

*На правах рукописи*

**ЛАЗАРЕВА  
Наталья Михайловна**

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ  
ДИАГНОСТИКИ САРКОИДОЗА**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» Министерства Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайных ситуаций и ликвидации последствий стихийных бедствий

**Научные руководители:**

**Тотолян Арег Артемович** – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор  
**Сесь Татьяна Павловна** – доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

**Свитич Оксана Анатольевна** – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», директор.

**Серебряная Наталья Борисовна** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», отдел иммунологии, заведующая лабораторией общей иммунологии.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится 14 декабря 2021 года в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, г. Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте <https://www.ngsrm.ru>.

Автореферат разослан “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат медицинских наук доцент

**Санников Максим Валерьевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Саркоидоз представляет собой полисистемное воспалительное гранулематозное заболевание неизвестной этиологии с формированием гранул без некроза в различных тканях, но преимущественно в органах дыхания [Илькович М.М., 2021; Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению саркоидоза., 2016.; Sakthivel P., 2017; Kobak S., 2015]. Особенности клинических проявлений и исходов саркоидоза органов дыхания в настоящее время достаточно активно изучаются [Grunewald J., 2019; Vaughman R.P., 2019; Bennett D., 2019; Valeyre D., 2014], однако, унифицированных подходов к определению лабораторных диагностических маркеров заболевания все ещё не существует. Важными являются современные подходы клинической лабораторной диагностики при саркоидозе: определение субпопуляций клеток и цитокинов. Необходим поиск новых лабораторных иммунологических параметров – предикторов активного, прогрессирующего течения саркоидоза, с возможным тяжелым и прогностически неблагоприятным исходом в пневмофиброз.

Особенности клинического течения заболевания разнообразны, общий диагноз «саркоидоз» включает в себя крайне разнородные формы заболевания, требующие своевременной коррекции лечения, в том числе, назначения иммуносупрессивной терапии. В этой связи комплексное изучение клеточных и гуморальных реакций врожденного и адаптивного иммунитета при разных типах течения саркоидоза является актуальной задачей [Bennett D., 2019; Miedema J.R., 2018; Broos C.E., 2018; Paulissen S.M., 2015; Lubberts E., 2015; Ten Berge V., 2012].

Существует гипотеза, что саркоидоз – это группа аутовоспалительных заболеваний с неизвестной этиологией, развивающихся в результате комплекса причинно-следственных связей между воздействием на организм триггерных факторов внешней среды (минералов, микро- и наночастиц, инфекционных агентов) и генетических особенностей самого организма [Grunewald J., 2019; Valeyre D., 2014].

Исследования ученых разных стран направлены на анализ роли ключевых лабораторных биомаркеров: субпопуляций Т-хелперов 1 и 17 типов (Th1 и Th17), регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) и В-лимфоцитов в патогенезе саркоидоза, в ряде работ описаны особенности зависимости клинического течения заболевания от активности этих клеток [Bennett D., 2019; Miedema J.R., 2018; Broos C.E., 2018; Ding J., 2017; Broos C.E., 2016; Ten Berge V., 2012; Facco M., 2011]. Ведется поиск перспективных клеточных лабораторных маркеров, обладающих информативностью для диагностики, оценки активности заболевания и его прогноза. Изучается роль «пластичных» форм Th17 типа и их вклад в иммунопатогенез саркоидоза [Bennett D., 2019; Miedema J.R., 2018; Broos C.E., 2018; Georas S.N., 2016; Ramstein J., 2016; Lubberts E., 2015; Paulissen S.M., 2015], а также роль дисбаланса между активностью «провоспалительных» Th1, Th17 и Т-хелперов, способных подавлять воспаление – Treg в клиническом течении саркоидоза [Ding J., 2017; Georas S.N., 2016, Broos C.E., 2015].

Данные о роли гуморального звена иммунитета в развитии саркоидоза весьма ограничены [Kaiser Y., 2019; Sakthivel P., 2017; Häggmark A., 2015; Kobak S., 2014; Broos C.E., 2013; Weinberg I., 2000].

Активно изучается роль клинико-лабораторных показателей – цитокинов, синтезируемых клетками как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Важным направлением исследования иммунопатогенеза саркоидоза является определение роли и

хемокинов, обеспечивающих направленную миграцию разных типов клеток из периферической крови в очаг воспаления с дальнейшим формированием саркоидных гранулем [Arger N.K., 2020; Bennett D., 2019; Broos C.E., 2018; Miedema J.R., 2018; Nguyen C.T.H., 2018; Patterson K.C., 2018; Loke W.S., 2013; Patterson K.C., 2013; Loza M.J., 2011]. Разные типы разрешения гранулематозного процесса при саркоидозе – от рассасывания гранулем при спонтанной ремиссии до формирования пневмофиброза при неблагоприятном течении также во многом определяются участием различных клеток и цитокинов [Arger N.K., 2020; Arger N.K., 2019; Bennett D., 2019; Broos C.E., 2018; Miedema J.R., 2018; Nguyen C.T.H., 2018; Patterson K.C., 2013; Facco M., 2011].

Данные, полученные различными авторами, нередко противоречивы, в этой связи необходима дальнейшая систематизация лабораторных показателей и их сопоставление с клиническими особенностями течения заболевания, что позволит расширить спектр наиболее информативных параметров для клинической лабораторной диагностики саркоидоза.

### **Степень научной разработанности темы**

Многолетнее изучение этиологии, патогенеза и особенностей клинического течения саркоидоза позволило получить достаточно много информации о генетической предрасположенности организма к развитию гиперчувствительных ответов на пока еще не установленные факторы; об этапах развития гранулематозного процесса в разных органах и тканях, а также особенностях исходов заболевания – от спонтанной ремиссии до формирования фиброза в пораженных тканях [Илькович М.М., 2021; Bennett D., 2019; Grunewald J., 2019; Broos C.E., 2018; Miedema J.R., 2018; Nguyen C.T.H., 2018; Patterson K.C., 2013; Facco M., 2011]. Наряду с этим, многие аспекты иммунопатогенеза саркоидоза по-прежнему остаются не раскрытыми, в особенности, это касается роли различных типов циркулирующих клеток в развитии заболевания. Не существует единых данных и подходов к лабораторному определению этих клеток и их популяций при особенностях течения и прогноза саркоидоза.

Нет данных об информативности определения лабораторных биомаркеров – хемокинов, отвечающих за миграцию клеток в очаг воспаления и их дальнейшее вовлечение в процесс формирования гранулем при саркоидозе.

Остаются недостаточно изученными вопросы о триггерных и этиологических факторах заболевания, что не позволяет окончательно сформировать парадигму вовлечения параметров клеточного и/или гуморального звена адаптивного иммунитета, развивающегося на причиннозначимые антигены при саркоидозе. А, следовательно, важных клинико-лабораторных показателей, отражающих иммунопатогенез заболевания, и являющихся диагностически значимыми при разных типах течения и прогноза заболевания.

### **Цель исследования**

Определить иммунопатогенетическую роль субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, цитокинов и хемокинов их регулирующих, при саркоидозе органов дыхания для поиска новых лабораторных биомаркеров активности и прогноза заболевания.

### **Задачи исследования:**

1. Определить содержание субпопуляций Т-хелперов, в частности Т-хелперов 17 типа, в периферической крови больных саркоидозом органов дыхания и выявить их роль в иммунопатогенезе при разных типах течения и активности заболевания.
2. Выявить особенности субпопуляционного состава В-лимфоцитов, с учетом экспрессии IgD/CD27 и IgD/CD38, в периферической крови больных саркоидозом органов дыхания при разных типах течения и активности заболевания.

3. Оценить содержание и баланс регуляторных Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности молекулы CD39 и CD73, в периферической крови больных хроническим саркоидозом органов дыхания.
4. Проанализировать изменения концентраций цитокинов и хемокинов в плазме крови больных саркоидозом органов дыхания в зависимости от клинической картины заболевания.
5. Определить наиболее информативные лабораторные иммунологические параметры при разных типах клинического течения впервые выявленного саркоидоза органов дыхания и оценить их значимость в динамике развития заболевания – через год после постановки диагноза с учетом экстрапульмональных проявлений и признаков фиброзирования легочной ткани.
6. Создать лабораторный диагностический алгоритм обследования пациентов с впервые выявленным саркоидозом органов дыхания с учетом дополнительных биомаркеров течения и прогноза заболевания.

