. Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling elicits inflammasome-independent IL-1 α and sterile vascular inflammation in atherosclerosis // *Nat. Immunol.*–2013.–Vol. 14, no. 10.–P. 1045-1053.
202. Fu W., Cai R., Ma Z., Li T., Lei C., Zhao J., Hu S. TIGIT-Fc as a Potential Therapeutic Agent for Fetomaternal Tolerance // *Front. Immunol.*–2021.–Vol. 12.–649135.
203. Fujii T., Luethi N., Young P.J., Frei D.R., Eastwood G.M., French C.J., Deane A.M., Shehabi Y., Hajjar L.A., Oliveira G., Udy A.A., Orford N., Edney S.J., Hunt A.L., Judd H.L., Bitker L., Cioccarri L., Naorungroj T., Yanase F., Bates S., McGain F., Hudson E.P., Al-Bassam W., Dwivedi D.B., Peppin C., McCracken P., Orosz J., Bailey M., Bellomo R.; VITAMINS Trial Investigators. Effect of Vitamin C, Hydrocortisone, and Thiamine vs Hydrocortisone Alone on Time Alive and Free of Vasopressor Support Among Patients With Septic Shock: The VITAMINS Randomized Clinical Trial // *JAMA.*–2020.–Vol. 323, no. 5.–P. 423-431.
204. Furuya A., Uozaki M., Yamasaki H., Arakawa T., Arita M., Koyama A.H. Antiviral effects of ascorbic and dehydroascorbic acids in vitro // *Int. J. Mol. Med.*–2008.–Vol. 22, no. 4.–P. 541-455.
205. Ganjali S., Bianconi V., Penson P.E., Pirro M., Banach M., Watts G.F., Sahebkar A. Commentary: Statins, COVID-19, and coronary artery disease: killing two birds with one stone // *Metabolism.*–2020.–Vol. 113.–154375.
206. Gargett T., Brown M.P. Different cytokine and stimulation conditions influence the expansion and immune phenotype of third-generation chimeric antigen receptor T cells specific for tumor antigen GD2 // *Cytotherapy.*–2015.–Vol. 17, no. 4.–P. 487-95.
207. Geiger R., Rieckmann J.C., Wolf T., Basso C., Feng Y., Fuhrer T., Kogadeeva M., Picotti P., Meissner F., Mann M., Zamboni N., Sallusto F., Lanzavecchia A. L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity // *Cell.*–2016.–Vol. 167, no. 3.–P. 829-842.
208. Georgakopoulou V.E., Mantzouranis K., Damaskos C., Karakou E., Melemini D., Mermigkis D., Petsinis G., Sklapani P., Trakas N., Tsiafaki X. Correlation Between Serum Levels of 25-Hydroxyvitamin D and Severity of Community-Acquired Pneumonia in Hospitalized Patients Assessed by Pneumonia Severity Index: An Observational Descriptive Study // *Cureus.*–2020.–Vol. 12, no. 7.–e8947.
209. Gerriets V.A., Kishton R.J., Nichols A.G., Macintyre A.N., Inoue M., Ilkayeva O., Winter P.S., Liu X., Priyadarshini B., Slawinska M.E., Haeberli L., Huck C., Turka L.A., Wood K.C., Hale L.P., Smith P.A., Schneider M.A., MacIver N.J., Locasale J.W., Newgard C.B., Shinohara M.L., Rathmell J.C. Metabolic programming and PDHK1 control CD4⁺ T cell subsets and inflammation // *J. Clin. Invest.*–2015.–Vol. 125, no. 1.–P. 194-207.
210. Ghasemi M., Abbasi L., Ghanbari Naeini L., Kokabian P., Nameh Goshay Fard N., Givtaj N. Dendritic cells and natural killer cells: The road to a successful oncolytic virotherapy // *Front. Immunol.*–2023.–Vol. 13.–950079.
211. Gil-Etayo F.J., Suárez-Fernández P., Cabrera-Marante O., Arroyo D., Garcinuño S., Naranjo L., Pleguezuelo D.E., Allende L.M., Mancebo E., Lalueza A., Díaz-Simón R., Paz-Artal E., Serrano A. T-Helper Cell Subset Response Is a Determining Factor in COVID-19 Progression // *Front. Cell. Infect. Microbiol.*–2021.–Vol. 11.–624483.
212. Giustina A. Hypovitaminosis D and the endocrine phenotype of COVID-19 // *Endocrine.*–2021.–Vol. 72, no. 1.–P. 1-11.
213. Goërtz Y.M.J., Van Herck M., Delbressine J.M., Vaes A.W., Meys R., Machado F.V.C., Houben-Wilke S., Burtin C., Posthuma R., Franssen F.M.E., van Loon N., Hajian B., Spies Y., Vijlbrief H., van 't Hul A.J., Janssen D.J.A., Spruit M.A. Persistent symptoms 3 months after a SARS-CoV-2 infection: the post-COVID-19 syndrome? // *ERJ Open Res.*–2020.–Vol. 6, no. 4.–P. 00542-2020.

214. Goldberg E.L., Molony R.D., Kudo E., Sidorov S., Kong Y., Dixit V.D., Iwasaki A. Ketogenic diet activates protective $\gamma\delta$ T cell responses against influenza virus infection // *Sci. Immunol.*–2019.–Vol. 4, no. 41.–eav2026.
215. Golovkin A., Kalinina O., Bezrukikh V., Aquino A., Zaikova E., Karonova T., Melnik O., Vasileva E., Kudryavtsev I. Imbalanced Immune Response of T-Cell and B-Cell Subsets in Patients with Moderate and Severe COVID-19 // *Viruses.*–2021.–Vol. 13.–P. 1966.
216. Gomez-Eerland R., Nuijen B., Heemskerk B., van Rooij N., van den Berg J.H., Beijnen J.H., Uckert W., Kvistborg P., Schumacher T.N., Haanen J.B., Jorritsma A. Manufacture of gene-modified human T-cells with a memory stem/central memory phenotype // *Hum. Gene Ther. Methods.*–2014.–Vol. 25, no. 5.–P. 277-287.
217. Goncalves M.D., Cantley L.C. A Glycolysis Outsider Steps into the Cancer Spotlight // *Cell. Metab.*–2018.–Vol. 28, no. 1.–P. 3-4.
218. Gönen M.S., Alaylıoğlu M., Durcan E., Özdemir Y., Şahin S., Konukoğlu D., Nohut O.K., Ürkmez S., Küçükece B., Balkan İ.İ., Kara H.V., Börekeçi Ş., Özkaya H., Kutlubay Z., Dikmen Y., Keskindemirci Y., Karras S.N., Annweiler C., Gezen-Ak D., Dursun E. Rapid and Effective Vitamin D Supplementation May Present Better Clinical Outcomes in COVID-19 (SARS-CoV-2) Patients by Altering Serum INOS1, IL1B, IFN γ , Cathelicidin-LL37, and ICAM1 // *Nutrients.*–2021.–Vol. 13, no. 11.–P. 4047.
219. Goodman K.E., Magder L.S., Baghdadi J.D., Pineles L., Levine A.R., Perencevich E.N., Harris A.D. Impact of Sex and Metabolic Comorbidities on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Mortality Risk Across Age Groups: 66 646 Inpatients Across 613 U.S. Hospitals // *Clin. Infect. Dis.*–2021.–Vol. 73, no. 11.–e4113-e4123.
220. Gotlieb N., Tachlytski I., Lapidot Y., Sultan M., Safran M., Ben-Ari Z. Hepatitis B virus downregulates vitamin D receptor levels in hepatoma cell lines, thereby preventing vitamin D-dependent inhibition of viral transcription and production // *Mol. Med.*–2018.–Vol. 24, no. 1.–P. 53.
221. Grangé S., Bekri S., Artaud-Macari E., Francois A., Girault C., Poitou A.L., Benhamou Y., Vianey-Saban C., Benoist J.F., Châtelet V., Tamion F., Guerrot D. Adult-onset renal thrombotic microangiopathy and pulmonary arterial hypertension in cobalamin C deficiency // *Lancet.*–2015.–Vol. 386, no. 9997.–P. 1011-1012.
222. Grant W.B., Al Anouti F., Boucher B.J., Dursun E., Gezen-Ak D., Jude E.B., Karonova T., Pludowski P. A Narrative Review of the Evidence for Variations in Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentration Thresholds for Optimal Health // *Nutrients.*–2022.–Vol. 14, no. 3.–P. 639.
223. Grant W.B., Lahore H., McDonnell S.L., Baggerly C.A., French C.B., Aliano J.L., Bhattoa H.P. Evidence that Vitamin D Supplementation Could Reduce Risk of Influenza and COVID-19 Infections and Deaths // *Nutrients.*–2020.–Vol. 12, no. 4.–P. 988.
224. Grimes J.M., Khan S., Badeaux M., Rao R.M., Rowlinson S.W., Carvajal R.D. Arginine depletion as a therapeutic approach for patients with COVID-19 // *Int. J. Infect. Dis.*–2021.–Vol. 102.–P. 566-570.
225. Gubser P.M., Bantug G.R., Razik L., Fischer M., Dimeloe S., Hoenger G., Durovic B., Jauch A., Hess C. Rapid effector function of memory CD8+ T cells requires an immediate-early glycolytic switch // *Nat. Immunol.*–2013.–Vol. 14, no. 10.–P. 1064-1072.
226. Guerra E., Di Pietro R., Basile M., Trerotola M., Alberti S. Cancer-Homing CAR-T Cells and Endogenous Immune Population Dynamics // *Int. J. Mol. Sci.*–2021.–Vol. 23, no. 1.–P. 405.
227. Guerra L., Bonetti L., Brenner D. Metabolic Modulation of Immunity: A New Concept in Cancer Immunotherapy // *Cell. Rep.*–2020.–Vol. 32, no. 1.–107848.
228. Gulic T., Laskarin G., Glavan L., Grubić Kezele T., Haller H., Rukavina D. Human Decidual CD1a+ Dendritic Cells Undergo Functional Maturation Program Mediated by Gp96 // *Int. J. Mol. Sci.*–2023.–Vol. 24, no. 3.–P. 2278.
229. Haddock S.H., Moline M.A., Case J.F. Bioluminescence in the sea // *Ann. Rev. Mar. Sci.*–2010.–Vol. 2.–P. 443-493.

230. Hallett M.B., Campbell A.K. Direct measurement of intracellular free Ca²⁺ in rat peritoneal macrophages: correlation with oxygen-radical production // *Immunology.*–1983.–Vol. 50, no. 3.–P. 487-495.
231. Halvorsen C.P., Olson L., Araújo A.C., Karlsson M., Nguyễn T.T., Khu D.T.K., Le H.T.T., Nguyễn H.T.B., Winblad B., Russom A. A rapid smartphone-based lactate dehydrogenase test for neonatal diagnostics at the point of care // *Sci. Rep.*–2019.–Vol. 9, no. 1.–P. 9301.
232. Hamilton J.A., Vairo G., Lingelbach S.R. CSF-1 stimulates glucose uptake in murine bone marrow-derived macrophages // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*–1986.–Vol. 138, no. 1.–P. 445-454.
233. Hariyanto T.I., Kurniawan A. Statin therapy did not improve the in-hospital outcome of coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection // *Diabetes Metab. Syndr.*–2020.–Vol. 14, no. 6.–P. 1613-1615.
234. Haschemi A., Kosma P., Gille L., Evans C.R., Burant C.F., Starkl P., Knapp B., Haas R., Schmid J.A., Jandl C., Amir S., Lubec G., Park J., Esterbauer H., Bilban M., Brizuela L., Pospisilik J.A., Otterbein L.E., Wagner O. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism // *Cell. Metab.*–2012.–Vol. 15, no. 6.–P. 813-826.
235. Haubrich B.A., Ramesha C., Swinney D.C. Development of a Bioluminescent High-Throughput Screening Assay for Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase (NMNAT) // *SLAS Discov.*–2020.–Vol. 25, no. 1.–P. 33-42.
236. Hayashi R., Nakatani H., Kawahata H., Fujie R., Kurowarabe K., Hayasaka H. Firefly luciferase-based chronological measurement of effector CD8⁺ T-cell activity using a multi-chamber luminometer // *Bioanalysis.*–2022.–Vol. 14, no. 22.–P. 1413-1421.
237. Hemilä H. Vitamin C and Infections // *Nutrients.*–2017.–Vol. 9, no. 4.–P. 339.
238. Hemilä H., Carr A., Chalker E. Vitamin C May Increase the Recovery Rate of Outpatient Cases of SARS-CoV-2 Infection by 70%: Reanalysis of the COVID A to Z Randomized Clinical Trial // *Front. Immunol.*–2021.–Vol. 12.–P. 674681.
239. Hemilä H., Chalker E. Vitamin C as a Possible Therapy for COVID-19 // *Infect. Chemother.*–2020.–Vol. 52, no. 2.–P. 222-223.
240. Hezam K., Wang C., Fu E., Zhou M., Liu Y., Wang H., Zhu L., Han Z., Han Z.C., Chang Y., Li Z. Superior protective effects of PGE2 priming mesenchymal stem cells against LPS-induced acute lung injury (ALI) through macrophage immunomodulation // *Stem Cell. Res. Ther.*–2023.–Vol. 14, no. 1.–P. 48.
241. Hikosaka K., Kim J., Kajita M., Kanayama A., Miyamoto Y. Platinum nanoparticles have an activity similar to mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase // *Colloids Surf. B Biointerfaces.*–2008.–Vol. 66, no. 2.–P. 195-200.
242. Hilkens C.M.U., Diboll J., Cooke F., Anderson A.E. In Vitro Generation of Human Tolerogenic Monocyte-Derived Dendritic Cells // *Methods Mol. Biol.*–2023.–Vol. 2654.–P. 477-492.
243. Hilser J.R., Han Y., Biswas S., Gukasyan J., Cai Z., Zhu R., Tang W.H.W., Deb A., Lusic A.J., Hartiala J.A., Allayee H. Association of serum HDL-cholesterol and apolipoprotein AI levels with risk of severe SARS-CoV-2 infection // *J. Lipid Res.*–2021.–Vol. 62.–P. 100061.
244. Hirabara S.M., Gorjao R., Levada-Pires A.C., Masi L.N., Hatanaka E., Cury-Boaventura M.F., da Silva E.B., Santos-Oliveira L.C.D., Sousa Diniz V.L., Serdan T.A.D., de Oliveira V.A.B., de Souza D.R., Gritte R.B., Souza-Siqueira T., Zambonato R.F., Pithon-Curi T.C., Bazotte R.B., Newsholme P., Curi R. Host cell glutamine metabolism as a potential antiviral target // *Clin. Sci. (Lond).*–2021.–Vol. 135, no. 2.–P. 305-325.
245. Ho P.C., Bihuniak J.D., Macintyre A.N., Staron M., Liu X., Amezcua R., Tsui Y.C., Cui G., Micevic G., Perales J.C., Kleinstein S.H., Abel E.D., Insogna K.L., Feske S., Locasale J.W., Bosenberg M.W., Rathmell J.C., Kaech S.M. Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses // *Cell.*–2015.–Vol. 162, no. 6.–P. 1217-1228.

