

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Челябинский государственный университет»

**Актуальные вопросы  
иммунологии:  
система цитокинов, биологическое  
значение, генетический  
полиморфизм, методы определения**

*Учебное пособие*

Челябинск  
Цицера  
2016

УДК 616-097(082)  
ББК Р252.325 + Е744.725 + Р265.6  
С78

С78 **Сташкевич, Д. С.**  
Актуальные вопросы иммунологии: система цитокинов, биологическое значение, генетический полиморфизм, методы определения : учеб. пособие [Текст] / Д. С. Сташкевич, Ю. Ю. Филиппова, А. Л. Бурмистрова. — Челябинск : Цицеро. — 82 с.

ISBN 978-5-91283-000-0

Учебное пособие представляет собой материал лекций, предназначено для углубления и систематизации знаний по отдельным разделам иммунологической науки при изучении курсов «Иммунология», «Иммунология патологических состояний», «Иммунный гомеостаз в норме и патологии», «Актуальные вопросы иммунологии», «Клиническая иммунология, аллергология».

Учебное пособие предназначено для студентов бакалавриата направления 06.03.01 Биология, для студентов-магистрантов направления 06.04.01 Биология (направленности «Микробиология и вирусология», «Медико-биологические науки», «Лабораторная диагностика в клинической практике для биологов»), аспирантов направления 30.06.01 «Фундаментальная медицина» (направленность «Клиническая иммунология, аллергология»).

УДК 616-097(082)  
ББК Р252.325 + Е744.725 + Р265.6

**Рецензенты:**

**О. А. Гизингер**, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России;

**Н. Э. Хайдаршина**, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет».

© Сташкевич Д. С., Филиппова Ю. Ю., Бурмистрова А. Л., 2016

ISBN 978-5-91283-000-0

## Содержание

|  |    |
|--|----|
| <b>Глава 1. Общая характеристика и классификация цитокинов, история открытия, биологическое значение</b> ..... | 5  |
| Общие принципы влияния цитокинов на клеточном и организменном уровнях.....                                     | 8  |
| Биологическое действие цитокинов.....  | 12 |
| Регуляция эмбриогенеза, закладки и развития органов иммунной системы.....                                      | 12 |
| Контроль нормальных физиологических функций.....   | 12 |
| Регуляция защитных реакций организма на местном и системном уровнях .....                                      | 13 |
| Классификации цитокинов, основные представители .....  | 15 |
| <i>Вопросы к 1-й главе</i> .....   | 25 |
| <b>Глава 2. Рецепторы к цитокинам</b> .....  | 27 |
| Строение генов рецепторов цитокинов .....  | 31 |
| Общий план строения белковой молекулы рецепторов цитокинов .....   | 33 |
| Передача сигнала через цитокиновые рецепторы.....  | 42 |
| <i>Вопросы ко 2-й главе</i> .....  | 44 |
| <b>Глава 3. Полиморфизм цитокиновых генов. Методы исследования системы цитокинов</b> .....                     | 45 |
| Понятие полиморфизма, виды .....   | 45 |
| Виды полиморфизма.....   | 46 |

|  |    |
|--|----|
| Примеры наиболее изученных полиморфных сайтов генов цитокинов.....               | 47 |
| Популяционные особенности распределения полиморфных сайтов генов цитокинов ..... | 52 |
| Ассоциация полиморфизма генов цитокинов с мультифакторными заболеваниями.....    | 56 |
| Методы оценки системы цитокинов.....   | 62 |
| Молекулярно-биологические методы определения системы цитокинов .....             | 63 |
| <i>Вопросы к 3-й главе</i> .....   | 70 |
| <b>Заключение. Перспективы изучения системы цитокинов</b> .....                  | 72 |
| <b>Список сокращений</b> .....   | 76 |
| <b>Список литературы</b> .....   | 77 |

## **Глава 1. Общая характеристика и классификация цитокинов, история открытия, биологическое значение**

*Основные вопросы:*

1. История открытия цитокинов.
2. Общие принципы влияния цитокинов на клеточном и организменном уровнях.
3. Биологическое действие цитокинов
4. Классификации цитокинов, основные представители

Цитокины — новый класс эндогенных полипептидных медиаторов межклеточного взаимодействия, регулирующих развитие, ряд физиологических функций и поддержание нарушенного гомеостаза.