### **Научная новизна**

Выполненный в диссертационной работе анализ широкого спектра клинико-лабораторных иммунологических параметров у больных с впервые выявленным саркоидозом органов дыхания, не получавших иммуносупрессивную терапию, позволил охарактеризовать особенности изменений содержания лабораторных показателей (субпопуляций лимфоцитов и цитокинов) при остром и первично-хроническом течении заболевания.

В работе впервые показано, что наиболее информативными клинико-лабораторными параметрами при разных типах течения саркоидоза является число DP Th17 типа; содержание субпопуляций В-клеток памяти (с учетом экспрессии IgD/CD27 и IgD/CD38) в периферической крови; концентрации цитокинов IL-7, IL-10, CCL17/TARC, CCL22/MDC, CXCL9/MIG в плазме крови больных саркоидозом.

Впервые доказано, что уровни лабораторных показателей – цитокинов CCL17/TARC, CCL22/MDC в плазме крови больных саркоидозом коррелируют с активностью заболевания; повышенное содержание цитокинов CCL17/TARC, CCL22/MDC, CXCL9/MIG отмечается у больных с системными экстрапульмональными проявлениями саркоидоза; повышенное содержание цитокинов IL-7 и IL-10 является признаком пневмофиброза.

### **Теоретическая значимость работы**

Впервые описано, что основную роль в иммунопатогенезе саркоидоза играют лабораторные иммунологические показатели: «дважды-позитивные» DP Th17 и «не классические» Th17.1 типа. Число DP Th17 в периферической крови больных коррелирует с лабораторным показателем активности заболевания – уровнем ангиотензин-превращающего фермента.

Установлено, что иммунопатогенез саркоидоза характеризуется активацией не только клеточного, но и гуморального звена иммунитета, о чем свидетельствует определение изменений клинико-лабораторных биомаркеров в крови больных: выявлено повышение числа «наивных» В-лимфоцитов (IgD+CD27–), «активированных наивных» Вm2 лимфоцитов (IgD+CD38+) и снижение числа субпопуляций В-клеток памяти: клеток ранней памяти eVm5 (IgD–CD38+), покоящихся клеток памяти Вm5 (IgD–CD38–), клеток памяти с не переключенным классом синтезируемых антител (IgD+CD27+) и с переключенным классом синтезируемых антител (IgD–CD27+). Впервые показано, что при хроническом течении саркоидоза существует прямая корреляционная связь между содержанием наивных В-лимфоцитов, а также обратная корреляционная зависимость

между содержанием В-лимфоцитов памяти и уровнем ангиотензин-превращающего фермента.

Впервые установлено нарушение механизмов иммунорегуляции на уровне регуляторных Т-лимфоцитов при хроническом саркоидозе, о чем свидетельствует снижение числа «наивных» регуляторных Т-лимфоцитов с фенотипом CD45R0–CD62L+ и высокоактивных CD3+CD4+CD25brightCD73+ регуляторных Т-лимфоцитов центральной и эффекторной памяти.

### **Практическая значимость работы**

Практическая значимость диссертационного исследования состоит в важности определения изученных дополнительных диагностических маркеров при поступлении пациентов с саркоидозом в специализированные пульмонологические отделения. Единый подход к иммунодиагностике наиболее достоверных и информативных показателей позволит оптимизировать схему терапии в ранние сроки после поступления больных в многопрофильный стационар.

Разработан лабораторный диагностический алгоритм последовательности определения наиболее информативных лабораторных показателей (цитокинов CCL17/TARC, CCL22/MDC, CXCL9/MIG, IL-7 и IL-10) для их использования в качестве дополнительных биомаркеров активности и прогноза саркоидоза органов дыхания. Созданный диагностический алгоритм апробирован на репрезентативной выборке больных с учетом изменений особенностей клинического течения саркоидоза органов дыхания через год после постановки диагноза, что позволяет прогнозировать тип клинического течения заболевания и его исход (активное течение, наличие экстрапульмональных проявлений, формирование пневмофиброза).

Внедрение данного диагностического алгоритма в практику специализированных иммунологических лабораторий многопрофильных стационаров с отделениями пульмонологии является важным для объективизации и оценки клинического течения саркоидоза с целью проведения своевременной коррекции лечения, в том числе, назначения иммуносупрессивной терапии (системными кортикостероидами, биологической терапией).

### **Методология и методы исследования**

Методология диссертационного исследования основана на научных трудах отечественных и зарубежных авторов в области изучения иммунопатогенеза саркоидоза органов дыхания. Для решения задач, поставленных перед исследованием, была проведена оценка клинических, инструментальных и лабораторных данных больных саркоидозом.

В диссертационное исследование включено 123 пациента с саркоидозом органов дыхания и 43 условно здоровых добровольца, в образцах периферической крови которых определялось содержание субпопуляций лимфоцитов и концентрации цитокинов. В работе использовали современные диагностические лабораторные методы проточной цитофлуориметрии и мультиплексного анализа по технологии xMAP («Luminex»).

Результаты, полученные в ходе исследования, были статистически обработаны с использованием программ Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 5.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Охарактеризованные диагностические показатели (DP Th17 типа; IgD/CD38 и IgD/CD27 В-лимфоциты памяти) являются достоверными и отражают изменения в клеточном и гуморальном звеньях впервые выявленного саркоидоза органов дыхания.

2. Маркерами хронического течения саркоидоза органов дыхания являются изменения, выражающиеся в снижении CD73+ регуляторных Т-лимфоцитов центральной и эффекторной памяти.
3. Последовательное определение дополнительных клинико-лабораторных показателей позволяет оценить активность течения саркоидоза органов дыхания (цитокины CCL17/TARC, CCL22/MDC), наличие системных (экстрапульмональных) проявлений (цитокины CCL17/TARC, CCL22/MDC, CXCL9/MIG), фиброза легких (цитокины IL-7, IL-10).

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность и обоснованность полученных результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным объемом выборки обследованных пациентов (n=123) и выполненными лабораторными иммунологическими исследованиями, а также современными методами статистической обработки полученных данных.

Основные результаты диссертационного исследования были доложены и обсуждены на XXVII Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (Санкт-Петербург, 2017), VII Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения» (Санкт-Петербург, 2017), Российской Научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 70-летию ФМБА России «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии и иммунофармакологии» (Санкт-Петербург, 2017), XXI Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2018), Международном форуме биотехнология: состояние и перспективы развития (Москва, 2018), Российской научно-практической конференции молодых ученых «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии и иммунофармакологии. Иммунодиагностика, иммунопрофилактика и иммунотерапия иммунозависимых и инфекционных болезней» (Сочи, 2018), XXVIII Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (Москва, 2018), VII Конгрессе национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, 2018), V Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2019), XIV Всероссийской с международным участием Школе-конференции «Фундаментальные вопросы экспериментальной и клинической физиологии дыхания» (Санкт-Петербург, 2019), XI Всероссийской с международным участием школе-конференции по клинической иммунологии «Иммунология для врачей» (Пушкинские Горы, Псковская область, 2020), VI Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2020), XXX Юбилейном национальном конгрессе по болезням органов дыхания с международным участием, конкурс молодых ученых (Москва, 2020).

#### **Личный вклад автора**

Автор диссертационного исследования участвовала во всех этапах подготовки и проведения научной работы. Автор лично провела анализ литературных данных по теме исследования, историй болезни, руководств по применению использованных в исследовании лабораторных иммунологических методов. Автором лично сформулированы цели и задачи, проанализированы и систематизированы полученные результаты, проведен статистический анализ полученных данных, подготовлены материалы к публикациям и докладам.

Совместно с заведующим лабораторией иммунорегуляции, отдела иммунологии ФГБНУ «Института экспериментальной медицины», к.б.н. Кудрявцевым И.В. автор диссертации проводила цитометрический анализ субпопуляционного состава лимфоцитов в образцах периферической крови больных саркоидозом. Совместно с научными сотрудниками лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-

Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека к.б.н. Арсентьевой Н.А. и к.б.н. Любимовой Н.Е. проводилось определение концентраций цитокинов и хемокинов в исследованных образцах плазмы крови методом мультиплексного анализа. Обследование больных и взятие биоматериала и осуществлялось в Научно-исследовательском институте интерстициальных и орфанных заболеваний легких ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ совместно с врачом пульмонологом, старшим научным сотрудником научно-исследовательского института интерстициальных и орфанных заболеваний легких, доцентом кафедры пульмонологии факультета последипломного образования к.м.н. Барановой О.П.