246. Holford P., Carr A.C., Jovic T.H., Ali S.R., Whitaker I.S., Marik P.E., Smith A.D. Vitamin C-An Adjunctive Therapy for Respiratory Infection, Sepsis and COVID-19 // *Nutrients*.–2020.–Vol. 12, no. 12.–P. 3760.
247. Holick M.F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention // *Rev. Endocr. Metab. Disord.*–2017.–Vol. 18, no. 2.–P. 153-165.
248. Hopewell E.L., Cox C. Manufacturing Dendritic Cells for Immunotherapy: Monocyte Enrichment // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*–2020.–Vol. 16.–P. 155-160.
249. Horowitz R.I., Freeman P.R. Three novel prevention, diagnostic, and treatment options for COVID-19 urgently necessitating controlled randomized trials // *Med. Hypotheses*.–2020.–Vol. 143.–109851.
250. Hosaka S., Obuki M., Nakajima J., Suzuki M. Comparative study of antioxidants as quenchers or scavengers of reactive oxygen species based on quenching of MCLA-dependent chemiluminescence // *Luminescence*.–2005.–Vol. 20, no. 6.–P. 419-427.
251. Hu X., Chen D., Wu L., He G., Ye W. Declined serum high density lipoprotein cholesterol is associated with the severity of COVID-19 infection // *Clin. Chim. Acta.*–2020.–Vol. 510.–P. 105-110.
252. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China // *Lancet*.–2020.–Vol. 395, no. 10223.–P. 497-506.
253. Huang S.C., Everts B., Ivanova Y., O'Sullivan D., Nascimento M., Smith A.M., Beatty W., Love-Gregory L., Lam W.Y., O'Neill C.M., Yan C., Du H., Abumrad N.A., Urban J.F. Jr., Artyomov M.N., Pearce E.L., Pearce E.J. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages // *Nat. Immunol.*–2014.–Vol. 15, no. 9.–P. 846-855.
254. Iberg C.A., Hawiger D. Natural and Induced Tolerogenic Dendritic Cells // *J. Immunol.*–2020.–Vol. 204, no. 4.–P. 733-744.
255. Ichibangase T., Ohba Y., Kishikawa N., Nakashima K., Kuroda N. Evaluation of lophine derivatives as L-012 (luminol analog)-dependent chemiluminescence enhancers for measuring horseradish peroxidase and H₂O₂ // *Luminescence*.–2014.–Vol. 29, no. 2.–P. 118-121.
256. Infantino V., Convertini P., Cucci L., Panaro M.A., Di Noia M.A., Calvello R., Palmieri F., Iacobazzi V. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation // *Biochem J.*–2011.–Vol. 438, no. 3.–P. 433-436.
257. Izzo R., Trimarco V., Mone P., Aloè T., Capra Marzani M., Diana A., Fazio G., Mallardo M., Maniscalco M., Marazzi G., Messina N., Mininni S., Mussi C., Pelaia G., Pennisi A., Santus P., Scarpelli F., Tursi F., Zanolini A., Santulli G., Trimarco B. Combining L-Arginine with vitamin C improves long-COVID symptoms: The LINCOLN Survey // *Pharmacol. Res.*–2022.–Vol. 183.–106360.
258. Janssen R., Visser M.P.J., Dofferhoff A.S.M., Vermeer C., Janssens W., Walk J. Vitamin K metabolism as the potential missing link between lung damage and thromboembolism in Coronavirus disease 2019 // *Br. J. Nutr.*–2021.–Vol. 126, no. 2.–P. 191-198.
259. Jeng L.B., Liao L.Y., Shih F.Y., Teng C.F. Dendritic-Cell-Vaccine-Based Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma: Clinical Trials and Recent Preclinical Studies // *Cancers (Basel)*.–2022.–Vol. 14, no. 18.–P. 4380.
260. Jeong J., Suh Y., Jung K. Context Drives Diversification of Monocytes and Neutrophils in Orchestrating the Tumor Microenvironment // *Front. Immunol.*–2019.–Vol. 10.–1817.
261. Jha A.K., Huang S.C., Sergushichev A., Lampropoulou V., Ivanova Y., Loginicheva E., Chmielewski K., Stewart K.M., Ashall J., Everts B., Pearce E.J., Driggers E.M., Artyomov M.N. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization // *Immunity*.–2015.–Vol. 42, no. 3.–P. 419-430.
262. Jia H., Liu C., Li D., Huang Q., Liu D., Zhang Y., Ye C., Zhou D., Wang Y., Tan Y., Li K., Lin F., Zhang H., Lin J., Xu Y., Liu J., Zeng Q., Hong J., Chen G., Zhang H., Zheng L., Deng X.,

- Ke C., Gao Y., Fan J., Di B., Liang H. Metabolomic analyses reveal new stage-specific features of COVID-19 // *Eur. Respir. J.*–2022.–Vol. 59, no. 2.–2100284.
263. Jiang X., Wu X., Xiao Y., Wang P., Zheng J., Wu X., Jin Z. The ectonucleotidases CD39 and CD73 on T cells: The new pillar of hematological malignancy // *Front. Immunol.*–2023.–Vol. 14.–1110325.
264. Jin H., Wang S., Zaal E.A., Wang C., Wu H., Bosma A., Jochems F., Isima N., Jin G., Liefink C., Beijersbergen R., Berkers C.R., Qin W., Bernards R. A powerful drug combination strategy targeting glutamine addiction for the treatment of human liver cancer // *Elife.*–2020.–Vol. 9.–e56749.
265. Jin J., Byun J.K., Choi Y.K., Park K.G. Targeting glutamine metabolism as a therapeutic strategy for cancer // *Exp. Mol. Med.*–2023.–Vol. 55, no. 4.–P. 706-715.
266. Johnston C.S., Martin L.J., Cai X. Antihistamine effect of supplemental ascorbic acid and neutrophil chemotaxis // *J. Am. Coll. Nutr.*–1992.–Vol. 11, no. 2.–P. 172-176.
267. Juillerat A., Marechal A., Filhol J.M., Valogne Y., Valton J., Duclert A., Duchateau P., Poirot L. An oxygen sensitive self-decision making engineered CAR T-cell // *Sci. Rep.*–2017.–Vol. 7.–39833.
268. Kaiser A.D., Assenmacher M., Schröder B., Meyer M., Orentas R., Bethke U., Dropulic B. Towards a commercial process for the manufacture of genetically modified T cells for therapy // *Cancer Gene Ther.*–2015.–Vol. 22, no. 2.–P. 72-78.
269. Kalyanaraman B., Dranka B.P., Hardy M., Michalski R., Zielonka J. HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidine-based fluorogenic probes – the ultimate approach for intra- and extracellular superoxide detection // *Biochim. Biophys. Acta.*–2014.–Vol. 1840.–P. 739-744.
270. Kamali A.N., Bautista J.M., Eisenhut M., Hamedifar H. Immune checkpoints and cancer immunotherapies: insights into newly potential receptors and ligands // *Ther. Adv. Vaccines Immunother.*–2023.–Vol. 11.–25151355231192043.
271. Kannan B., Jahanshahi-Anbuhi S., Pelton R.H., Li Y., Filipe C.D., Brennan J.D. Printed paper sensors for serum lactate dehydrogenase using pullulan-based inks to immobilize reagents // *Anal. Chem.*–2015.–Vol. 87, no. 18.–P. 9288-9293.
272. Katturajan R., Nithiyandam S., Parthasarathy M., Gopalakrishnan A.V., Sathiyamoorthi E., Lee J., Ramesh T., Iyer M., Prince S.E., Ganesan R. Immunomodulatory Role of Thioredoxin Interacting Protein in Cancer's Impediments: Current Understanding and Therapeutic Implications // *Vaccines (Basel).*–2022.–Vol. 10, no. 11.–P. 1902.
273. Kawalekar O.U., O'Connor R.S., Fraietta J.A., Guo L., McGettigan S.E., Posey A.D. Jr., Patel P.R., Guedan S., Scholler J., Keith B., Snyder N.W., Blair I.A., Milone M.C., June C.H. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells // *Immunity.*–2016.–Vol. 44, no. 2.–P. 380-390.
274. Keil S.D., Ragan I., Yonemura S., Hartson L., Dart N.K., Bowen R. Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in plasma and platelet products using a riboflavin and ultraviolet light-based photochemical treatment // *Vox. Sang.*–2020.–Vol. 115, no. 6.–P. 495-501.
275. Kelderman S., Heemskerck B., van Tinteren H., van den Brom R.R., Hospers G.A., van den Eertwegh A.J., Kapiteijn E.W., de Groot J.W., Soetekouw P., Jansen R.L., Fiets E., Furness A.J., Renn A., Krzystanek M., Szallasi Z., Lorigan P., Gore M.E., Schumacher T.N., Haanen J.B., Larkin J.M., Blank C.U. Lactate dehydrogenase as a selection criterion for ipilimumab treatment in metastatic melanoma // *Cancer Immunol. Immunother.*–2014.–Vol. 63, no. 5.–P. 449-458.
276. Kell A.M., Gale M. Jr. RIG-I in RNA virus recognition // *Virology.*–2015.–Vol. 3.–P. 479-480.
277. Kelly D., Wischmeyer P.E. Role of L-glutamine in critical illness: new insights // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*–2003.–Vol. 6, no. 2.–P. 217-222.
278. Kimhofer T., Lodge S., Whiley L., Gray N., Loo R.L., Lawler N.G., Nitschke P., Bong S.H., Morrison D.L., Begum S., Richards T., Yeap B.B., Smith C., Smith K.G.C., Holmes E., Nicholson J.K. Integrative Modeling of Quantitative Plasma Lipoprotein, Metabolic, and Amino Acid Data