#### **Внедрение результатов исследования в практику**

Основные результаты исследования внедрены в практику преподавания курса клинической иммунологии для студентов 3 курса лечебного факультета, а также врачей общей практики и пульмонологов на кафедре пульмонологии факультета последипломного образования и кафедре терапии госпитальной им. М.В. Черноруцкого с курсом «Аллергология и иммунология» ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России. Результаты исследования также внедрены в практическую работу отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ «ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова» МЧС России.

Издано учебное методическое пособие «Иммунопатогенез саркоидоза» группой авторов кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» для студентов V-VI курсов, врачей-интернов и клинических ординаторов.

#### **Публикации результатов исследования**

По теме диссертационного исследования опубликовано 7 печатных работ в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации материалов диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, из которых 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, включенных в глобальные индексы цитирования (SCOPUS).

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 168 страницах машинописного текста и состоит из разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, списка сокращений, списка литературы, приложений. Работа содержит 25 таблиц, иллюстрирована 19 рисунками, имеет 5 приложений. Список использованной литературы состоит из 238 источников, из которых 17 отечественных и 221 зарубежных.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материалы и методы исследования.** Обследовано 123 больных саркоидозом органов дыхания (СОД), наблюдавшихся с 2016 по 2020 годы в НИИ интерстициальных и орфанных заболеваний легких при ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России. В основную группу вошли пациенты СОД: 49 мужчин (40%), 74 женщины (60%) в возрасте от 20 до 67 лет. У всех пациентов диагноз СОД был установлен на основании комплексного клинико-рентгенологического (включая компьютерную томографию



органов грудной полости) исследования. Диагноз СОД был подтвержден с помощью гистологического исследования после биопсии бронхо-легочной ткани и/или лимфоузлов средостения у 67% (82/123) больных и по клинико-рентгенологическим данным у 33% (41/123) больных.

Критерии включения в исследование были следующие:

- установленный диагноз «саркоидоз органов дыхания»;
- возраст пациентов старше 18 лет;
- наличие информированного согласия;
- отсутствие проводимого ранее лечения (все пациенты не получали иммуносупрессивную терапию, в том числе системные кортикостероиды, и не проходили процедуру экстракорпоральной гемокоррекции – плазмаферез).

Критерии исключения: наличие других заболеваний легких, характеризующихся гранулематозным воспалением, в частности туберкулеза легких; наличие лимфопролиферативных заболеваний; наличие аутоиммунных заболеваний; тяжелая сопутствующая патология; применение иммуносупрессивного лечения.

В контрольную группу были включены биологические образцы 43 условно здоровых лиц без клинических проявлений заболеваний в том числе дыхательной системы (18 мужчин (42%), 25 женщин (58%) в возрасте от 20 до 61 лет), сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными саркоидозом.

В зависимости от клинического течения СОД были выделены две основные группы: 1 группа – пациенты с острым течением саркоидоза («синдром Лёфгрена»), 2 группа – пациенты с хроническим течением заболевания («не синдром Лёфгрена»). В 1 группу вошли 22/123 (18%) пациента (3 мужчин, 19 женщин в возрасте от 25 до 67 лет), во 2 группу – 101/123 (82%) пациента (46 мужчин, 55 женщины в возрасте от 20 до 63 лет).

Обследование больных проводилось с использованием общепринятых лабораторных методов. Всем больным выполнялась мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) органов грудной клетки (ОГК), комплексное функциональное исследование внешнего дыхания (КФВД), эходоплеркардиография (ЭходоплерКГ) с учетом расчетного систолического давления в легочной артерии (СДЛА, мм.рт.ст.), ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости, при необходимости проводилась видеоторакокопия (ВТС) с биопсией легочной ткани или лимфатического узла средостения, ФБС (фибробронхоскопия) с эндобронхиальной биопсией слизистой бронхов или чрезbronхиальной биопсией легочной ткани с последующим гистологическим исследованием в лабораториях и отделениях ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

На основании этих данных были выделены группы больных саркоидозом только органов дыхания и больных саркоидозом органов дыхания с экстрапульмональными (системными) проявлениями. Среди всех больных СОД без системных проявлений – 39/88 (44%), с таковыми проявлениями – 49/88 (56%), среди больных хроническим саркоидозом: 34/76 (45%), 42/76 (55%), соответственно.

В качестве лабораторного показателя активности саркоидоза использовали уровень активности ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) в сыворотке крови больных. Данный показатель определялся пациентам при госпитализации или амбулаторном приеме с помощью кинетического энзиматического метода с использованием наборов фирмы-производителя в соответствии с инструкцией (Buhlmann, Германия) в лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний научно-методического центра молекулярной медицины ПСПбГМУ им. И.П. Павлова. Единицы

измерения – единицы активности: ACE Unit (=1IU/ml). Референсные значения активности АПФ у лиц старше 18 лет составляли 20-70 ACE Unit, и, соответственно, у пациентов с саркоидозом повышенные уровни активности АПФ рассматривались при величине этого показателя выше 70 ACE Unit. На основании анализа уровня АПФ в сыворотке крови, были выделены две основные группы пациентов с хроническим дебютом саркоидоза: больные с нормальным уровнем активности АПФ (n=15), больные с повышенным уровнем активности АПФ (n=26).

На основании ретроспективного анализа результатов клинико-рентгенологического и функционального обследования было выполнено распределение больных в 3 группы в зависимости от особенностей течения заболевания: 1 – стабильное – 12/65 (18,5%), 2 – прогрессирующее – 37/65 (56,9%), 3 – рецидивирующее – 16/65 (24,6%) больных саркоидозом.

Через год после постановки диагноза у 38 больных из числа обследованных было оценено клиническое течение заболевания на основании результатов КТ-исследования органов грудной клетки, функциональных показателей и выявления экстрапульмональных проявлений.

Ретроспективный анализ иммунологических показателей был проведен в зависимости от клинической картины заболевания через год после постановки диагноза с учетом: наличия или отсутствия спонтанной регрессии изменений; выраженности экстрапульмональных проявлений; выраженности фиброзирование легочной ткани. У 12/38 (31,6%) обследованных пациентов с впервые установленным диагнозом СОД при отсутствии иммуносупрессивной терапии отмечалась самопроизвольная регрессия клинико-рентгенологических изменений и нормализация функциональных показателей. У 26/38 (68,4%) больных отмечались признаки прогрессирования заболевания (нарастание изменений в легких при контрольном КТ-исследовании органов грудной клетки, ухудшение функциональных показателей, выявление экстрапульмональных проявлений). Таким больным была назначена иммуносупрессивная терапия.

Объект исследования – венозная кровь, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки, содержащие K<sub>3</sub>ЭДТА. Цитофлуориметрические исследования по определению субпопуляций лимфоцитов проводились в день взятия крови. Для определения концентраций цитокинов пробирки центрифугировали при 1500 оборотов в минуту, 10 минут. Далее образцы плазмы хранили в нескольких аликвотах при температуре -80°C до момента проведения исследования.

В цельной крови производилась оценка состава субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии с использованием диагностического прибора Navios (Beckman Coulter, Inc., США), оснащенного тремя лазерами с длинами волн излучения 405, 488 и 638 нм. Обработка данных проводилась с использованием программ: Navios Software v.1.2, Kaluza™ v.2.0 (Beckman Coulter, США). Для определения субпопуляций лимфоцитов использовались различные комбинации прямых моноклональных антител (Beckman Coulter, США; Biolegend, США). Результаты содержания лимфоцитов представлены в виде: % – процента содержания от общего числа лимфоцитов или исследуемой популяции лимфоцитов; абсолютного (кл/мкл, количество клеток в 1 мкл периферической крови) числа лимфоцитов.

T-хелперы выявляли как CD3+CD4+ лимфоциты. С целью выявления отдельных популяций, находящихся на различных стадиях дифференцировки, применяли антитела против поверхностных CD45RA и CD62L. «Наивные» Th с фенотипом CD45RA+CD62L+ для дальнейших исследований не использовали в силу отсутствия

экспрессии интересующих хемокиновых рецепторов на их поверхности. «Терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные Т-хелперы (TEMRA) с фенотипом CD45RA+CD62L<sup>-</sup> также исключались из дальнейшего анализа в виду практически полного отсутствия данной популяции клеток в периферической крови условно здоровых доноров. Th памяти подразделялись на основании экспрессии CD62L и CD45RA на Т-хелперы центральной (CM Th) и эффекторной (EM Th) памяти с фенотипами CD45RA-CD62L<sup>+</sup> и CD45RA-CD62L<sup>-</sup>, соответственно. На указанных субпопуляциях Th при помощи моноклональных антител анализировали уровень экспрессии хемокиновых рецепторов: CCR4, CCR6, CXCR3, CXCR5. Для выявления основных субпопуляций Т-лимфоцитов и регуляторных Т-лимфоцитов оценивали уровень экспрессии ими молекул CD39 и CD73.