- Reveals a Multiorgan Pathological Signature of SARS-CoV-2 Infection // *J. Proteome Res.*–2020.–Vol. 19, no. 11.–P. 4442-4454.
279. Koda S., Hu J., Ju X., Sun G., Shao S., Tang R.X., Zheng K.Y., Yan J. The role of glutamate receptors in the regulation of the tumor microenvironment // *Front. Immunol.*–2023.–Vol. 14.–1123841.
 280. Kollias A., Kyriakoulis K.G., Kyriakoulis I.G., Nitsotolis T., Poulakou G., Stergiou G.S., Syrigos K. Statin use and mortality in COVID-19 patients: Updated systematic review and meta-analysis // *Atherosclerosis.*–2021.–Vol. 330.–P. 114-121.
 281. Kolostova K., Pospisilova E., Matkowski R., Szelachowska J., Bobek V. Immune activation of the monocyte-derived dendritic cells using patients own circulating tumor cells // *Cancer Immunol. Immunother.*–2022.–Vol. 71, no. 12.–P. 2901-2911.
 282. Krawczyk C.M., Holowka T., Sun J., Blagih J., Amiel E., DeBerardinis R.J., Cross J.R., Jung E., Thompson C.B., Jones R.G., Pearce E.J. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation // *Blood.*–2010.–Vol. 115, no. 23.–P. 4742-4749.
 283. Kudryasheva N.S. Bioluminescence and exogenous compounds: physico-chemical basis for bioluminescent assay // *J. Photochem. Photobiol B.*–2006.–Vol. 83, no. 1.–P. 77-86.
 284. Kudryavtsev I., Rubinstein A., Golovkin A., Kalinina O., Vasilyev K., Rudenko L., Isakova-Sivak I. Dysregulated Immune Responses in SARS-CoV-2-Infected Patients: A Comprehensive Overview // *Viruses.*–2022.–Vol. 14.–P. 1082.
 285. Kudryavtsev I.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Isakov D.V., Rubinstein A.A., Batsunov O.K., Khamitova I.V., Kuznetsova R.N., Savin T.V., Akisheva T.V., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Heterogenous CD8+ T Cell Maturation and ‘Polarization’ in Acute and Convalescent COVID-19 Patients // *Viruses.*–2022.–Vol. 14.–P. 1906.
 286. Kumar S., Holmgren A. Induction of thioredoxin, thioredoxin reductase and glutaredoxin activity in mouse skin by TPA, a calcium ionophore and other tumor promoters // *Carcinogenesis.*–1999.–Vol. 20, no. 9.–P. 1761-1767.
 287. Lalu M.M., Kekre N., Montroy J., Ghiasi M., Hay K., McComb S., Weeratna R., Atkins H., Hutton B., Yahya A., Masurekar A., Sobh M., Fergusson D.A. Identifying effect modifiers of CAR-T cell therapeutic efficacy: a systematic review and individual patient data meta-analysis protocol // *Syst. Rev.*–2023.–Vol. 12, no. 1.–P. 9.
 288. Layhadi J.A., Fountain S.J. ATP-Evoked Intracellular Ca²⁺ Responses in M-CSF Differentiated Human Monocyte-Derived Macrophage are Mediated by P2X₄ and P2Y₁₁ Receptor Activation // *Int. J. Mol. Sci.*–2019.–Vol. 20, no. 20.–P. 5113.
 289. Lazar Neto F., Salzstein G.A., Cortez A.L., Bastos T.L., Baptista F.V.D., Moreira J.A., Lauterbach G.P., de Oliveira J.C., de Assis F.C., Aguiar M.R.A., de Deus A.A., Dias MFDS, Sousa FCB, Duailibi DF, Kondo RH, de Moraes ACF, Martins MA. Comparative assessment of mortality risk factors between admission and follow-up models among patients hospitalized with COVID-19 // *Int. J. Infect. Dis.*–2021.–Vol. 105.–P. 723-729.
 290. Lee G.K., Park H.J., Macleod M., Chandler P., Munn D.H., Mellor A.L. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division // *Immunology.*–2002.–Vol. 107, no. 4.–P. 452-460.
 291. Lee G.Y., Han S.N. The Role of Vitamin E in Immunity // *Nutrients.*–2018.–Vol. 10, no. 11.–P. 1614.
 292. Lee G.K., Park H.J., Macleod M., Chandler P., Munn D.H., Mellor A.L. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division // *Immunology.*–2002.–Vol. 107, no. 4.–P. 452-460.
 293. Lee J., Walsh M.C., Hoehn K.L., James D.E., Wherry E.J., Choi Y. Regulator of fatty acid metabolism, acetyl coenzyme a carboxylase 1, controls T cell immunity // *J. Immunol.*–2014.–Vol. 192, no. 7.–P. 3190-3199.
 294. Lee W., Ahn J.H., Park H.H., Kim H.N., Kim H., Yoo Y., Shin H., Hong K.S., Jang J.G., Park C.G., Choi E.Y., Bae J.S., Seo Y.K. COVID-19-activated SREBP2 disturbs cholesterol

- biosynthesis and leads to cytokine storm // *Signal Transduct. Target Ther.*–2020.–Vol. 5, no. 1.–P. 186.
295. Lee W.S., Kang T., Kwak K.J., Park K., Yi S.Y., Lee U.J., Shin Y.B., Jeong J. Simple, rapid, and accurate malaria diagnostic platform using microfluidic-based immunoassay of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase // *Nano Converg.*–2020.–Vol. 7, no. 1.–P. 13.
296. Lemos H., Huang L., Prendergast G.C., Mellor A.L. Immune control by amino acid catabolism during tumorigenesis and therapy // *Nat. Rev. Cancer.*–2019.–Vol. 19, no. 3.–P. 162-175.
297. Levine B.L., Miskin J., Wonnacott K., Keir C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*–2016.–Vol. 4.–P. 92-101.
298. Li J., Zhou J., Huang H., Jiang J., Zhang T., Ni C. Mature dendritic cells enriched in immunoregulatory molecules (mregDCs): A novel population in the tumour microenvironment and immunotherapy target // *Clin. Transl. Med.*–2023.–Vol. 13, no. 2.–e1199.
299. Li Y., Zhang Y., Lu R., Dai M., Shen M., Zhang J., Cui Y., Liu B., Lin F., Chen L., Han D., Fan Y., Zeng Y., Li W., Li S., Chen X., Li H., Pan P. Lipid metabolism changes in patients with severe COVID-19 // *Clin. Chim. Acta.*–2021.–Vol. 517.–P. 66-73.
300. Li Y.R., Zhou Y., Wilson M., Kramer A., Hon R., Zhu Y., Fang Y., Yang L. Tumor-Localized Administration of α -GalCer to Recruit Invariant Natural Killer T Cells and Enhance Their Antitumor Activity against Solid Tumors // *Int. J. Mol. Sci.*–2022.–Vol. 23, no. 14.–P. 7547.
301. Lindner D.J., Borden E.C., Kalvakolanu D.V. Synergistic antitumor effects of a combination of interferons and retinoic acid on human tumor cells in vitro and in vivo // *Clin. Cancer Res.*–1997.–Vol. 3, no. 6.–P. 931-937.
302. Links between metabolism and cancer // *Genes Dev.*–2012.–Vol. 26, no. 9.–P. 877-890.
303. Lionetto L., Ulivieri M., Capi M., De Bernardini D., Fazio F., Petrucca A., Pomes L.M., De Luca O., Gentile G., Casolla B., Curto M., Salerno G., Schillizzi S., Torre M.S., Santino I., Rocco M., Marchetti P., Aceti A., Ricci A., Bonfini R., Nicoletti F., Simmaco M., Borro M. Increased kynurenine-to-tryptophan ratio in the serum of patients infected with SARS-CoV2: An observational cohort study // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.*–2021.–Vol. 1867, no. 3.–P. 166042.
304. Lippman S.M., Glisson B.S., Kavanagh J.J., Lotan R., Hong W.K., Paredes-Espinoza M., Hittelman W.N., Holdener E.E., Krakoff I.H. Retinoic acid and interferon combination studies in human cancer // *Eur. J. Cancer.*–1993.–Vol. 29A, Suppl. 5.–S9-S13.
305. Lips P., de Jongh R.T., van Schoor N.M. Trends in Vitamin D Status Around the World // *JBMR Plus.*–2021.–Vol. 5, no. 12.–e10585.
306. Liu C., Yan W., Shi J., Wang S., Peng A., Chen Y., Huang K. Biological Actions, Implications, and Cautions of Statins Therapy in COVID-19 // *Front. Nutr.*–2022.–Vol. 9.–927092.
307. Liu J., Amini A., Govindarajan A., Abuali T., Mambetsariev I., Massarelli E., Villaflor V., Villalona-Calero M., West H., Williams T., Salgia R. Targeted Therapies in Early-Stage Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer: New Kids on the Block // *JCO Precis. Oncol.*–2023.–Vol. 7.–e2200445.
308. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., Li W., Tong Q., Yi J., Zhao L., Xiong L., Guo C., Tian J., Luo J., Yao J., Pang R., Shen H., Peng C., Liu T., Zhang Q., Wu J., Xu L., Lu S., Wang B., Weng Z., Han C., Zhu H., Zhou R., Zhou H., Chen X., Ye P., Zhu B., Wang L., Zhou W., He S., He Y., Jie S., Wei P., Zhang J., Lu Y., Wang W., Zhang L., Li L., Zhou F., Wang J., Dittmer U., Lu M., Hu Y., Yang D., Zheng X. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients // *EBioMedicine.*–2020.–Vol. 55.–P. 102763.
309. Liu J.J., Movassat J., Portha B. Emerging role for kynurenines in metabolic pathologies // *Curr. Opin. Nutr. Metab. Care.*–2019.–Vol. 22, no. 1.–P. 82-90.
310. Liu P., Kang C., Zhang J., Liu Y., Liu J., Hu T., Zeng X., Qiu S. The role of dendritic cells in allergic diseases // *Int. Immunopharmacol.*–2022.–Vol. 113, Pt. B.–P. 109449.

311. Liu Y., Lv J., Liu J., Li M., Xie J., Lv Q., Deng W., Zhou N., Zhou Y., Song J., Wang P., Qin C., Tong W.M., Huang B. Mucus production stimulated by IFN-AhR signaling triggers hypoxia of COVID-19 // *Cell Res.*–2020.–Vol. 30, no. 12.–P. 1078-1087.
312. Liu Z. Antioxidant activity of the thioredoxin system // *Biophys. Rep.*–2023.–Vol. 9, no. 1.–P. 26-32.
313. Lomakina G.Y., Ugarova N.N. Bioluminescent test systems based on firefly luciferase for studying stress effects on living cells // *Biophys. Rev.*–2022.–Vol. 14, no. 4.–P. 887-892.
314. Loucera C., Peña-Chilet M., Esteban-Medina M., Muñozerro-Muñiz D., Villegas R., Lopez-Miranda J., Rodriguez-Baño J., Túnez I., Bouillon R., Dopazo J., Quesada Gomez J.M. Real world evidence of calcifediol or vitamin D prescription and mortality rate of COVID-19 in a retrospective cohort of hospitalized Andalusian patients // *Sci. Rep.*–2021.–Vol. 11, no. 1.–P. 23380.
315. Lyublinskaya O.G., Zenin V.V., Shatrova A.N., Aksenov N.D., Zemelko V.I., Domnina A.P., Litanyuk A.P., Burova E.B., Gubarev S.S., Negulyaev Y.A., Nikolsky N.N. Intracellular oxidation of hydroethidine: compartmentalization and cytotoxicity of oxidation products // *Free Radic. Biol. Med.*–2014.–Vol. 75.–P. 60-68.
316. Ma Y., Shi L., Lu P., Yao S., Xu H., Hu J., Liang X., Liang X., Wei S. Creation of a Novel Nomogram Based on the Direct Bilirubin-To-Indirect Bilirubin Ratio and Lactate Dehydrogenase Levels in Resectable Colorectal Cancer // *Front. Mol. Biosci.*–2021.–Vol. 8.–751506.
317. Maeda H., Yamamoto K., Nomura Y., Kohno I., Hafsi L., Ueda N., Yoshida S., Fukuda M., Fukuyasu Y., Yamauchi Y., Itoh N. A design of fluorescent probes for superoxide based on a nonredox mechanism // *J. Am. Chem. Soc.*–2005.–Vol. 127, no 1.–P. 68-69.
318. Mann E.R., Menon M., Knight S.B., Konkel J.E., Jagger C, Shaw T.N., Krishnan S., Rattray M., Ustianowski A., Bakerly N.D., Dark P., Lord G., Simpson A., Felton T., Ho L.P.; NIHR Respiratory TRC; Feldmann M.; CIRCO; Grainger J.R., Hussell T. Longitudinal immune profiling reveals key myeloid signatures associated with COVID-19 // *Sci. Immunol.*–2020.–Vol. 5, no. 51.–eabd6197.
319. Marcello A., Civra A., Milan Bonotto R., Nascimento Alves L., Rajasekharan S., Giacobone C., Caccia C., Cavalli R., Adami M., Brambilla P., Lembo D., Poli G., Leoni V. The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol inhibits SARS-CoV-2 and is markedly decreased in COVID-19 patients // *Redox. Biol.*–2020.–Vol. 36.–101682.
320. Marmonti E., Oliva-Ramirez J., Haymaker C. Dendritic Cells: The Long and Evolving Road towards Successful Targetability in Cancer // *Cells.*–2022.–Vol. 11, no. 19.–P. 3028.
321. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Oldridge D.A., Greenplate A.R., Wu J.E., Alanio C., Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., D'Andrea K., Manne S., Chen Z., Huang Y.J., Reilly J.P., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Kuthuru O., Dougherty J., Nzingha K., Han N., Kim J., Pattekar A., Goodwin E.C., Anderson E.M., Weirick M.E., Gouma S., Arevalo C.P., Bolton M.J., Chen F., Lacey S.F., Ramage H., Cherry S., Hensley S.E., Apostolidis S.A., Huang A.C., Vella L.A.; UPenn COVID Processing Unit; Betts M.R., Meyer N.J., Wherry E.J. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications // *Science.*–2020.–Vol. 369, no. 6508.–eabc8511.
322. Medha Pandya, Sejal Shah, Dhanalakshmi Menamadathil, Ayushman Gadnayak, Tanzil Juneja, Amisha G. Patel, K. Das, Jayashankar Das Unravelling Vitamins as Wonder Molecules for Covid-19 Management via Structure-based Virtual Screening // Preprint: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-144177/v1>
323. Medina E., Hartl D. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Infection: A General Overview // *J. Innate Immun.*–2018.–Vol. 10, no. 5-6.–P. 407-413.
324. Mégarbane B. Statin Therapy to Improve Outcome of COVID-19 Patients: Useful or Not Useful? // *J. Pers. Med.*–2022.–Vol. 12, no. 10.–P. 1627.
325. Meier J.L. Metabolic mechanisms of epigenetic regulation // *ACS Chem. Biol.*–2013.–Vol. 8, no. 12.–P. 2607-2621.