Выявления основных стадий дифференцировки В-лимфоцитов производили на основе анализа ко-экспрессии IgD и CD38, а также IgD и CD27. Окраска антителами против IgD и CD38 позволяет идентифицировать популяции В-клеток: «наивные» Vm1 клетки с фенотипом IgD+CD38<sup>-</sup>, «активированные наивные» Vm2 клетки (IgD+CD38<sup>+</sup>), Vm2' – клетки-предшественники В-клеток зародышевых центров периферических лимфоидных органов (IgD+CD38<sup>++</sup>), общая субпопуляция, включающая в себя центробласты и centroциты – так называемые «Vm3+Vm4» клетки (IgD-CD38<sup>++</sup>), клетки ранней памяти eVm5 (IgD-CD38<sup>+</sup>) и покоящиеся клетки памяти Vm5 (IgD-CD38<sup>-</sup>). Оценка ко-экспрессии IgD и CD27 позволяет разделить общий пул В-лимфоцитов на «наивные» клетки с фенотипом IgD+CD27<sup>-</sup>, выявить три типа В-клеток памяти – клетки памяти с непереключенным классом синтезируемых антител («unswitched» IgD+CD27<sup>+</sup>), клетки памяти с переключенным классом синтезируемых антител («class-switched» IgD-CD27<sup>+</sup>) и так называемые «дважды-негативные» клетки памяти (IgD-CD27<sup>-</sup>), а также циркулирующие предшественники плазматических клеток с фенотипом IgD-CD27<sup>++</sup>.

В плазме крови методом мультиплексного анализа по технологии xMAP («Luminex») проводили измерение концентраций следующих цитокинов (пг/мл): интерлейкины и некоторые провоспалительные цитокины: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ /Lymphotoxin- $\alpha$ (LTA); противовоспалительные цитокины: IL-1Ra, IL-10; ростовые факторы: EGF, FGF-2/FGF-basic, Flt3 Ligand, G-CSF, GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF $\alpha$ , VEGF-A; другие растворимые факторы: sCD40L; хемокины: CC-хемокины (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL17/TARC, CCL20/MIP-3 $\alpha$ , CCL22/MDC); CXC-хемокины (CXCL1/GRO, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL13/BCA-1); CX3C-хемокины (CX3CL1/Fractalkine).

Использовали коммерческие тест-системы «Milliplex MAP» («Millipore», США) с применением магнитных микросфер «Milliplex Mag», США) в соответствии инструкциям фирмы-производителя. Регистрацию и анализ полученных данных проводили на приборе «Luminex MAGPIX» («Luminex», США).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакетов программ Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 5.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Результаты считались статистически достоверными при уровне статистической значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**«Поляризованные» Т-хелперы в периферической крови больных саркоидозом.** Среди «поляризованных» субпопуляций CM Th отмечалось достоверно сниженное относительное и абсолютное содержание Th1 клеток в группе больных хроническим дебютом саркоидоза относительно контрольной группы, при  $p < 0,001$ . Так же между этими группами отмечались достоверно значимые различия в абсолютном содержании Th2 ( $p = 0,005$ ) и Tfh ( $p = 0,006$ ) в сравнении с группой условно здоровых лиц. Достоверных различий по относительному содержанию CCR6-экспрессирующих Th17 не отмечалось.

Анализ субпопуляций «поляризованных» Th в рамках общего пула EM Th показал достоверно сниженное относительное и абсолютное содержание Th1 в группе больных хроническим дебютом саркоидоза относительно условно здоровых лиц, при  $p = 0,034$   $p = 0,003$ , соответственно. Так же в образцах больных с хроническим дебютом было достоверно снижены концентрации Th1 типа в сравнении с образцами больных острым дебютом ( $p = 0,018$ ). Абсолютное содержание клеток Th2 типа оказалось достоверно повышено в группе больных острым относительно больных хроническим саркоидозом ( $p < 0,001$ ).

Среди субпопуляций EM Th отмечались изменения содержания CCR6-экспрессирующих Th17 типа. В образцах крови больных с острым дебютом саркоидоза были достоверно повышены их концентрации относительно группы с хроническим дебютом и группы контроля,  $p = 0,011$  и  $p = 0,032$ , соответственно.

Анализ содержания Tfh среди субпопуляций EM показал достоверно сниженное их абсолютное содержание в образцах больных с хроническим дебютом в сравнении с группой контроля ( $p = 0,003$ ).

**Особенности субпопуляционного состава «поляризованных» Т-хелперов 17 типа в периферической крови больных саркоидозом.** Среди всех CD45RA-негативных клеток памяти отмечались следующие достоверно значимые изменения между субпопуляциями Th17 типа: содержание «классических» Th17 оказалось достоверно снижено в образцах больных с острым дебютом саркоидоза относительно хронического дебюта, при  $p = 0,046$ . Уровень DP Th17 был достоверно повышен как в образцах с хроническим, так и в образцах с острым дебютом относительно контрольной группы, при  $p < 0,001$  в обоих случаях. Содержание «не классических» Th17.1 типа оказалось достоверно снижено только в образцах крови больных с хроническим дебютом в сравнении с условно здоровыми лицами ( $p < 0,001$ ). Отмечалось также достоверно сниженное количество DN Th17 в образцах крови хроническим и острым дебютом относительно группы контроля,  $p = 0,002$ .

При сопоставлении полученных в работе закономерностей с данными литературы, оказалось, что результаты определения субпопуляции Th17 типа в периферической крови больных саркоидозом противоречивы. Ряд авторов указывают на повышение уровня CCR6+ эффекторных Th (CD45RA-CD45R0+) у больных саркоидозом по сравнению с группой контроля [Ramstein J., 2016]. Другие работы свидетельствуют, что число IL-17A-продуцирующих клеток в периферической крови больных саркоидозом по сравнению со здоровыми существенно снижено [Miedema J.R., 2018; Patterson K.C., 2018; Sakthivel P., 2017].

В образцах крови пациентов с хроническим дебютом саркоидоза в рамках общего пула CCR6+ CM Th отмечено достоверно сниженное содержание «не классических»

Th17.1 и DN Th17 относительно значений группы контроля,  $p < 0,001$  и  $p = 0,004$ , соответственно. Уровень CCR4-экспрессирующих DP Th17 в образцах пациентов с хроническим саркоидозом, был достоверно выше контрольных показателей,  $p = 0,002$ . При остром дебюте саркоидоза отмечалось повышенное содержание в сравнении с условно здоровыми лицами DP Th17,  $p = 0,003$ . В образцах крови пациентов с хроническим и острым дебютом саркоидоза в рамках общего пула EM Th отмечено достоверно сниженные уровни «не классических» Th17.1 относительно значений группы контроля:  $p < 0,001$  и  $p = 0,017$ . В образцах крови больных как с хроническим, так и острым дебютом саркоидоза наблюдалось достоверно увеличенное содержание DP Th17 относительно контрольной группы, при  $p < 0,001$ .

Таким образом, полученные изменения состава Th17 типа может свидетельствовать об их иммунопатогенетической роли при саркоидозе органов дыхания. В частности, субпопуляций DP Th17 и Th17.1.

**Субпопуляции фолликулярных Т-хелперов в периферической крови больных саркоидозом.** В образцах крови больных хроническим саркоидозом относительно группы контроля среди CD45RA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> было обнаружено достоверно сниженное содержание Tfh1 (как в процентном, так и абсолютном количестве, при  $p = 0,036$  и  $p = 0,006$ , соответственно), а также абсолютные значения Tfh2, Tfh17 и DP Tfh, при  $p = 0,014$ ,  $p = 0,031$  и  $p = 0,007$ .

Особенности содержания и распределения разных субпопуляций клеток Tfh у больных саркоидозом практически не охарактеризованы. Существует незначительное число публикаций, посвященных данному вопросу [Kudryavtsev I., 2020; Ly N.T.M., 2020]. В исследовании Ly и соавторов оценивались все три субпопуляции Tfh в периферической крови больных саркоидозом: Tfh1, Tfh2, Tfh17, а также интенсивность флуоресценции рецептора CXCR5 на поверхности клеток.