326. Melano I, Kuo L.L., Lo Y.C., Sung P.W., Tien N., Su W.C. Effects of Basic Amino Acids and Their Derivatives on SARS-CoV-2 and Influenza-A Virus Infection // *Viruses*.–2021.–Vol. 13, no. 7.–P. 1301.
327. Meydani S.N., Lewis E.D., Wu D. Perspective: Should Vitamin E Recommendations for Older Adults Be Increased? // *Adv. Nutr.*–2018.–Vol. 9, no. 5.–P. 533-543.
328. Meydani S.N., Meydani M., Blumberg J.B., Leka L.S., Siber G., Loszewski R., Thompson C., Pedrosa M.C., Diamond R.D., Stollar B.D. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial // *JAMA*.–1997.–Vol. 277, no. 17.–P. 1380-1386.
329. Michalek R.D., Gerriets V.A., Jacobs S.R., Macintyre A.N., MacIver N.J., Mason E.F., Sullivan S.A., Nichols A.G., Rathmell J.C. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets // *J. Immunol.*–2011.–Vol. 186, no. 6.–P. 3299-32303.
330. Michl J., Ohlbaum D.J., Silverstein S.C. 2-Deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. I. Description of the inhibitory effect // *J. Exp. Med.*–1976.–Vol. 144, no. 6.–P. 1465-1483.
331. Mikkelsen K., Prakash M.D., Kuol N., Nurgali K., Stojanovska L., Apostolopoulos V. Anti-Tumor Effects of Vitamin B2, B6 and B9 in Promonocytic Lymphoma Cells // *Int. J. Mol. Sci.*–2019.–Vol. 20, no. 15.–P. 3763.
332. Mikkelsen K., Stojanovska L., Prakash M., Apostolopoulos V. The effects of vitamin B on the immune/cytokine network and their involvement in depression // *Maturitas*.–2017.–Vol. 96.–P. 58-71.
333. Modiano J.F., Smith R. 3rd, Wojcieszyn J., Thomas J.S., Rosenbaum B.A., Ball C., Nicholds E.A., Anthony M.A., Barton C.L. The use of cytochemistry, immunophenotyping, flow cytometry, and in vitro differentiation to determine the ontogeny of a canine monoblastic leukemia // *Vet. Clin. Pathol.*–1998.–Vol. 27, no. 2.–P. 40-49.
334. Molenaar R.J., Khurshed M., Hira V.V.V., Van Noorden C.J.F. Metabolic Mapping: Quantitative Enzyme Cytochemistry and Histochemistry to Determine the Activity of Dehydrogenases in Cells and Tissues // *J. Vis. Exp.*–2018.–no. 135.–P. 56843.
335. Møller S.H., Wang L., Ho P.C. Metabolic programming in dendritic cells tailors immune responses and homeostasis // *Cell. Mol. Immunol.*–2022.–Vol. 19, no. 3.–P. 370-383.
336. Monti N., Cucina A. Fibrosis: A Role for Vitamin D // *Organisms Journal*.–2020.–Vol. 4.–P. 26-41.
337. Moon J.S., Lee S., Park M.A., Siempos I.I., Haslip M., Lee P.J., Yun M., Kim C.K., Howrylak J., Ryter S.W., Nakahira K., Choi A.M. UCP2-induced fatty acid synthase promotes NLRP3 inflammasome activation during sepsis // *J. Clin. Invest.*–2015.–Vol. 125, no. 2.–P. 665-680.
338. Morales-Borges R.H., Gonzalez M.J., Duconge J., Minich D.M. N-Acetyl Cysteine and Glutathione in Health and Cancer-Pharmacogenomics, Research, and Clinical Practice: Hypothesis and Review // *Altern. Ther. Health Med.*–2022.–Vol. 28, no. 7.–P. 169-177.
339. Morisaki T., Morisaki T., Kubo M., Morisaki S., Nakamura Y., Onishi H. Lymph Nodes as Anti-Tumor Immunotherapeutic Tools: Intranodal-Tumor-Specific Antigen-Pulsed Dendritic Cell Vaccine Immunotherapy // *Cancers (Basel)*.–2022.–Vol. 14, no. 10.–P. 2438.
340. Morris S.M. Jr. Arginine Metabolism Revisited // *J. Nutr.*–2016.–Vol. 146, no. 12.–P. 2579S-2586S.
341. Mrityunjaya M., Pavithra V., Neelam R., Janhavi P., Halami P.M., Ravindra P.V. Immune-Boosting, Antioxidant and Anti-inflammatory Food Supplements Targeting Pathogenesis of COVID-19 // *Front. Immunol.*–2020.–Vol. 11.–570122.
342. Mulherkar T.H., Gómez D.J., Sandel G., Jain P. Co-Infection and Cancer: Host-Pathogen Interaction between Dendritic Cells and HIV-1, HTLV-1, and Other Oncogenic Viruses // *Viruses*.–2022.–Vol. 14, no. 9.–P. 2037.
343. Mullen N.J., Singh P.K. Nucleotide metabolism: a pan-cancer metabolic dependency // *Nat. Rev. Cancer*.–2023.–Vol. 23, no. 5.–P. 275-294.

344. Munn D.H., Mellor A.L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses // *Trends Immunol.*–2013.–Vol. 34, no. 3.–P. 137-143.
345. Muralidharan J., Kashyap S., Jacob M., Ollapally A., Idiculla J., Raj J.M., Thomas T., Kurpad A.V. The effect of l-arginine supplementation on amelioration of oxygen support in severe COVID-19 pneumonia // *Clin. Nutr. ESPEN S. P.*–2022.–Vol. 52.–P. 431-435.
346. Muri J., Kopf M. The thioredoxin system: Balancing redox responses in immune cells and tumors // *Eur. J. Immunol.*–2023.–Vol. 53, no. 1.–e2249948.
347. Muscogiuri G., Barrea L., Savastano S., Colao A. Nutritional recommendations for COVID-19 quarantine // *Eur. J. Clin. Nutr.*–2020.–Vol. 74, no. 6.–P. 850-851.
348. Muscogiuri G., Barrea L., Scannapieco M., Di Somma C., Scacchi M., Aimaretti G., Savastano S., Colao A., Marzullo P. The lullaby of the sun: the role of vitamin D in sleep disturbance // *Sleep Med.*–2019.–Vol. 54.–P. 262-265.
349. Nagai A., Matsumiya H., Hayashi M., Yasui S., Okamoto H., Konno K. Effects of nicotinamide and niacin on bleomycin-induced acute injury and subsequent fibrosis in hamster lungs // *Exp. Lung Res.*–1994.–Vol. 20, no. 4.–P. 263-281.
350. Nakaya M., Xiao Y., Zhou X., Chang J.H., Chang M., Blonska M., Lin X., Sun S.C. Inflammatory T cell responses rely on amino acid transporter ASCT2 facilitation of glutamine uptake and mTORC1 kinase activation // *Immunity.*–2014.–Vol. 40, no. 5.–P. 692-705.
351. Nasrollahi H., Talepoor A.G., Saleh Z., Eshkevar Vakili M., Heydarinezhad P., Karami N., Noroozi M., Meri S., Kalantar K. Immune responses in mildly versus critically ill COVID-19 patients // *Front. Immunol.*–2023.–Vol. 14.–1077236.
352. Navas L.E., Carnero A. Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) Metabolism as a Relevant Target in Cancer // *Cells.*–2022.–Vol. 11, no. 17.–P. 2627.
353. Newsholme P., Curi R., Gordon S., Newsholme E.A. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages // *Biochem. J.*–1986.–Vol. 239, no. 1.–P. 121-125.
354. Nguyen N.T., Hanieh H., Nakahama T., Kishimoto T. The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses // *Int. Immunol.*–2013.–Vol. 25, no. 6.–P. 335-343.
355. Nie X., Qian L., Sun R., Huang B., Dong X., Xiao Q., Zhang Q., Lu T., Yue L., Chen S., Li X., Sun Y., Li L., Xu L., Li Y., Yang M., Xue Z., Liang S., Ding X., Yuan C., Peng L., Liu W., Yi X., Lyu M., Xiao G., Xu X., Ge W., He J., Fan J., Wu J., Luo M., Chang X., Pan H., Cai X., Zhou J., Yu J., Gao H., Xie M., Wang S., Ruan G., Chen H., Su H., Mei H., Luo D., Zhao D., Xu F., Li Y., Zhu Y., Xia J., Hu Y., Guo T. Multi-organ proteomic landscape of COVID-19 autopsies // *Cell.*–2021.–Vol. 184, no. 3.–P. 775-791.
356. Niedźwiedzka-Rystwej P., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W. Reactivity of selected markers of innate and adaptive immunity in rabbits experimentally infected with antigenic variants of RHD (Lagovirus europaeus/GI.1a) // *Vet. Res. Commun.*–2022.–Vol. 46, no. 1.–P. 233-242.
357. Oka S.I., Titus A.S., Zablocki D., Sadoshima J. Molecular properties and regulation of NAD⁺ kinase (NADK) // *Redox. Biol.*–2023.–Vol. 59.–P. 102561.
358. O'Neill L.A., Kishton R.J., Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists // *Nat. Rev. Immunol.*–2016.–Vol. 16, no. 9.–P. 553-565.
359. Oristrell J., Oliva J.C., Casado E., Subirana I., Domínguez D., Toloba A., Balado A., Grau M. Vitamin D supplementation and COVID-19 risk: a population-based, cohort study // *J. Endocrinol. Invest.*–2022.–Vol. 45, no. 1.–P. 167-179.
360. Ortega M.A., De Leon-Oliva D., García-Montero C., Fraile-Martinez O., Boaru D.L., de Castro A.V., Saez M.A., Lopez-Gonzalez L., Bujan J., Alvarez-Mon M.A., García-Honduvilla N., Diaz-Pedrero R., Alvarez-Mon M. Reframing the link between metabolism and NLRP3 inflammasome: therapeutic opportunities // *Front. Immunol.*–2023.–Vol. 14.–1232629.
361. Oscanoa T.J., Amado J., Vidal X., Laird E., Ghashut R.A., Romero-Ortuno R. The relationship between the severity and mortality of SARS-CoV-2 infection and 25-hydroxyvitamin D concentration - a metaanalysis // *Adv. Respir. Med.*–2021.–Vol. 89, no. 2.–P. 145-157.

362. O'Sullivan D., van der Windt G.J., Huang S.C., Curtis J.D., Chang C.H., Buck M.D., Qiu J., Smith A.M., Lam W.Y., DiPlato L.M., Hsu F.F., Birnbaum M.J., Pearce E.J., Pearce E.L. Memory CD8(+) T cells use cell-intrinsic lipolysis to support the metabolic programming necessary for development // *Immunity*.–2014.–Vol. 41, no. 1.–P. 75-88.
363. Outten C.E., Culotta V.C. A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae* // *EMBO J.*–2003.–Vol. 22, no. 9.–P. 2015-2024.
364. Padayatty S.J., Doppman J.L., Chang R., Wang Y., Gill J., Papanicolaou D.A., Levine M. Human adrenal glands secrete vitamin C in response to adrenocorticotrophic hormone // *Am. J. Clin. Nutr.*–2007.–Vol. 86, no. 1.–Vol. 145-149.
365. Padgett L.E., Araujo D.J., Hedrick C.C., Olingy C.E. Functional crosstalk between T cells and monocytes in cancer and atherosclerosis // *J. Leukoc. Biol.*–2020.–Vol. 108, no. 1.–P. 297-308.
366. Palazon A., Goldrath A.W., Nizet V., Johnson R.S. HIF transcription factors, inflammation, and immunity // *Immunity*.–2014.–Vol. 41, no. 4.–P. 518-528.
367. Palmer C.S., Cherry C.L., Sada-Ovalle I., Singh A., Crowe S.M. Glucose Metabolism in T Cells and Monocytes: New Perspectives in HIV Pathogenesis // *EBioMedicine*.–2016.–Vol. 6.–P. 31-41.
368. Palsson-McDermott E.M., Curtis A.M., Goel G., Lauterbach M.A., Sheedy F.J., Gleeson L.E., van den Bosch M.W., Quinn S.R., Domingo-Fernandez R., Johnston D.G., Jiang J.K., Israelsen W.J., Keane J., Thomas C., Clish C., Vander Heiden M., Xavier R.J., O'Neill L.A. Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages // *Cell. Metab.*–2015.–Vol. 21, no. 1.–P. 65-80.
369. Papaneophytou C., Zervou M.E., Theofanous A. Optimization of a Colorimetric Assay to Determine Lactate Dehydrogenase B Activity Using Design of Experiments // *SLAS Discov.*–2021.–Vol. 26, no. 3.–P. 383-399.
370. Pastor-Anglada M., Pérez-Torras S. Emerging Roles of Nucleoside Transporters // *Front. Pharmacol.*–2018.–Vol. 9.–P. 606.
371. Patel J.J., Miller K.R., Rosenthal C., Rosenthal M.D. When Is It Appropriate to Use Arginine in Critical Illness? // *Nutr. Clin. Pract.*–2016.–Vol. 31, no. 4.–P. 438-444.
372. Pedrazzini M.C., da Silva M.H., Groppo F.C. L-lysine: Its antagonism with L-arginine in controlling viral infection. Narrative literature review // *Br. J. Clin. Pharmacol.*–2022.–Vol. 88, no. 11.–P. 4708-4723.
373. Pei R., Feng J., Zhang Y., Sun H., Li L., Yang X., He J., Xiao S, Xiong J., Lin Y., Wen K., Zhou H., Chen J., Rong Z., Chen X. Host metabolism dysregulation and cell tropism identification in human airway and alveolar organoids upon SARS-CoV-2 infection // *Protein Cell*.–2021.–Vol. 12, no. 9.–P. 717-733.
374. Peng J.J., Wang L., Li Z., Ku C.L., Ho P.C. Metabolic challenges and interventions in CAR T cell therapy // *Sci. Immunol.*–2023.–Vol. 8, no. 82.–eabq3016.
375. Peng T., Du S.Y., Son M., Diamond B. HIF-1 α is a negative regulator of interferon regulatory factors: Implications for interferon production by hypoxic monocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.–2021.–Vol. 118, no. 26.–e2106017118.
376. Pensato U., Amore G., Muccioli L., Sammali S., Rondelli F., Rinaldi R., D'Angelo R., Nicodemo M., Mondini S., Sambati L., Asioli G.M., Rossi S., Santoro R., Cretella L., Ferrari S., Spinardi L., Faccioli L., Fanti S., Paccagnella A., Pierucci E., Casadei B., Pellegrini C., Zinzani P.L., Bonafè M., Cortelli P., Bonifazi F., Guarino M. CAR t-cell therapy in BologNA-NEUrotoxicity TReatment and Assessment in Lymphoma (CARBON-NEUTRAL): proposed protocol and results from an Italian study // *J. Neurol.*–2023.–Vol. 270, no. 5.–P. 2659-2673.
377. Pereira M., Dantas Damascena A., Galvão Azevedo L.M., de Almeida Oliveira T., da Mota Santana J. Vitamin D deficiency aggravates COVID-19: systematic review and meta-analysis // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*–2022.–Vol. 62, no. 5.–P. 1308-1316.
378. Perl A., Hanczko R., Telarico T., Oaks Z., Landas S. Oxidative stress, inflammation and carcinogenesis are controlled through the pentose phosphate pathway by transaldolase // *Trends Mol. Med.*–2011.–Vol. 17, no. 7.–P. 395-403.