**Состав регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови больных саркоидозом.** В образцах крови больных с хроническим дебютом саркоидоза относительно условно здоровых лиц отмечается достоверно сниженное процентное содержание регуляторных Т-лимфоцитов (Tрег) в рамках общей лимфоцитарной популяции циркулирующих клеток,  $p = 0,022$ . Эти изменения носят еще более выраженный характер в случае анализа данной популяции клеток в абсолютных значениях, при  $p = 0,004$ .

Анализ экспрессии поверхностных нуклеотидаз CD39 и CD73, играющих ведущую роль в расщеплении провоспалительного АТФ до противовоспалительного аденозина на поверхности циркулирующих Tрег выявил существенные различия между обследованными группами пациентов. Относительное содержание CD39-позитивных клеток среди Tрег достоверно выше в образцах крови больных как хроническим, так и острым дебютом саркоидоза в сравнении с группой условно здоровых лиц, при  $p < 0,001$  и  $p = 0,007$ , соответственно. При анализе содержания CD73-позитивных Tрег обнаружено, что относительное содержание этих клеток было достоверно снижено только в образцах больных хроническим саркоидозом при сравнении с условно здоровыми лицами,  $p = 0,011$ .

Данные исследователей о числе Tрег в периферической крови больных саркоидозом достаточно противоречивы. В ряде работ показано снижение иммуносупрессивной способности Tрег у пациентов с саркоидозом [Broos С.Е., 2015]. Другие авторы указывают на повышение числа Tрег на фоне снижения субпопуляции Th17 типа у больных саркоидозом [Liu Y., 2016]. Huang и соавторы выявили почти трехкратное снижение относительного числа CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tрег в крови

больных с первично выявленным саркоидозом по сравнению с группой здоровых [Huang H., 2013].

Была произведена оценка уровней экспрессии мембранно-ассоциированных экзоферментов CD39 и CD73 среди всех Трег различных субпопуляций на разных стадиях дифференцировки клеток (в % содержании). «Наивные» Трег достоверно не различались по относительному содержанию CD39- и CD73-позитивных клеток во всех исследованных группах. Регуляторные Т-клетки СМ в образцах крови больных саркоидозом с хроническим и острым саркоидозом содержали достоверно больше клеток, экспрессирующих CD39 на своей поверхности против контрольной группы  $p < 0,001$  и  $p = 0,004$ , соответственно. Уровень экспрессии CD73 был достоверно снижен на клетках памяти СМ Трег периферической крови у больных с хроническим саркоидозом против больных с острым дебютом и в группе контроля, при  $p = 0,026$  и  $p = 0,011$ , соответственно. Среди Трег ЕМ клеток памяти отмечается достоверно увеличенное относительное содержание CD39-позитивных лимфоцитов только при сравнительном анализе у больных с хроническим дебютом саркоидоза и условно здоровых доноров,  $p = 0,006$ . Относительное содержание клеток, экспрессирующих CD73, у больных с хроническим дебютом было достоверно снижено относительно группы контроля ( $p = 0,015$ ). Таким образом, хроническое течение саркоидоза, в отличие от острого, характеризуется выраженным снижением числа высокоактивных CD3+CD4+CD25brightCD73+ Трег, что указывает на дисбаланс в системе иммунорегуляции у таких больных.

**Изменения субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови больных саркоидозом.** Различий в содержании субпопуляций В-лимфоцитов по «Vml-Vm5» классификации между группами обследованных больных получено не было. Достоверные различия между содержанием субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови были выявлены между группами больных с острым и хроническим дебютом заболевания по сравнению с группой условно здоровых лиц. Отмечено достоверно повышенное относительное содержание «активированных наивных» Vm2 клеток при остром и при хроническом саркоидозе относительно здоровых лиц, при  $p = 0,017$  и  $p < 0,001$ , соответственно. Число eVm5 и Vm5 клеток памяти, напротив, было достоверно ниже в группах больных саркоидозом относительно группы контроля, при  $p < 0,001$ .

На основании анализа ко-экспрессии IgD и CD27 были получены изменения по содержанию субпопуляций В-клеток. Относительное содержание наивных IgD+CD27-клеток среди общей популяции CD19+ лимфоцитов было достоверно повышено в образцах крови больных саркоидозом острым и хроническим саркоидозом, при  $p < 0,001$  в обоих случаях. Отмечается сниженное содержание относительного и абсолютного количества как клеток памяти, не переключивших класс синтезируемых антител, так и клеток памяти, переключивших класс синтезируемых антител при  $p < 0,001$  во всех случаях.

Литературные данные сопоставимы с данными диссертационной работы. В работе Lee N.S. и соавторов получено, что у больных с тяжелым течением хронического саркоидоза отмечалось достоверно сниженное число CD27-позитивных В-лимфоцитов памяти и В-клеточная лимфопения [Lee N.S., 2011]. Сниженное содержание В-клеток памяти и изменения в субпопуляционном составе В-лимфоцитов периферической крови у пациентов с активным хроническим саркоидозом отмечается и в работе Saussine A. и соавторов [Saussine A., 2012].

**Клинико-диагностическая значимость определения субпопуляций лимфоцитов при саркоидозе.** Для определения информативности определения содержания субпопуляций лимфоцитов в периферической крови был проведен анализ кривых операционной характеристики (ROC-анализ), построены характеристические ROC-кривые и вычислены ППК. В таблице 1 представлены наиболее информативные параметры среди выявляемых субпопуляций Т- и В-лимфоцитов.

Таблица 1

Параметры информативности некоторых субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, выявленных на основе ROC-анализа у больных острым (n=22) и хроническим (n=101) саркоидозом

Показатель	Острый саркоидоз					Хронический саркоидоз				
	ППК	Ч	СП	КР	р	ППК	Ч	СП	КР	р
DP Th17, % CD45RA–	0,812	82%	81%	>29%	p<0,001	0,727	72%	63%	>27%	p<0,001
DP Th17, % CD45RA– EM	0,807	82%	71%	>27%	p<0,001	0,709	67%	56%	>25%	p<0,001
eVm5 клетки памяти (IgD–CD38+), кл/мкл	0,859	91%	65%	<24 кл/мкл	p<0,001	0,828	83%	61%	<25 кл/мкл	p<0,001
Vm5 клетки памяти (IgD–CD38–), кл/мкл	0,875	91%	70%	<14 кл/мкл	p<0,001	0,827	86%	63%	<16 кл/мкл	p<0,001
В-клетки памяти (IgD+CD27+), кл/мкл	0,900	91%	70%	<24 кл/мкл	p<0,001	0,819	77%	70%	<24 кл/мкл	p<0,001
В-клетки памяти (IgD–CD27+), кл/мкл	0,898	91%	84%	<23 кл/мкл	p<0,001	0,866	86%	72%	<32 кл/мкл	p<0,001

*Примечание: ППК – площадь под характеристической кривой, Ч – чувствительность, СП – специфичность, КР – оптимальный критерий разделения.*

**Особенности содержания субпопуляций лимфоцитов в зависимости от клинической картины саркоидоза.** Был проведен анализ содержания субпопуляций Т-лимфоцитов в образцах периферической крови больных саркоидозом в сравнении с лабораторным показателем активности заболевания – АПФ. Проведение корреляционного анализа выявило прямую зависимость между значениями активности АПФ и относительным содержанием DP Th17 среди всех CD45RA– клеток памяти, а также DP Th17 CM и EM клеток памяти:  $r=0,422$ ,  $p=0,001$ ;  $r=0,330$ ,  $p=0,012$  и  $r=0,410$ ,  $p=0,002$ . В образцах крови больных с хроническим дебютом саркоидоза также отмечались положительные корреляционные взаимосвязи между уровнями активности АПФ и относительным содержанием DP Th17 CD45RA-негативными, DP Th17 CM и DP Th17 EM клетками памяти:  $r=0,498$ ,  $p<0,001$ ;  $r=0,366$ ,  $p=0,012$  и  $r=0,512$ ,  $p<0,001$ .

Корреляционный анализ выявил зависимость между повышением уровня АПФ и относительным содержанием В-клеток в рамках общего пула циркулирующих лимфоцитов у больных саркоидозом ( $r=0,316$ ;  $p=0,044$ ). При повышенном уровне АПФ в периферической крови больных достоверно снижено относительное число наивных Vm1-клеток и клеток памяти Vm5 при  $r=-0,557$ ;  $p<0,001$  и  $r=-0,324$ ;  $p=0,039$ , соответственно. При этом получены прямые корреляционные взаимосвязи с абсолютным

числом «активированных наивных» В-лимфоцитов популяции Vm2 ( $r=0,337$ ;  $p=0,031$ ) и Vm2' субпопуляции ( $r=0,355$ ;  $p=0,023$ ).