379. Pes G.M., Dore M.P. Acquired Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency // *J. Clin. Med.*–2022.–Vol. 11, no. 22.–P. 6689.
380. Pizzini A., Aichner M., Sahanic S., Böhm A., Egger A., Hoermann G., Kurz K., Widmann G., Bellmann-Weiler R., Weiss G., Tancevski I., Sonnweber T., Löffler-Ragg J. Impact of Vitamin D Deficiency on COVID-19-A Prospective Analysis from the CovILD Registry // *Nutrients.*–2020.–Vol. 12, no. 9.–P. 2775.
381. Platten M., Nollen E.A.A., Röhrig U.F., Fallarino F., Opitz C.A. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond // *Nat. Rev. Drug Discov.*–2019.–Vol. 18, no. 5.–P. 379-401.
382. Poorebrahim M., Melief J., Pico de Coaña Y., L Wickström S., Cid-Arregui A., Kiessling R. Counteracting CAR T cell dysfunction // *Oncogene.*–2021.–Vol. 40, no. 2.–P. 421-435.
383. Prendergast G.C., Malachowski W.P., DuHadaway J.B., Muller A.J. Discovery of IDO1 Inhibitors: From Bench to Bedside // *Cancer Res.*–2017.–Vol. 77, no. 24.–P. 6795-6811.
384. Pyridoxal 5'-phosphate to mitigate immune dysregulation and coagulopathy in COVID-19 // *Preprints.org* 2020, 2020050144. <https://doi.org/10.20944/preprints202005.0144.v1>
385. Qi F., Zhang W., Huang J., Fu L., Zhao J. Single-Cell RNA Sequencing Analysis of the Immunometabolic Rewiring and Immunopathogenesis of Coronavirus Disease 2019 // *Front. Immunol.*–2021.–Vol. 12.–P. 651656.
386. Rad S.M.A.H., Halpin J.C., Tawinwung S., Suppipat K., Hirankarn N., McLellan A.D. MicroRNA-mediated metabolic reprogramming of chimeric antigen receptor T cells // *Immunol. Cell Biol.*–2022.–Vol. 100, no. 6.–P. 424-439.
387. Ragan I., Hartson L., Pidcoke H., Bowen R., Goodrich R. Pathogen reduction of SARS-CoV-2 virus in plasma and whole blood using riboflavin and UV light // *PLoS One.*–2020.–Vol. 15, no. 5.–P. e0233947.
388. Ramirez A.M., Wongtrakool C., Welch T., Steinmeyer A., Zügel U., Roman J. Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor beta1 in lung fibroblasts and epithelial cells // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*–2010.–Vol. 118, no. 3.–P. 142-150.
389. Ramos Hernández C., Mouronte-Roibás C., Barros-Dios J.M., Fernández-Villar A., Ruano-Ravina A. Deletion of GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer survival: a systematic review // *Tumori.*–2017.–Vol. 103, no. 4.–P. 338-344.
390. Rath M., Müller I., Kropf P., Closs E.I., Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages // *Front. Immunol.*–2014.–Vol. 5.–P. 532.
391. Ratledge C. The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems // *Biotechnol. Lett.*–2014.–Vol. 36, no. 8.–P. 1557-1568.
392. Raveendran A.V., Misra A. Post COVID-19 Syndrome ("Long COVID") and Diabetes: Challenges in Diagnosis and Management // *Diabetes Metab. Syndr.*–2021.–Vol. 15, no. 5.–P. 102235.
393. Rees C.A., Rostad C.A., Mantus G., Anderson E.J., Chahroudi A., Jaggi P., Wrammert J., Ochoa J.B., Ochoa A., Basu R.K., Heilman S., Harris F., Lapp S.A., Hussaini L., Vos M.B., Brown L.A., Morris C.R. Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*–2021.–Vol. 118, no. 25.–P. e2101708118.
394. Reijmen E., De Mey S., De Mey W., Gevaert T., De Ridder K., Locy H., Martens S., De Blay E., Bouwens L., Debie P., Breckpot K., De Grève J., De Ridder M., Goyvaerts C. Fractionated Radiation Severely Reduces the Number of CD8+ T Cells and Mature Antigen Presenting Cells Within Lung Tumors // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*–2021.–Vol. 111, no. 1.–P. 272-283.
395. Reizine F., Lesouhaitier M., Gregoire M., Pinceaux K., Gacouin A., Mamar A., Painvin B., Camus C., Le Tulzo Y., Tattevin P., Revest M., Le Bot A., Ballerie A., Cador-Rousseau B., Lederlin M., Lebouvier T., Launey Y., Latour M., Verdy C., Rossille D., Le Gallou S., Dulong J., Moreau C., Bendavid C., Roussel M., Cogne M., Tarte K., Tadié J.M. SARS-CoV-2-Induced

- ARDS Associates with MDSC Expansion, Lymphocyte Dysfunction, and Arginine Shortage // *J. Clin. Immunol.*–2021.–Vol. 41, no. 3.–P. 515-525.
396. Remans P.H., van Oosterhout M., Smeets T.J., Sanders M., Frederiks W.M., Reedquist K.A., Tak P.P., Breedveld F.C., van Laar J.M. Intracellular free radical production in synovial T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.*–2005.–Vol. 52, no. 7.–P. 2003-2009.
397. Ren X., Yang L., Tang F., Yan C., Ren J. Enzyme biosensor based on NAD-sensitive quantum dots // *Biosens. Bioelectron.*–2010.–Vol. 26, no. 1.–P. 271-274.
398. Richard C., Lemonnier F., Thibault M., Couturier M., Auzepy P. Vitamin E deficiency and lipoperoxidation during adult respiratory distress syndrome // *Crit. Care Med.*–1990.–Vol. 18, no. 1.–P. 4-9.
399. Rieder F.J.J., Gröschel C., Kastner M.T., Kosulin K., Laengle J., Zadnikar R., Marculescu R., Schneider M., Lion T., Bergmann M., Kallay E., Steininger C. Human cytomegalovirus infection downregulates vitamin-D receptor in mammalian cells // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*–2017.–Vol. 165, Pt. B.–P. 356-362.
400. Rieger S., Zhao H., Martin P., Abe K., Lisse T.S. The role of nuclear hormone receptors in cutaneous wound repair // *Cell. Biochem. Funct.*–2015.–Vol. 33, no. 1.–P. 1-13.
401. Robinson K.M., Janes M.S., Beckman J.S. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging // *Nat. Protoc.*–2008.–Vol. 3, no. 6.–P. 941-947.
402. Rodriguez P.C., Quiceno D.G., Ochoa A.C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression // *Blood.*–2007.–Vol. 109, no. 4.–P. 1568-1573.
403. Rodriguez P.C., Quiceno D.G., Ochoa A.C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression // *Blood.*–2007.–Vol. 109, no. 4.–P. 1568-1573.
404. Role of myeloid-derived suppressor cells in viral respiratory infections; Hints for discovering therapeutic targets for COVID-19 Khadijeh Koushki a 1, Maryam Salemi b 1, Seyed Mohammad Miri c 1, Yaser Arjeini d 1, Mohsen Keshavarz b, Amir Ghaemi. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112346>
405. Role of myeloid-derived suppressor cells in viral respiratory infections; Hints for discovering therapeutic targets for COVID-19 Khadijeh Koushki a 1, Maryam Salemi b 1, Seyed Mohammad Miri c 1, Yaser Arjeini d 1, Mohsen Keshavarz b, Amir Ghaemi. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112346>
406. Romero-Garcia S., Moreno-Altamirano M.M., Prado-Garcia H., Sánchez-García F.J. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance // *Front. Immunol.*–2016.–Vol. 7.–P. 52.
407. Ross A.C., Stephensen C.B. Vitamin A and retinoids in antiviral responses // *FASEB J.*–1996.–Vol. 10, no. 9.–P. 979-985.
408. Rubin R. Could Statins Do More Than Lower Cholesterol in Patients With COVID-19? // *JAMA.*–2021.–Vol. 325, no. 24.–P. 2424-2425.
409. Ryu S., Shchukina I., Youm Y.H., Qing H., Hilliard B., Dlugos T., Zhang X., Yasumoto Y., Booth C.J., Fernández-Hernando C., Suárez Y., Khanna K., Horvath T.L., Dietrich M.O., Artyomov M., Wang A., Dixit V.D. Ketogenic diet restrains aging-induced exacerbation of coronavirus infection in mice // *Elife.*–2021.–Vol. 10.–e66522.
410. Sabry W., Elemetry M., Burnouf T., Seghatchian J., Goubran H. Vitamin B12 deficiency and metabolism-mediated thrombotic microangiopathy (MM-TMA) // *Transfus. Apher. Sci.*–2020.–Vol. 59, no. 1.–P. 102717.
411. Sacchi A., Grassi G., Notari S., Gili S., Bordoni V., Tartaglia E., Casetti R., Cimini E., Mariotti D., Garotto G., Beccacece A., Marchioni L., Bibas M., Nicastrì E., Ippolito G., Agrati C. Expansion of Myeloid Derived Suppressor Cells Contributes to Platelet Activation by L-Arginine Deprivation during SARS-CoV-2 Infection // *Cells.*–2021.–Vol. 10, no. 8.–P. 2111.
412. Salabei J.K., Asnake Z.T., Ismail Z.H., Charles K., Stanger G.T., Abdullahi A.H., Abraham A.T., Okonoboh P. COVID-19 and the cardiovascular system: an update // *Am. J. Med. Sci.*–2022.–Vol. 364, no. 2.–P. 139-147.