Отмечалась достоверная положительная корреляция между активностью АПФ и относительным содержанием наивных IgD+CD27- В-клеток ( $r=0,532$ ;  $p<0,001$ ), и с их абсолютными значениями:  $r=0,375$ ;  $p=0,016$ . Между относительным числом В-лимфоцитов памяти (IgD+CD27+, IgD-CD27+) и показателями уровней активности АПФ была установлена обратная корреляционная зависимость:  $r=-0,565$ ;  $p<0,001$  и  $r=-0,357$ ;  $p=0,022$ , соответственно.

**Изменение состава цитокинов в периферической крови больных саркоидозом.** В образцах крови пациентов с хроническим саркоидозом относительно острого дебюта оказались достоверно повышены концентрации цитокинов IL-7 ( $p=0,009$ ), IL-15, ( $p=0,002$ ), IL-17A/CTLA8 ( $p=0,018$ ), IFN- $\gamma$  ( $p=0,027$ ). Уровни цитокинов IL-17A/CTLA8 и цитокина IL-12 (p70) были достоверно повышены в образцах крови при хроническом дебюте заболевания относительно группы условно здоровых лиц ( $p<0,001$ ,  $p=0,037$ , соответственно). Концентрация IL-10 достоверно повышена у пациентов с хроническим саркоидозом относительно острого и условно здоровых добровольцев, при  $p=0,017$  и  $p=0,007$ , соответственно. Произведено сравнение концентраций хемокинов в образцах плазмы крови больных острым (группа 1), хроническим (группа 2) дебютом саркоидоза и группой практически здоровых лиц (группа 3). Достоверно значимые результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Концентрации хемокинов в плазме крови (пг/мл) у больных с острым, хроническим дебютом саркоидоза и условно здоровых лиц

Хемокины	Группа 1 (n=19)	Группа 2 (n=33)	Группа 3 (n=22)	p
CCL17/TARC	58,5 (31,8-169)	60,0 (35,9-125)	26,2 (13,3-49,6)	$p_{1-2}=0,894$ $p_{1-3}=0,005$ $p_{2-3}=0,001$
CCL20/MIP-3 $\alpha$	7,2 (6,4-15,3)	7,2 (5,4-13,2)	5,6 (3,8-9,7)	$p_{1-2}=0,634$ $p_{1-3}=0,023$ $p_{2-3}=0,064$
CCL22/MDC	621 (349-841)	661 (438-1073)	405 (288-508)	$p_{1-2}=0,582$ $p_{1-3}=0,007$ $p_{2-3}<0,001$
CXCL9/MIG	4698 (2698-8816)	3582 (1581- 6964)	1142 (585-1616)	$p_{1-2}=0,334$ $p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}<0,001$
CXCL10/IP-10	667 (459-778)	530 (315-796)	197 (119-249)	$p_{1-2}=0,403$ $p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}<0,001$
CXCL11/I-TAC	209 (166-482)	252 (149-417)	121 (76,2-259)	$p_{1-2}=0,689$ $p_{1-3}=0,059$ $p_{2-3}=0,044$
CXCL13/BCA-1	48,9 (33,2-72,0)	57,8 (34,6-102)	31,9 (21,3-62,7)	$p_{1-2}=0,569$ $p_{1-3}=0,101$ $p_{2-3}=0,092$

**Изменения уровней цитокинов в зависимости от клинической картины саркоидоза.** В образцах крови больных с признаками фиброзных изменений легких по данным МСКТ относительно образцов крови больных без таких признаков достоверно



повышено содержание цитокинов IL-7 и IL-10 при  $p=0,003$  и  $p=0,011$ , соответственно. Была выявлена положительная корреляционная взаимосвязь между уровнем цитокина IFN- $\gamma$  (пг/мл) и уровнем активности АПФ:  $r=0,349$ ;  $p=0,032$ .

В общей группе всех обследованных больных саркоидозом ( $n=52$ ) выявлена положительная корреляционная взаимосвязь между уровнем хемокина CXCL9/MIG (пг/мл) и уровнем активности АПФ ( $r=0,345$ ;  $p=0,029$ ). В группе больных с хроническим дебютом саркоидоза выявлена положительная корреляция между концентрациями CXCL11/I-TAC и уровнем АПФ ( $r=0,374$ ;  $p=0,042$ ). У больных с острым дебютом саркоидозом выявлена прямая положительная связь между уровнем АПФ и концентрацией хемокина CXCL9/MIG ( $r=0,762$ ;  $p=0,037$ ).

Был выполнен анализ уровней хемокинов CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC в плазме крови больных с хроническим дебютом заболевания без признаков фиброзирования легочной ткани и с выявленными признаками пневмофиброза по данным МСКТ. Достоверность различий между группами пациентов была установлена только для CXCL9/MIG, при  $p=0,035$ .

Уровни хемокина CXCL9/MIG оказались достоверно выше у больных с экстрапульмональными проявлениями и составили против больных без признаков системности,  $p=0,018$ .

Установлена прямая положительная корреляционная взаимосвязь между уровнем АПФ и концентрацией хемокинов CCL17/TARC и CCL22/MDC. Для CCL17/TARC величина коэффициента корреляции Спирмена  $r=0,530$ ;  $p=0,003$ , для CCL22/MDC –  $r=0,446$ ;  $p=0,014$ .

**Особенности содержания цитокинов при ретроспективном анализе течения заболевания.** В результате проведенного ретроспективного анализа изменений у больных саркоидоза органов дыхания через один год у 12/38 (31,6%) пациентов с самопроизвольной регрессией клинко-рентгенологических изменений и нормальных функциональных показателей лечение не проводилось.

При выявлении прогрессирования заболевания 26/38 (68,4%) больным была назначена иммуносупрессивная терапия. У больных, которые нуждались в проведении лечения, на начальном этапе наблюдения отмечалось достоверно значимое повышенное содержание цитокина CCL17/TARC по сравнению с группой больных, которым впоследствии терапию не назначили,  $p=0,009$ . Результаты ROC-анализа для данного показателя: ППК=0,770, чувствительность 88%, специфичность 67%, критерий  $> 35,1$  пг/мл,  $p=0,009$ .

У больных с активным течением саркоидоза в сопоставлении с больными без признаков активности заболевания в течение года после постановки диагноза на начальном этапе обследования отмечалось достоверно повышенное содержание цитокинов: CCL17/TARC ( $p=0,005$ ), CCL22/MDC ( $p=0,023$ ). У больных с наличием системных проявлений достоверно повышены уровни цитокинов CCL17/TARC ( $p=0,037$ ), CXCL9/MIG ( $p=0,033$ ). У больных, имеющих признаки гепатомегалии, достоверно повышены концентрации цитокинов CCL17/TARC ( $p=0,023$ ), CCL22/MDC ( $p=0,007$ ), CXCL9/MIG ( $p=0,011$ ), при наличии признаков спленомегалии – CCL17/TARC ( $p=0,035$ ). При наличии признаков пневмофиброза у больных саркоидозом отмечается повышенное содержание цитокинов IL-7 ( $p=0,012$ ) и IL-10 ( $p=0,018$ ).

Для оценки клинко-лабораторной информативности представленных в таблице показателей был проведен ROC-анализ, построены характеристические ROC-кривые и определены ППК. Значения ППК были выше 0,700 и 0,800, показатели чувствительности составили 73-88%, специфичности – 61-83%, что свидетельствует о высокой значимости

представленных в диагностической модели иммунологических параметров для оценки и прогнозирования особенностей клинического течения саркоидоза (таблица 3).

Таблица 3

Параметры диагностической информативности определения цитокинов, выявленные в результате ROC-анализа у больных саркоидозом (n=38) в зависимости от особенностей клинического течения заболевания

Цитокины	ППК	Чувствительность	Специфичность	Критерий (пг/мл)	p
Активное течение заболевания					
CCL17/TARC	0,875	88%	77%	>68,4	p=0,005
CCL22/MDC	0,808	88%	70%	>653	p=0,021
Системные (экстрапульмональные) проявления					
CCL17/TARC	0,737	73%	72%	>77,3	p=0,035
CXCL9/MIG	0,742	73%	61%	>3700	p=0,031
Признаки гепатомегалии					
CCL17/TARC	0,823	80%	77%	>97,6	p=0,024
CCL22/MDC	0,892	80%	81%	>886	p=0,006
CXCL9/MIG	0,869	80%	81%	>6018	p=0,009
Признаки спленомегалии					
CCL17/TARC	0,748	78%	68%	>78,2	p=0,033
Признаки фиброзирования легочной ткани по данным МСКТ					
IL-7	0,844	75%	83%	>4,5	p=0,011
IL-10	0,813	75%	79%	>1,4	p=0,017

*Примечание: ППК – площадь под характеристической ROC кривой; МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография.*

Кроме выявленной ранее корреляции между уровнями цитокинов и особенностями течения впервые выявленного саркоидоза, оценка состояния больных через год показала значимость определения уровней цитокинов для оценки течения и прогноза заболевания.