413. Sanchez E.L., Lagunoff M. Viral activation of cellular metabolism // *Virology*.–2015.–479-480:609-18.
414. Sanchez E.L., Pulliam T.H., Dimaio T.A., Thalhoffer A.B., Delgado T., Lagunoff M. Glycolysis, Glutaminolysis, and Fatty Acid Synthesis Are Required for Distinct Stages of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Lytic Replication // *J. Virol.*–2017.–Vol. 91, no. 10.–e02237-16.
415. Sanders D.W., Jumper C.C., Ackerman P.J., Bracha D., Donlic A., Kim H., Kenney D., Castello-Serrano I., Suzuki S., Tamura T., Tavares A.H., Saeed M., Holehouse A.S., Ploss A., Levental I., Douam F., Padera R.F., Levy B.D., Brangwynne C.P. SARS-CoV-2 requires cholesterol for viral entry and pathological syncytia formation // *Elife*.–2021.–Vol. 10.–e65962.
416. San-Millán I., Brooks G.A. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect // *Carcinogenesis*.–2017.–Vol. 38, no. 2.–P. 119-133.
417. Sanseverino I., Rinaldi A.O., Purificato C., Cortese A., Millefiorini E., Gauzzi M.C. 1,25(OH)2D3 Differently Modulates the Secretory Activity of IFN-DC and IL4-DC: A Study in Cells from Healthy Donors and MS Patients // *Int. J. Mol. Sci.*–2023.–Vol. 24, no. 7.–P. 6717.
418. Santini S.M., Lapenta C., Donati S., Spadaro F., Belardelli F., Ferrantini M. Interferon- α -conditioned human monocytes combine a Th1-orienting attitude with the induction of autologous Th17 responses: role of IL-23 and IL-12 // *PLoS One*.–Vol. 6, no. 2.–e17364.
419. Sarno G., Russo E., Ferrara A., Cerbone V., Villa R., De Rosa P. COVID-19 Infection in Kidney Transplant Recipients in Italy: Management Issues in a Kidney Transplant Center // *Exp. Clin. Transplant*.–2021.–Vol. 19, no. 3.–P. 284-286.
420. Sarohan A.R. COVID-19: Endogenous Retinoic Acid Theory and Retinoic Acid Depletion Syndrome // *Med. Hypotheses*.–2020.–Vol. 144.–P. 110250.
421. Savanelli M.C., Scarano E., Muscogiuri G., Barrea L., Vuolo L., Rubino M., Savastano S., Colao A., Di Somma C. Cardiovascular risk in adult hypopituitary patients with growth hormone deficiency: is there a role for vitamin D? // *Endocrine*.–2016.–Vol. 52, no. 1.–P. 111-119.
422. Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V.; Isakov D.V., Sadowski I.S., Belenyuk V.D., Borisov A.G. Recombinant Human Interleukin-2 Corrects NK Cell Phenotype and Functional Activity in Patients with Post-COVID Syndrome // *Pharmaceuticals*.–2023.–Vol. 16.–P. 537.
423. Savchenko A.A., Tikhonova E., Kudryavtsev I., Kudlay D., Korsunsky I., Beleniuk V., Borisov A. TREC/KREC Levels and T and B Lymphocyte Subpopulations in COVID-19 Patients at Different Stages of the Disease. // *Viruses*.–2022.–Vol. 14.–P. 646.
424. Schank M., Zhao J., Wang L., Nguyen L.N.T., Zhang Y., Wu X.Y., Zhang J., Jiang Y., Ning S., El Gazzar M., Moorman J.P., Yao Z.Q. ROS-Induced Mitochondrial Dysfunction in CD4 T Cells from ART-Controlled People Living with HIV // *Viruses*.–2023.–Vol. 15, no. 5.–P. 1061.
425. Schild Y., Bosserhoff J., Droege F., Littwitz-Salomon E., Fandrey J., Wrobeln A. Hypoxia-Inducible Factor-Prolyl Hydroxylase Inhibitor Improves Leukocyte Energy Metabolism in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia // *Life (Basel)*.–2023.–Vol. 13, no. 8.–P. 1708.
426. Schloss J.V. Nutritional deficiencies that may predispose to long COVID // *Inflammopharmacology*.–2023.–Vol. 31, no. 2.–P. 573-583.
427. Schrotten H., Spors B., Hucke C., Stins M., Kim K.S., Adam R., Däubener W. Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of *Staphylococcus aureus* by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase // *Neuropediatrics*.–2001.–Vol. 32, no. 4.–P. 206-210.
428. Secord E., Hartog N.L. Review of Treatment for Adenosine Deaminase Deficiency (ADA) Severe Combined Immunodeficiency (SCID) // *Ther. Clin. Risk Manag.*–2022.–Vol. 18.–P. 939-944.
429. Sen C.K., Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription // *FASEB J.*–1996.–Vol. 10, no. 7.–P. 709-720.
430. Senol A., Orhan D. The relationship of lipid profile with severity of disease and mortality in patients with COVID-1 // *Bratisl. Lek. Listy*.–2022.–Vol. 123, no. 8.–P. 589-593.

431. Shaath H., Alajez N.M. Computational and Transcriptome Analyses Revealed Preferential Induction of Chemotaxis and Lipid Synthesis by SARS-CoV-2 // *Biology (Basel)*.–2020.–Vol. 9, no. 9.–P. 260.
432. Shabani S., Ghahroodi F.N., Khalesi B., Pourzardosht N., Hashemi Z.S., Khalili S. Molecular mechanisms and therapeutic effects of different vitamins and minerals in COVID-19 patients // *J. Trace Elem. Med. Biol.*–2022.–Vol. 73.–127044.
433. Shakoor H., Feehan J., Al Dhaheeri A.S., Ali H.I., Platat C., Ismail L.C., Apostolopoulos V., Stojanovska L. Immune-boosting role of vitamins D, C, E, zinc, selenium and omega-3 fatty acids: Could they help against COVID-19? // *Maturitas*.–2021.–Vol. 143.–P. 1-9.
434. Shakoor H., Feehan J., Mikkelsen K., Al Dhaheeri A.S., Ali H.I., Platat C., Ismail L.C., Stojanovska L., Apostolopoulos V. Be well: A potential role for vitamin B in COVID-19 // *Maturitas*.–2021.–Vol. 144.–P. 108-111.
435. Shams S., Azari-Yam A., Safavi M., Zamani Z., Sotoudeh-Anvari M., Sharifzadeh Ekbatani M., Haghi-Ashtiani M.T., Mozafari F., Yaghmaie B., Shafeghat L. Alteration of Plasma Amino Acid Concentrations in Iranian Children with COVID-19// *Int. J. Pediatr.*–2022.–Vol. 2022.–9390327.
436. Shea M.K., Booth S.L. Concepts and Controversies in Evaluating Vitamin K Status in Population-Based Studies // *Nutrients*.–2016.–Vol. 8, no. 1.–P. 8.
437. Shen B., Yi X., Sun Y., Bi X., Du J., Zhang C., Quan S., Zhang F., Sun R., Qian L., Ge W., Liu W., Liang S., Chen H., Zhang Y., Li J., Xu J., He Z., Chen B., Wang J., Yan H., Zheng Y., Wang D., Zhu J., Kong Z., Kang Z., Liang X., Ding X., Ruan G., Xiang N., Cai X., Gao H., Li L., Li S., Xiao Q., Lu T., Zhu Y., Liu H., Chen H., Guo T. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera // *Cell*.–2020.–Vol. 182, no. 1.–P. 59-72.e15.
438. Shen T., Wang T. Metabolic Reprogramming in COVID-19 // *Int. J. Mol. Sci.*–2021.–Vol. 22.–P. 11475.
439. Shesternya P.A., Savchenko A.A., Gritsenko O.D., Vasileva A.O., Kudryavtsev I.V., Masterova A.A., Isakov D.V., Borisov A.G. Features of peripheral blood Th-cell subset composition and serum cytokine level in patients with activity-driven ankylosing spondylitis // *Pharmaceuticals*.–2022.–Vol.15, no. 11.–P.1370.
440. Sheybani Z., Dokoochaki M.H., Negahdaripour M., Dehdashti M., Zolghadr H., Moghadami M., et al. The role of folic acid in the management of respiratory disease caused by COVID-19 // 2020. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12034980.v1>
441. Shi L.Z., Wang R., Huang G., Vogel P., Neale G., Green D.R., Chi H. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells // *J. Exp. Med.*–2011.–Vol. 208, no. 7.–P. 1367-1376.
442. Shima T., Nakashima A., Yasuda I., Ushijima A., Inada K., Tsuda S., Yoshino O., Tomura M., Saito S. Uterine CD11c+ cells induce the development of paternal antigen-specific Tregs via seminal plasma priming // *J. Reprod. Immunol.*–2020.–Vol. 141.–103165.
443. Shioi A., Morioka T., Shoji T., Emoto M. The Inhibitory Roles of Vitamin K in Progression of Vascular Calcification // *Nutrients*.–2020.–Vol. 12, no. 2.–P. 583.
444. Shirai T., Nazarewicz R.R., Wallis B.B., Yanes R.E., Watanabe R., Hilhorst M., Tian L., Harrison D.G., Giacomini J.C., Assimes T.L., Goronzy J.J., Weyand C.M. The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease // *J. Exp. Med.*–2016.–Vol. 213, no. 3.–P. 337-354.
445. Signa S., Bertoni A., Penco F., Caorsi R., Cafaro A., Cangemi G., Volpi S., Gattorno M., Schena F. Adenosine Deaminase 2 Deficiency (DADA2): A Crosstalk Between Innate and Adaptive Immunity // *Front. Immunol.*–2022.–Vol. 13.–935957.
446. Silalahi E.R., Wibowo N., Prasmusinto D., Djuwita R., Rengganis I., Mose J.C. Decidual dendritic cells 10 and CD4+CD25+FOXP3 regulatory T cell in preeclampsia and their correlation with nutritional factors in pathomechanism of immune rejection in pregnancy // *J. Reprod. Immunol.*–2022.–Vol. 154.–103746.

447. Simula L., Ollivier E., Icard P., Donnadiu E. Immune Checkpoint Proteins, Metabolism and Adhesion Molecules: Overlooked Determinants of CAR T-Cell Migration? // *Cells*.–2022.–Vol. 11, no. 11.–P. 1854.
448. Sirokmány G., Donkó Á., Geiszt M. Nox/Duox Family of NADPH Oxidases: Lessons from Knockout Mouse Models // *Trends Pharmacol. Sci.*–2016.–Vol. 37, no. 4.–P. 318-327.
449. Smirnova O.V., Manchouk V.T., Savchenko A.A. Immune status & enzymes activity in blood lymphocytes in adult patients at different stages of acute lymphoblastic leukaemia // *Indian Journal of Medical Research*.–2011.–T. 133, no. 3.–P. 280-286.
450. Smolders J., van den Ouweland J., Geven C., Pickkers P., Kox M. Letter to the Editor: Vitamin D deficiency in COVID-19: Mixing up cause and consequence // *Metabolism*.–2021.–Vol. 115.–154434.
451. Soeters P.B., Shenkin A., Sobotka L., Soeters M.R., de Leeuw P.W., Wolfe R.R. The anabolic role of the Warburg, Cori-cycle and Crabtree effects in health and disease // *Clin. Nutr.*–2021.–Vol. 40, no. 5.–P. 2988-2998.
452. Someya A., Nishijima K., Nunoi H., Irie S., Nagaoka I. Study on the superoxide-producing enzyme of eosinophils and neutrophils--comparison of the NADPH oxidase components // *Arch. Biochem. Biophys.*–1997.–Vol. 345, no. 2.–P. 207-213.
453. Song J.W., Lam S.M., Fan X., Cao W.J., Wang S.Y., Tian H., Chua G.H., Zhang C., Meng F.P., Xu Z., Fu J.L., Huang L., Xia P., Yang T., Zhang S., Li B., Jiang T.J., Wang R., Wang Z., Shi M., Zhang J.Y., Wang F.S., Shui G. Omics-Driven Systems Interrogation of Metabolic Dysregulation in COVID-19 Pathogenesis // *Cell Metab.*–2020.–Vol. 32, no. 2.–P. 188-202.e5.
454. Soria-Castro R., Meneses-Preza Y.G., Rodríguez-López G.M., Romero-Ramírez S., Sosa-Hernández V.A., Cervantes-Díaz R., Pérez-Fragoso A., Torres-Ruiz J.J., Gómez-Martín D., Campillo-Navarro M., Álvarez-Jiménez V.D., Pérez-Tapia S.M., Chávez-Blanco A.D., Estrada-Parra S., Maravillas-Montero J.L., Chacón-Salinas R. Severe COVID-19 is marked by dysregulated serum levels of carboxypeptidase A3 and serotonin // *J. Leukoc. Biol.*–2021.–Vol. 110, no. 3.–P. 425-431.
455. Srivastava M.K., Sinha P., Clements V.K., Rodriguez P., Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine // *Cancer Res.*–2010.–Vol. 70, no. 1.–P. 68-77.
456. Stathopoulou C., Nikoleri D., Bertsias G. Immunometabolism: an overview and therapeutic prospects in autoimmune diseases // *Immunotherapy*.–2019.–Vol. 11, no. 9.–P. 813-829.
457. Sterner R.C., Sterner R.M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies // *Blood Cancer J.*–2021.–Vol. 11, no. 4.–P. 69.
458. Sudre C.H., Murray B., Varsavsky T., Graham M.S., Penfold R.S., Bowyer R.C., Pujol J.C., Klaser K., Antonelli M., Canas L.S., Molteni E., Modat M., Jorge Cardoso M., May A., Ganesh S., Davies R., Nguyen L.H., Drew D.A., Astley C.M., Joshi A.D., Merino J., Tsereteli N., Fall T., Gomez M.F., Duncan E.L., Menni C., Williams F.M.K., Franks P.W., Chan A.T., Wolf J., Ourselin S., Spector T., Steves C.J. Attributes and predictors of long COVID // *Nat. Med.*–2021.–Vol. 27, no. 4.–P. 626-631.
459. Sukkar S.G., Cogorno L., Pisciotta L., Pasta A., Vena A., Gradaschi R., Dentone C., Guido E., Martino E., Beltramini S., Donini L.M., Carmisciano L., Sormani M.P., Bassetti M.; GECOVID Study Group. Clinical efficacy of eucaloric ketogenic nutrition in the COVID-19 cytokine storm: A retrospective analysis of mortality and intensive care unit admission // *Nutrition*.–2021.–Vol. 89.–111236.
460. Sukumar M., Liu J., Mehta G.U., Patel S.J., Roychoudhuri R., Crompton J.G., Klebanoff C.A., Ji Y., Li P., Yu Z., Whitehill G.D., Clever D., Eil R.L., Palmer D.C., Mitra S., Rao M., Keyvanfar K., Schrupp D.S., Wang E., Marincola F.M., Gattinoni L., Leonard W.J., Muranski P., Finkel T., Restifo N.P. Mitochondrial Membrane Potential Identifies Cells with Enhanced Stemness for Cellular Therapy // *Cell. Metab.*–2016.–Vol. 23, no. 1.–P. 63-76.

461. Suleiman L., Négrier C., Boukerche H. Protein S: A multifunctional anticoagulant vitamin K-dependent protein at the crossroads of coagulation, inflammation, angiogenesis, and cancer // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*–2013.–Vol. 88, no. 3.–P. 637-654.
462. Takele Y., Abebe T., Weldegebreal T., Hailu A., Hailu W., Hurissa Z., Ali J., Diro E., Sisay Y., Cloke T., Modolell M., Munder M., Tacchini-Cottier F., Müller I., Kropf P. Arginase activity in the blood of patients with visceral leishmaniasis and HIV infection // *PLoS Negl. Trop. Dis.*–2013.–Vol. 7, no. 1.–e1977.
463. Talib J., Maghzal G.J., Cheng D., Stocker R. Detailed protocol to assess in vivo and ex vivo myeloperoxidase activity in mouse models of vascular inflammation and disease using hydroethidine // *Free Radic. Biol. Med.*–2016.–Vol. 97.–P. 124-135.
464. Tan C.W., Ho L.P., Kalimuddin S., Cherng B.P.Z., Teh Y.E., Thien S.Y., Wong H.M., Tern P.J.W., Chandran M., Chay J.W.M., Nagarajan C., Sultana R., Low J.G.H., Ng H.J. Cohort study to evaluate the effect of vitamin D, magnesium, and vitamin B12 in combination on progression to severe outcomes in older patients with coronavirus (COVID-19) // *Nutrition.*–2020.–Vol. 79-80.–111017.
465. Tannahill G.M., Curtis A.M., Adamik J., Palsson-McDermott E.M., McGettrick A.F., Goel G., Frezza C., Bernard N.J., Kelly B., Foley N.H., Zheng L., Gardet A., Tong Z., Jany S.S., Corr S.C., Haneklaus M., Caffrey B.E., Pierce K., Walmsley S., Beasley F.C., Cummins E., Nizet V., Whyte M., Taylor C.T., Lin H., Masters S.L., Gottlieb E., Kelly V.P., Clish C., Auron P.E., Xavier R.J., O'Neill L.A. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α // *Nature.*–2013.–Vol. 496, no. 7444.–P. 238-242.
466. Tanner J.E., Alfieri C. The Fatty Acid Lipid Metabolism Nexus in COVID-19 // *Viruses.*–2021.–Vol. 13, no. 1.–P. 90.
467. Tedeschi P.M., Bansal N., Kerrigan J.E., Abali E.E., Scotto K.W., Bertino J.R. NAD⁺ Kinase as a Therapeutic Target in Cancer // *Clin. Cancer Res.*–2016.–Vol. 22, no. 21.–P. 5189-5195.
468. Teijeira A., Labiano S., Garasa S., Etxebarria I., Santamaría E., Rouzaut A., Enamorado M., Azpilikueta A., Inoges S., Bolaños E., Aznar M.A., Sánchez-Paulete A.R., Sancho D., Melero I. Mitochondrial Morphological and Functional Reprogramming Following CD137 (4-1BB) Costimulation // *Cancer Immunol. Res.*–2018.–Vol. 6, no. 7.–P. 798-811.
469. Tenforde M.W., Kim S.S., Lindsell C.J., Billig Rose E., Shapiro N.I., Files D.C., Gibbs K.W., Erickson H.L., Steingrub J.S., Smithline H.A., Gong M.N., Aboodi M.S., Exline M.C., Henning D.J., Wilson J.G., Khan A., Qadir N., Brown S.M., Peltan I.D., Rice T.W., Hager D.N., Ginde A.A., Stubblefield W.B., Patel M.M., Self W.H., Feldstein L.R.; IVY Network Investigators; CDC COVID-19 Response Team; IVY Network Investigators. Symptom Duration and Risk Factors for Delayed Return to Usual Health Among Outpatients with COVID-19 in a Multistate Health Care Systems Network - United States, March-June 2020 // *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*–2020.–Vol. 69, no. 30.–P. 993-998.
470. The Financial Express. (2020) The role of vitamin C in fighting COVID-19 pandemic – the financial express. <https://www.financialexpress.com/lifestyle/health/the-role-of-vitamin-c-in-fighting-covid-19-pandemic/2084387/>
471. Thomas T., Stefanoni D., Reisz J.A., Nemkov T., Bertolone L., Francis R.O., Hudson K.E., Zimring J.C., Hansen K.C., Hod E.A., Spitalnik S.L., D'Alessandro A. COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status // *JCI Insight.*–2020.–Vol. 5, no. 14.–e140327.
472. Thorne N., Inglese J., Auld D.S. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology // *Chem. Biol.*–2010.–Vol. 17, no. 6.–P. 646-657.
473. Thwe P.M., Fritz D.I., Snyder J.P., Smith P.R., Curtis K.D., O'Donnell A., Galasso N.A., Sepaniac L.A., Adamik B.J., Hoyt L.R., Rodriguez P.D., Hogan T.C., Schmidt A.F., Poynter M.E., Amiel E. Syk-dependent glycolytic reprogramming in dendritic cells regulates IL-1 β production to β -glucan ligands in a TLR-independent manner // *J. Leukoc. Biol.*–2019.–Vol. 106, no. 6.–P. 1325-1335.

474. Tjokrowidjaja A., Lord S.J., John T., Lewis C.R., Kok P.S., Marschner I.C., Lee C.K. Pre- and on-treatment lactate dehydrogenase as a prognostic and predictive biomarker in advanced non-small cell lung cancer // *Cancer*.–2022.–Vol. 128, no. 8.–P. 1574-1583.
475. Tóth S.Z., Lőrincz T., Szarka A. Concentration Does Matter: The Beneficial and Potentially Harmful Effects of Ascorbate in Humans and Plants // *Antioxid. Redox Signal*.–2018.–Vol. 29, no. 15.–P. 1516-1533.
476. Townsend L., Dyer A.H., McCluskey P., O'Brien K., Dowds J., Laird E., Bannan C., Bourke N.M., Ní Cheallaigh C., Byrne D.G., Kenny R.A. Investigating the Relationship between Vitamin D and Persistent Symptoms Following SARS-CoV-2 Infection // *Nutrients*.–2021.–Vol. 13, no. 7.–P. 2430.
477. Traber M.G. Vitamin E regulatory mechanisms // *Annu. Rev. Nutr*.–2007.–Vol. 27.–P. 347-362.
478. Trimarco V., Izzo R., Lombardi A., Coppola A., Fiorentino G., Santulli G. Beneficial effects of L-Arginine in patients hospitalized for COVID-19: New insights from a randomized clinical trial // *Pharmacol. Res*.–2023.–Vol. 191.–106702.
479. Turgay Yıldırım Ö., Kaya Ş. The atherogenic index of plasma as a predictor of mortality in patients with COVID-19 // *Heart Lung*.–2021.–Vol. 50, no. 2.–P. 329-333.
480. Valvo V., Parietti E., Deans K., Ahn S.W., Park N.R., Ferland B., Thompson D., Dominas C., Bhagavatula S.K., Davidson S., Jonas O. High-throughput in situ perturbation of metabolite levels in the tumor micro-environment reveals favorable metabolic condition for increased fitness of infiltrated T-cells // *Front. Cell. Dev. Biol*.–2022.–Vol. 10.–1032360.
481. van der Windt G.J., O'Sullivan D., Everts B., Huang S.C., Buck M.D., Curtis J.D., Chang C.H., Smith A.M., Ai T., Faubert B., Jones R.G., Pearce E.J., Pearce E.L. CD8 memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.–2013.–Vol. 110, no. 35.–P.14336-14341.
482. Veskokouk A.S., Kyparos A., Paschalis V., Nikolaidis M.G. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood // *Biomarkers*.–2016.–Vol. 21, no. 3.–P. 208-217.
483. Veskokouk A.S., Margaritelis N.V., Kyparos A., Paschalis V., Nikolaidis M.G. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood and tissues: the NADPH network // *Redox. Rep*.–2018.–Vol. 23, no. 1.–P. 47-56.
484. Villar J., Coillard A., van Roessel C., Segura E. Culture System Allowing the Simultaneous Differentiation of Human Monocytes into Dendritic Cells and Macrophages Using M-CSF, IL-4, and TNF- α // *Methods Mol. Biol*.–2023.–Vol. 2618.–P. 147-154.
485. Vissers M.C.M., Wilkie R.P. Ascorbate deficiency results in impaired neutrophil apoptosis and clearance and is associated with up-regulation of hypoxia-inducible factor 1 α // *J. Leukoc. Biol*.–2007.–Vol. 81, no. 5.–P. 1236-1244.
486. Vowells S.J., Sekhsaria S., Malech H.L., Shalit M., Fleisher T.A. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes // *J. Immunol. Methods*.–1995.–Vol. 178, no 1.–P. 89-97.
487. Waghela B.N., Vaidya F.U., Agrawal Y., Santra M.K., Mishra V., Pathak C. Molecular insights of NADPH oxidases and its pathological consequences // *Cell. Biochem. Funct*.–2021.–Vol. 39, no. 2.–P. 218-234.
488. Wagner T.C., Scott M.D. Single extraction method for the spectrophotometric quantification of oxidized and reduced pyridine nucleotides in erythrocytes // *Anal. Biochem*.–1994.–Vol. 222, no. 2.–P. 417-426.
489. Wang C., Yosef N., Gaublumme J., Wu C., Lee Y., Clish C.B., Kaminski J., Xiao S., Meyer Zu Horste G., Pawlak M., Kishi Y., Joller N., Karwacz K., Zhu C., Ordovas-Montanes M., Madi A., Wortman I., Miyazaki T., Sobel R.A., Park H., Regev A., Kuchroo V.K. CD5L/AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity // *Cell*.–2015.–Vol. 163, no. 6.–P. 1413-1427.

490. Wang J., Xu M., Chen M., Jiang Z., Chen G. Study on sonodynamic activity of metallophthalocyanine sonosensitizers based on the sonochemiluminescence of MCLA // *Ultrason. Sonochem.*–2012.–Vol. 19, no. 2.–P. 237-242.
491. Wang P., Sun S., Lam S., Lockwood W.W. New insights into the biology and development of lung cancer in never smokers-implications for early detection and treatment // *J. Transl. Med.*–2023.–Vol. 21, no. 1.–P. 585.
492. Wang R., Dillon C.P., Shi L.Z., Milasta S., Carter R., Finkelstein D., McCormick L.L., Fitzgerald P., Chi H., Munger J., Green D.R. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation // *Immunity.*–2011.–Vol. 35, no. 6.–P. 871-882.
493. Wang R., Green D.R. Metabolic checkpoints in activated T cells // *Nat. Immunol.*–2012.–Vol. 13, no. 10.–P. 907-915.
494. Wang S., Li W., Hui H., Tiwari S.K., Zhang Q., Croker B.A., Rawlings S., Smith D., Carlin A.F., Rana T.M. Cholesterol 25-Hydroxylase inhibits SARS-CoV-2 and other coronaviruses by depleting membrane cholesterol // *EMBO J.*–2020.–Vol. 39, no. 21.–e106057.
495. Wang X., Chen D. Purinergic Regulation of Neutrophil Function // *Front. Immunol.*–2018.–Vol. 9.–P. 399.
496. Wang X., Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy // *Mol. Ther. Oncolytics.*–2016.–Vol. 3.–P. 16015.
497. Wang X., Yu F., Ye L. Epigenetic control of mesenchymal stem cells orchestrates bone regeneration // *Front. Endocrinol. (Lausanne).*–2023.–Vol. 14.–1126787.
498. Wang Y., Bao X., Xian H., Wei F., Song Y., Zhao S., Zhang Y., Wang Y., Wang Y. Glucocorticoid receptors involved in ginsenoside compound K ameliorate adjuvant arthritis by inhibiting the glycolysis of fibroblast-like synoviocytes via the NF- κ B/HIF-1 α pathway // *Pharm. Biol.*–2023.–Vol. 61, no. 1.–P. 1162-1174.
499. Wang Y., Wang W., Xu H., Sun Y., Sun J., Jiang Y., Yao J., Tian Y. Non-Lethal Sonodynamic Therapy Inhibits Atherosclerotic Plaque Progression in ApoE^{-/-} Mice and Attenuates ox-LDL-mediated Macrophage Impairment by Inducing Heme Oxygenase-1 // *Cell. Physiol. Biochem.*–2017.–Vol. 41, no. 6.–P. 2432-2446.
500. Wang Y., Yang T., Liang H., Deng M. Cell atlas of the immune microenvironment in gastrointestinal cancers: Dendritic cells and beyond // *Front. Immunol.*–2022.–Vol. 13.–1007823.
501. Wang Z., Dai Z., Zhang H., Liang X., Zhang X., Wen Z., Luo P., Zhang J., Liu Z., Zhang M., Cheng Q. Tumor-secreted lactate contributes to an immunosuppressive microenvironment and affects CD8 T-cell infiltration in glioblastoma // *Front. Immunol.*–2023.–Vol. 14.–894853.
502. Waqas Khan H.M., Parikh N., Megala S.M., Predeteanu G.S. Unusual Early Recovery of a Critical COVID-19 Patient After Administration of Intravenous Vitamin C // *Am. J. Case Rep.*–2020.–Vol. 21.–e925521.
503. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells // *Science.*–1956.–Vol. 124, no. 3215.–P. 269-270.
504. Ward P.S., Thompson C.B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate // *Cancer Cell.*–2012.–Vol. 21, no. 3.–P. 297-308.
505. Wardman P. Methods to measure the reactivity of peroxynitrite-derived oxidants toward reduced fluoresceins and rhodamines // *Methods Enzymol.*–2008.–Vol. 441.–P. 261-282.
506. Weber D.D., Aminzadeh-Gohari S., Tulipan J., Catalano L., Feichtinger R.G., Kofler B. Ketogenic diet in the treatment of cancer - Where do we stand? // *Mol. Metab.*–2020.–Vol. 33.–P. 102-121.
507. Wei C., Wan L., Yan Q., Wang X., Zhang J., Yang X., Zhang Y., Fan C., Li D., Deng Y., Sun J., Gong J., Yang X., Wang Y., Wang X., Li J., Yang H., Li H., Zhang Z., Wang R., Du P., Zong Y., Yin F., Zhang W., Wang N., Peng Y., Lin H., Feng J., Qin C., Chen W., Gao Q., Zhang R., Cao Y., Zhong H. HDL-scavenger receptor B type 1 facilitates SARS-CoV-2 entry // *Nat. Metab.*–2020.–Vol. 2, no. 12.–P. 1391-1400.
508. Wei J., Long L., Yang K., Guy C., Shrestha S., Chen Z., Wu C., Vogel P., Neale G., Green D.R., Chi H. Autophagy enforces functional integrity of regulatory T cells by coupling