На основании анализа полученных в работе результатов была сформирована и предложена схема, отображающая вклад изученных лабораторных параметров в иммунопатогенез саркоидоза (рисунок 1). В схеме отражены особенности возможного участия субпопуляций лимфоцитов и цитокинов в иммунопатогенезе острого и хронического саркоидоза.

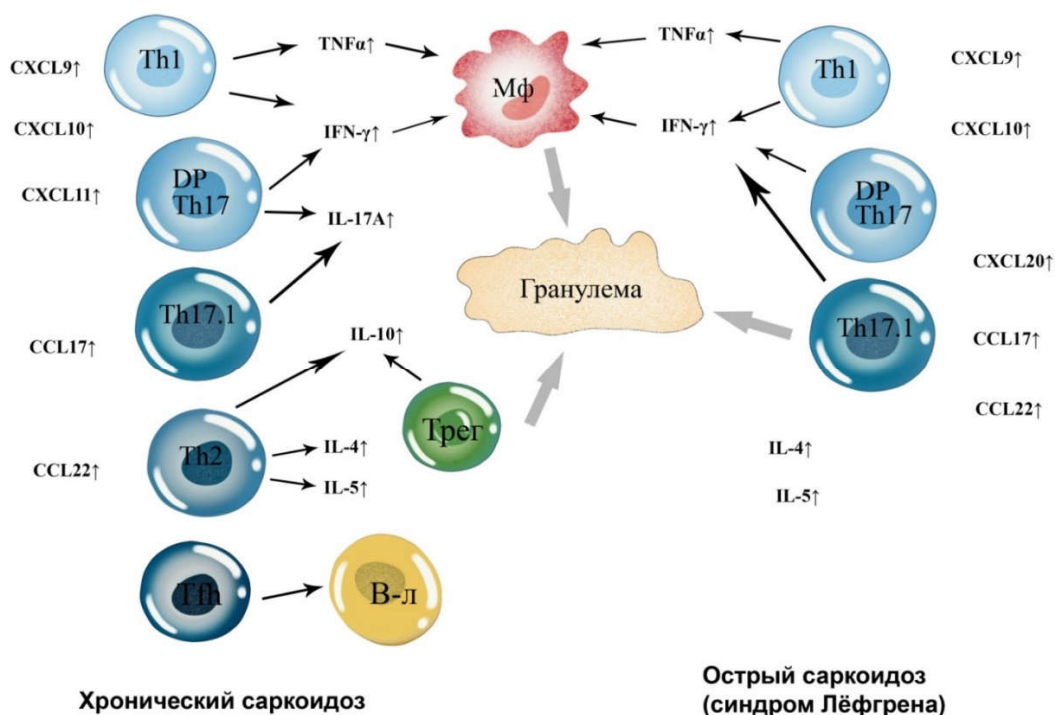


Рисунок 1. Возможное участие субпопуляций лимфоцитов и цитокинов в иммунопатогенезе саркоидоза органов дыхания.

Примечание:

*Th1* – T-хелперы 1 типа;

*Th2* – T-хелперы 2 типа;

*DP Th17* – «дважды-позитивные» T-хелперы 17 типа (фенотип  $CCR6+CCR4+CXCR3+$ );

*Th17.1* – «не классические» T-хелперы 17 типа (фенотип  $CCR6+CCR4-CXCR3+$ );

*Tfh* – фолликулярные T-хелперы;

*Treg* – регуляторные T-лимфоциты;

*B-л* – B-лимфоциты;

*Мф* – макрофаги.

Полученные результаты мониторинга состояния больных и уровней цитокинов проведено впервые. Ввиду своей диагностической и прогностической значимости они должны быть включены в лабораторное обследование пациентов в специализированных отделениях и клиниках по лечению саркоидоза. В результате проведенного исследования разработан клиничко-лабораторный алгоритм, позволяющий использовать исследованные в работе показатели в качестве дополнительных биомаркеров саркоидоза органов дыхания (рисунок 2). В нем отражена последовательность выявления цитокинов по определенным пороговым значениям (критериям) в оценке течения и прогноза заболевания, наличия или отсутствия системных внелегочных проявлений и признаков фиброзирование легочной ткани.

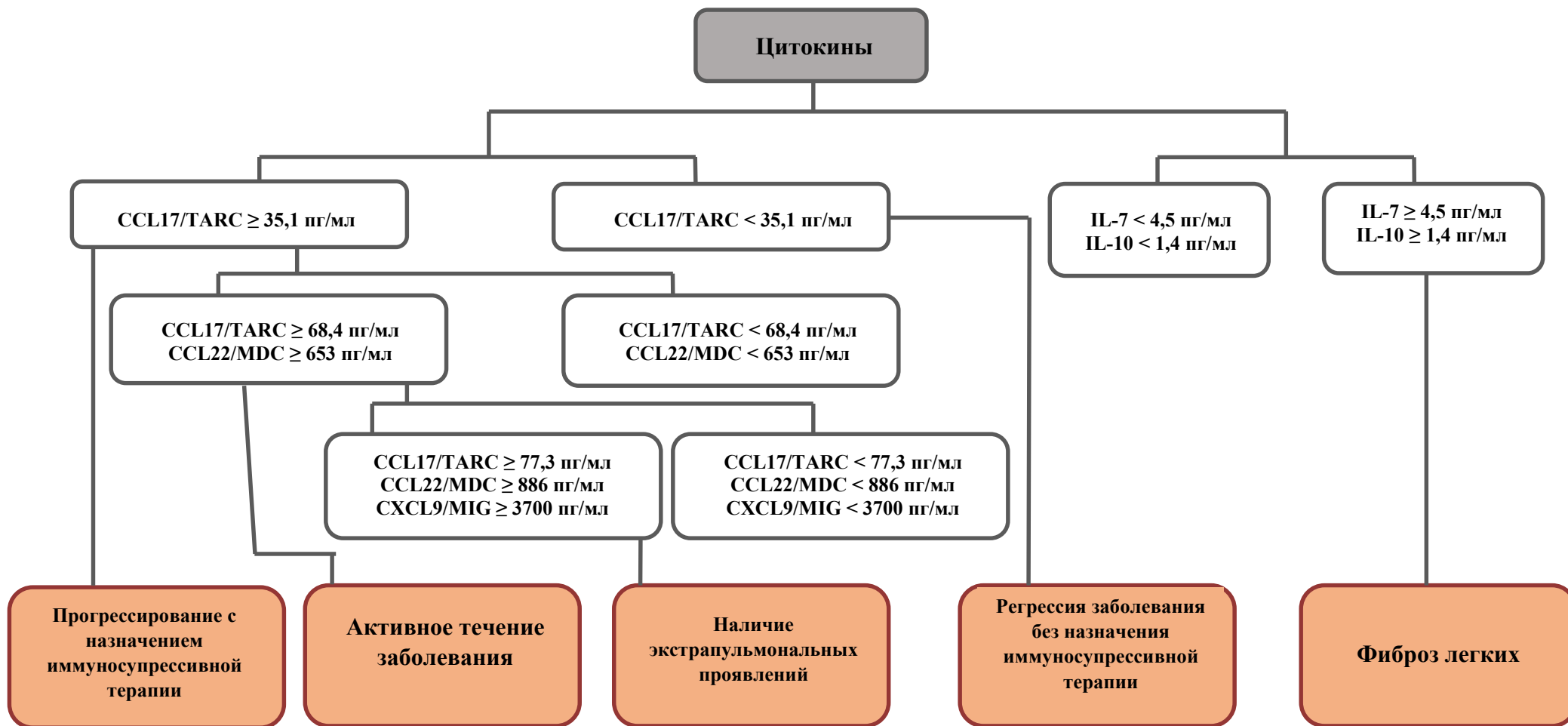


Рисунок 2. Диагностический алгоритм определения лабораторных иммунологических параметров (цитокинов) при саркоидозе органов дыхания.