- environmental cues and metabolic homeostasis // *Nat. Immunol.*–2016.–Vol. 17, no. 3.–P. 277-285.
509. Wei X., Zeng W., Su J., Wan H., Yu X., Cao X., Tan W., Wang H. Hypolipidemia is associated with the severity of COVID-19 // *J. Clin. Lipidol.*–2020.–Vol. 14, no. 3.–P. 297-304.
510. Weinlich G., Murr C., Richardsen L., Winkler C., Fuchs D. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients // *Dermatology.*–2007.–Vol. 214, no. 1.–P. 8-14.
511. Weis-Banke S.E., Lisle T.L., Perez-Penco M., Schina A., Hübbe M.L., Siersbæk M., Holmström M.O., Jørgensen M.A., Marie Svane J., Met Ö., Ødum N., Madsen D.H., Donia M., Grøntved L., Andersen M.H. Arginase-2-specific cytotoxic T cells specifically recognize functional regulatory T cells // *J. Immunother. Cancer.*–2022.–Vol. 10, no. 10.–e005326.
512. Werner E.R., Werner-Felmayer G., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Wachter H. Parallel induction of tetrahydrobiopterin biosynthesis and indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells and cell lines by interferon-gamma // *Biochem. J.*–1989.–Vol. 262, no. 3.–P. 861-866.
513. Wessels I., Rolles B., Rink L. The Potential Impact of Zinc Supplementation on COVID-19 Pathogenesis // *Front. Immunol.*–2020.–Vol. 11.–1712.
514. Wetzel T.J., Erfan S.C., Figueroa L.D., Wheeler L.M., Ananieva E.A. Crosstalk between arginine, glutamine, and the branched chain amino acid metabolism in the tumor microenvironment // *Front. Oncol.*–2023.–Vol. 13.–1186539.
515. Wintergerst E.S., Maggini S., Hornig D.H. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions // *Ann. Nutr. Metab.*–2006.–Vol. 50, no. 2.–P. 85-94.
516. Xia L., Oyang L., Lin J., Tan S., Han Y., Wu N., Yi P., Tang L., Pan Q., Rao S., Liang J., Tang Y., Su M., Luo X., Yang Y., Shi Y., Wang H., Zhou Y., Liao Q. The cancer metabolic reprogramming and immune response // *Mol. Cancer.*–2021.–Vol. 20, no. 1.–P. 28.
517. Xiong T., He P., Zhou M., Zhong D., Yang T., He W., Xu Z., Chen Z., Liu Y.W., Dai S.S. Glutamate blunts cell-killing effects of neutrophils in tumor microenvironment // *Cancer Sci.*–2022.–Vol. 113, no. 6.–P. 1955-1967.
518. Xu X., Gnanaprakasam J.N.R., Sherman J., Wang R. A Metabolism Toolbox for CAR T Therapy // *Front. Oncol.*–2019.–Vol. 9.–P. 322.
519. Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C., Liu S., Zhao P., Liu H., Zhu L., Tai Y., Bai C., Gao T., Song J., Xia P., Dong J., Zhao J., Wang F.S. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome // *Lancet Respir. Med.*–2020.–Vol. 8, no. 4.–P. 420-422.
520. Yang R., Elsaadi S., Misund K., Abdollahi P., Vandsemb E.N., Moen S.H., Kusnierczyk A., Slupphaug G., Standal T., Waage A., Slørdahl T.S., Rø T.B., Rustad E., Sundan A., Hay C., Cooper Z., Schuller A.G., Woessner R., Borodovsky A., Menu E., Børset M., Sponaas A.M. Conversion of ATP to adenosine by CD39 and CD73 in multiple myeloma can be successfully targeted together with adenosine receptor A2A blockade // *J. Immunother. Cancer.*–2020.–Vol. 8, no. 1.–e000610.
521. Ye F., Li X., Li L., Yuan J., Chen J. t-BHQ Provides Protection against Lead Neurotoxicity via Nrf2/HO-1 Pathway // *Oxid. Med. Cell. Longev.*–2016.–Vol. 2016.–2075915.
522. Ye Q., Wang B., Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19 // *J. Infect.*–2020.–Vol. 80, no. 6.–P. 607-613.
523. Yehia M.R., Smolyarova T.E., Shabanov A.V., Sushko E.S., Badun G.A., Kudryasheva N.S. Adaptation of a Bacterial Bioluminescent Assay to Monitor Bioeffects of Gold Nanoparticles // *Bioengineering (Basel).*–2022.–Vol. 9, no. 2.–P. 61.
524. Yetmar Z.A., Chesdachai S., Kashour T., Riaz M., Gerberi D.J., Badley A.D., Berbari E.F., Tleyjeh I.M. Prior Statin Use and Risk of Mortality and Severe Disease From Coronavirus Disease 2019: A Systematic Review and Meta-analysis // *Open Forum. Infect. Dis.*–2021.–Vol. 8, no. 7.–ofab284.

525. Yu Lomakina G., Ugarova N.N. Application of Bioluminescent Methods to Study the Effect of the Membrane-active Antibiotic Colistin on Bacterial Cells // *Photochem. Photobiol.*–2022.–Vol. 98, no. 5.–P. 1077-1083.
526. Yu M., Zhang S. Influenced tumor microenvironment and tumor immunity by amino acids // *Front. Immunol.*–2023.–Vol. 14.–1118448.
527. Zang R., Case J.B., Yutuc E., Ma X., Shen S., Gomez Castro M.F., Liu Z., Zeng Q., Zhao H., Son J., Rothlauf P.W., Kreutzberger A.J.B., Hou G., Zhang H., Bose S., Wang X., Vahey M.D., Mani K., Griffiths W.J., Kirchhausen T., Fremont D.H., Guo H., Diwan A., Wang Y., Diamond M.S., Whelan S.P.J., Ding S. Cholesterol 25-hydroxylase suppresses SARS-CoV-2 replication by blocking membrane fusion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*–2020.–Vol. 117, no. 50.–P. 32105-32113.
528. Zemb P., Bergman P., Camargo C.A. Jr., Cavalier E., Cormier C., Courbebaisse M., Hollis B., Joulia F., Minisola S., Pilz S., Pludowski P., Schmitt F., Zdrenghea M., Souberbielle J.C. Vitamin D deficiency and the COVID-19 pandemic // *J. Glob. Antimicrob. Resist.*–2020.–Vol. 22.–P. 133-134.
529. Zeng Q., Sang Y.M. Glutamate dehydrogenase hyperinsulinism: mechanisms, diagnosis, and treatment // *Orphanet. J. Rare Dis.*–2023.–Vol. 18, no. 1.–P. 21.
530. Zhang F., Hu L., Wang J., Chen J., Chen J., Wang Y. Clinical value of jointly detection serum lactate dehydrogenase/pleural fluid adenosine deaminase and pleural fluid carcinoembryonic antigen in the identification of malignant pleural effusion // *J. Clin. Lab. Anal.*–2017.–Vol. 31, no. 5.–e22106.
531. Zhang J., Zhao S., Xing X., Shang L., Cao J., He Y. Effects of Neuropeptides on Dendritic Cells in the Pathogenesis of Psoriasis // *J. Inflamm. Res.*–2023.–Vol. 16.–P. 35-43.
532. Zhang N., Zhang H., Zhu D., JiRiGaLa, Yu D., Wang C., WuYunBiLiGe, Amin, ZhiHong, Yu H., Chen X., Wang M. Prognostic role of pretreatment lactate dehydrogenase in patients with metastatic renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis // *Int. J. Surg.*–2020.–Vol. 79.–P. 66-73.
533. Zhang S., Chen S., Wang Z., Li J., Yuan Y., Feng W., Li W., Chen M., Liu Y. Prognosis prediction and tumor immune microenvironment characterization based on tryptophan metabolism-related genes signature in brain glioma // *Front. Pharmacol.*–2022.–Vol. 13.–1061597.
534. Zhang X.J., Qin J.J., Cheng X., Shen L., Zhao Y.C., Yuan Y., Lei F., Chen M.M., Yang H., Bai L., Song X., Lin L., Xia M., Zhou F., Zhou J., She Z.G., Zhu L., Ma X., Xu Q., Ye P., Chen G., Liu L., Mao W., Yan Y., Xiao B., Lu Z., Peng G., Liu M., Yang J., Yang L., Zhang C., Lu H., Xia X., Wang D., Liao X., Wei X., Zhang B.H., Zhang X., Yang J., Zhao G.N., Zhang P., Liu P.P., Loomba R., Ji Y.X., Xia J., Wang Y., Cai J., Guo J., Li H. In-Hospital Use of Statins Is Associated with a Reduced Risk of Mortality among Individuals with COVID-19 // *Cell. Metab.*–2020.–Vol. 32, no. 2.–P. 176-187.e4.
535. Zhang X.W., Wu Y.S., Xu T.M., Cui M.H. CAR-T Cells in the Treatment of Ovarian Cancer: A Promising Cell Therapy // *Biomolecules.*–2023.–Vol. 13, no. 3.–P. 465.
536. Zhang Y., Guo R., Kim S.H., Shah H., Zhang S., Liang J.H., Fang Y., Gentili M., Leary C.N.O., Elledge S.J., Hung D.T., Mootha V.K., Gewurz B.E. SARS-CoV-2 hijacks folate and one-carbon metabolism for viral replication // *Nat. Commun.*–2021.–Vol. 12, no. 1.–P. 1676.
537. Zhang Y., Wang S., Xia H., Guo J., He K., Huang C., Luo R., Chen Y., Xu K., Gao H., Sheng J., Li L. Identification of Monocytes Associated with Severe COVID-19 in the PBMCs of Severely Infected Patients Through Single-Cell Transcriptome Sequencing // *Engineering (Beijing).*–2022.–Vol. 17.–P. 161-169.
538. Zhao H., Teng D., Yang L., Xu X., Chen J., Jiang T., Feng A.Y., Zhang Y., Frederick D.T., Gu L., Cai L., Asara J.M., Pasca di Magliano M., Boland G.M., Flaherty K.T., Swanson K.D., Liu D., Rabinowitz J.D., Zheng B. Myeloid-derived itaconate suppresses cytotoxic CD8+ T cells and promotes tumour growth // *Nat. Metab.*–2022.–Vol. 4, no. 12.–P. 1660-1673.

539. Zhao S., Li H., Liu R., Tao N., Deng L., Xu Q., Hou J., Sheng J., Zheng J., Wang L., Chen W., Guo S., Liu Y.N. Nitrogen-Centered Lactate Oxidase Nanozyme for Tumor Lactate Modulation and Microenvironment Remodeling // *J. Am. Chem. Soc.*—Vol. 2023.—Vol. 145, no. 18.—P. 10322-10332.
540. Zheng F.J., Ye H.B., Wu M.S., Lian Y.F., Qian C.N., Zeng Y.X. Repressing malic enzyme 1 redirects glucose metabolism, unbalances the redox state, and attenuates migratory and invasive abilities in nasopharyngeal carcinoma cell lines // *Chin. J. Cancer.*—2012.—Vol. 31, no. 11.—P. 519-531.
541. Zhou Y., Qi M., Yang M. Current Status and Future Perspectives of Lactate Dehydrogenase Detection and Medical Implications: A Review // *Biosensors (Basel)*.—2022.—Vol. 12, no. 12.—P. 1145.
542. Zielonka J., Kalyanaraman B. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth // *Free Radic. Biol. Med.*—2010.—Vol. 48, no. 8.—P. 983-1001.
543. Zielonka J., Lambeth J.D., Kalyanaraman B. On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: a reevaluation // *Free Radic. Biol. Med.*—2013.—Vol. 65.—P. 1310-1314.

Научное издание

**Савченко Андрей Анатольевич
Кудлай Дмитрий Анатольевич
Кудрявцев Игорь Владимирович
Каспаров Эдуард Вильямович
Головкин Алексей Сергеевич
Продеус Андрей Петрович
Борисов Александр Геннадьевич**

ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ И КОРРЕКЦИИ ИММУНОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ

клиническая иммунология для практических врачей

Оператор электронной верстки – Т. Н. Мойченко

ISBN 978-5-6050478-1-0



9 785605 047810 >

Подписано в печать 27.09.2023 г.
Бумага офсетная 80 г/м². Усл. п. л. 27,74.
Тираж 3000 экз. Заказ № 2149.
Отпечатано в ООО «Версона».
660079, Красноярск, ул. А. Матросова, 30к.
Тел. 235-04-89, e-mail: versona24@yandex.ru.