## **ВЫВОДЫ**

1. При саркоидозе органов дыхания отмечаются изменения субпопуляционного состава Th17 типа (повышенное содержание DP Th17, сниженное число Th17.1 типа), а также установлена прямая корреляционная зависимость между содержанием DP Th17 и лабораторным критерием активности саркоидоза – уровнем ангиотензин-превращающего фермента, что указывает на их существенную роль в иммунопатогенезе заболевания.

2. Субпопуляционный состав В-лимфоцитов с учетом экспрессии IgD/CD27 и IgD/CD38 при саркоидозе органов дыхания, характеризуется повышением числа «активированных наивных» В-лимфоцитов и снижением субпопуляций В-клеток памяти; отмечается корреляция с активностью заболевания, определяемая с помощью уровня активности ангиотензин-превращающего фермента: установлена прямая корреляционная связь между содержанием наивных В-лимфоцитов, обратная корреляционная зависимость между содержанием В-лимфоцитов памяти и уровнем ангиотензин-превращающего фермента.

3. Хроническое течение саркоидоза органов дыхания характеризуется существенным снижением числа «наивных» регуляторных Т-лимфоцитов с фенотипом CD45RO–CD62L+ и высокоактивных CD3+CD4+CD25brightCD73+ клеток центральной и эффекторной памяти в периферической крови.

4. Концентрация провоспалительного цитокина IFN- $\gamma$ , наряду с уровнем ангиотензин-превращающего фермента в крови больных отражают активность заболевания; повышенное содержание цитокинов IL-7, IL-10 индуцирует формирование фиброзных изменений в легочной ткани у больных саркоидозом органов дыхания.

5. Повышение концентраций хемокинов CCL17/TARC, CCL22/MDC в крови больных саркоидозом органов дыхания отражают активность заболевания; повышение уровней CCL17/TARC, CCL22/MDC, CXCL9/MIG характерно при наличии экстрапульмональных проявлений заболевания в динамике.

6. Определены наиболее информативные лабораторные параметры, определяемые в периферической крови больных саркоидозом органов дыхания, на основании проведенного ROC-анализа: число DP Th17 типа, содержание В-лимфоцитов памяти с учетом экспрессии IgD/CD38 и IgD/CD27, уровни цитокинов IL-7, IL-10, CCL17/TARC, CCL22/MDC, CXCL9/MIG.

7. Создан лабораторный диагностический алгоритм последовательности определения лабораторных показателей (цитокинов) для их использования в качестве дополнительных биомаркеров течения и прогноза саркоидоза органов дыхания.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

По результатам проведенного исследования сформулированы практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики и врачей, занимающихся проблемами саркоидоза. Полученные достоверные результаты изменений лабораторных параметров при разных типах клинического течения заболевания позволяют в будущем продолжить исследования для внедрения в практическую деятельность специализированных иммунологических лабораторий.

1. Для определения активного течения саркоидоза наряду с уровнем ангиотензин-превращающего фермента, рекомендуется выявлять повышенное число «дважды-позитивных» DP Th17 (CCR6+CCR4+CXCR3+) лимфоцитов и/или сниженное содержание В-лимфоцитов памяти.

2. Для оценки активности заболевания в качестве дополнительных биомаркеров следует оценивать повышенные уровни цитокинов CCL17/TARC ( $\geq 68,4$  пг/мл), CCL22/MDC ( $\geq 653$  пг/мл) в плазме крови больных саркоидозом органов дыхания.

3. Для своевременного выявления системных (экстрапульмональных) проявлений саркоидоза органов дыхания в качестве дополнительных биомаркеров рекомендуется определять повышенное содержание хемокинов CCL17/TARC ( $\geq 77,3$  пг/мл), CCL22/MDC ( $\geq 886$  пг/мл), CXCL9/MIG ( $\geq 3700$  пг/мл) в плазме крови больных.

4. В качестве дополнительных биомаркеров, свидетельствующих о пневмофиброзе, следует определять повышенное содержание цитокинов IL-7 ( $\geq 4,5$  пг/мл), IL-10 ( $\geq 1,4$  пг/мл) в плазме крови больных саркоидозом органов дыхания.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Полученные в результате работы результаты являются важными в понимании особенностей вовлечения клеточного и гуморального звена иммунитета в иммунопатогенез саркоидоза органов дыхания. Важным является дальнейшее внедрение определения изученных параметров, показавших наиболее высокие параметры клинико-лабораторной информативности, в практику специализированных иммунологических лабораторий.

В дальнейшем важным направлением исследований могут служить показатели содержания субпопуляций лимфоцитов и цитокинов не только при саркоидозе, но и у пациентов с другими гранулематозными заболеваниями.

Наиболее интересным направлением дальнейших исследований будет сопоставление состава субпопуляций лимфоцитов в периферической крови и в пораженных тканях, выполненное с помощью иммуноцитохимических и иммуногистохимических методов исследования биопсийных образцов.

Определение рекомендованных в диссертационной работе биомаркеров, представленных в разработанном алгоритме, наряду с другими параметрами клинической лабораторной диагностики, является важным при саркоидозе для дальнейшей объективизации оценки клинического течения заболевания, эффективности проводимой терапии и своевременной коррекции лечебной тактики, в том числе, объективности назначения иммуносупрессивной и таргетной терапии.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки РФ для опубликования основных научных результатов диссертации по специальностям 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика, 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология:**

1. Лазарева, Н.М. Субпопуляционный состав цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови при саркоидозе / Лазарева Н.М., Кудрявцев И.В., Баранова О.П., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т. 12 (21). – №3. – С. 348-353. – doi: 10.31857/S102872210002408-3.

2. Кудрявцев, И.В. Особенности экспрессии CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами при саркоидозе / Кудрявцев И.В., Лазарева Н.М., Баранова О.П., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. // Российский

иммунологический журнал. – 2018. – Т. 12(21). №3. – С. 329-334. – doi: 10.31857/S102872210002405-0.

3. Баранова, О.П. Цитотоксические Т-лимфоциты при хроническом течении саркоидоза / Баранова О.П., Кудрявцев И.В., Лазарева Н.М., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т. 12 (21). – №4. – С. 605-608. – doi: 10.31857/S102872210002610-6.

#### **Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень SCOPUS:**

4. Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Baranova O.P., Golovkin A.S., Isakov D.V., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A. // Medical Immunology (Russia) = Meditsinskaya Immunologiya. – 2019. – Vol. 21. – no. 3. – P. 467-478. – doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-467-478.

5. Лазарева, Н.М. Анализ субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови больных саркоидозом при разной степени активности заболевания / Лазарева Н.М., Кудрявцев И.В., Баранова О.П., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 21. – № 6. – С. 1081-1098. – doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1081-1098.

6. Лазарева, Н.М. Особенности цитокинового профиля при саркоидозе / Лазарева Н.М., Баранова О.П., Кудрявцев И.В., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22. – № 5. – С. 993-1002. – doi: 10.15789/1563-0625-FOC-2064.

7. Лазарева, Н.М. Лиганды хемокинового рецептора CXCR3 при саркоидозе / Лазарева Н.М., Баранова О.П., Кудрявцев И.В., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. // Медицинская иммунология. – 2021. – Т. 23. – № 1. – С. 73-86. – doi: 10.15789/1563-0625-CCR-2181.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АПФ – ангиотензин-конвертирующий (ангиотензин-превращающий) фермент

ППК – площадь под характеристической кривой

СОД – саркоидоз органов дыхания

Трег – регуляторные Т-лимфоциты

CCR – CC chemokine receptors (рецептор CC-хемокинов)

CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

CD39 – E-NTPDase1 - ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (эктонуклеозид трифосфат дифосфогидролаза 1)

CD73 – Ecto5'NTase - ecto-5'-nucleotidase (экто-5'-нуклеотидаза)

СМ Th – Т-хелперы центральной памяти

CXCR – CXC chemokine receptor (рецептор СХС-хемокинов)

ЕМ Th – Т-хелперы эффекторной памяти

IFN – interferon (интерферон)

IL – interleukin (интерлейкин)

TEMRA – Терминально-дифференцированные эффекторные Т-хелперы

Th – Т helper (Т-хелпер)

Tfh – Т follicular helper (фолликулярный Т-хелпер)

TNF $\alpha$  – tumor necrosis factor  $\alpha$  (фактор некроза опухоли  $\alpha$ )

xMap – мультиплексный анализ