Цитокины — малые растворимые белковые молекулы, секретируемые в экстрацеллюлярное пространство, осуществляющие межклеточные взаимодействия, деление, дифференцировку, привлечение клеток, вовлеченных в иммунный ответ.

Цитокины имеют ряд общих биохимических и функциональных характеристик, отличающих их от других классов регуляторных молекул.

Сейчас известно более 200 индивидуальных веществ, относящихся к семейству цитокинов [8; 10; 17; 26].

**История открытия.** Развитие знаний о цитокинах довольно чётко делится на этапы во времени и берет начало в конце 20-х — начале 30-х годов XX в.: до 1960-х годов находки были, но этот этап называют «преисторическим» [26]. Для иллюстрации приведем несколько примеров: В 1926 г. была опубликована работа Х. Цинссера и Т. Тамия. Авторы экспериментально показали в опытах по бактериальной аллергии, что некие продукты жизнедеятельности активированных лейкоцитов заметно воздействуют на клетки стенки кровеносных

сосудов (активируют эндотелий). В 1932 г. А. Рич и М. Льюис наблюдали в культуре ткани, сенсibilизированной к туберкулёзной бактерии, что в присутствии антигена (Аг) значительно замедлена миграция фагоцитов и макрофаги быстро погибают. В 1958 г. Б. Ваксман и М. Матолтси подтвердили, что туберкулин стимулирует препараты макрофагов. В 1962 г. М. Георг и Дж. Вогэм предложили удобный метод для анализа миграции макрофагов — из капиллярной трубки. В 1966 г. Дж. Дэвид, а также Б. Блум и Б. Беннет опубликовали работы, в которых показали, что сенсibilизированные к туберкулёзной бактерии лимфоциты в присутствии антигена (Аг) вырабатывают гуморальный фактор, ингибирующий миграцию макрофагов из капилляра (**MIF**). MIF, по-видимому, первый идентифицированный гуморальный медиатор близкоклеточных взаимодействий — цитокин. При этом почему-то он до сегодняшнего дня остаётся наименее охарактеризованным. Указанные работы были выполнены в культурах клеток *in vitro*.

Однако были наблюдения в клинике и на моделях *in vivo*, которые, в современном понимании, относятся именно к цитокинам. Около 1940-х годов впервые описаны первые эффекты **кахектина** — фактора, присутствовавшего в сыворотке крови и способного вызывать кахексию, или снижение массы тела. Позднее удалось установить, что этот медиатор это ничто иное как фактор некроза опухолей [17].

1960-е — начало 1980-х годов — этап выделения всевозможных факторов из супернатантов клеточных культур, гуморальных медиаторов иммунного ответа, которые (и не все) с большим трудом удавалось выделить в чистом виде и часто при этом биологическая активность падала вплоть до исчезновения [26].

В 1955 г. Е. Аткинс и В. Вуд обнаружили в крови кроликов с лихорадкой циркулирующий пирогенный фактор, который они назвали эндогенным пирогеном. Эти же авторы известны тем, что они открыли противовоспалительное действие глюкокортикоидных гормонов (кортизона) на модели пирогениндуцированной лихорадки. В 1961 г. Дж. Фесслер показал, что в культуре *in vitro* эндогенный пироген продуцируют *моноклеточные клетки* человека, мыши и кролика. В 1977 г. Динарелло с соавторами очистили эндогенный пироген до состояния гомогенности. Была показана его идентичность с продуктом макрофагов, описанным как эндогенный медиатор лейкоцитов, индуцирующий воспалительные реакции острой фазы (индукцию биосинтеза в печени фибриногена, гипоферремию, гипоцинкемию). В настоящее время известно, что этот фактор — ИЛ-1b [8; 17].

Из вирусологии пришло открытие таких значимых для здоровья и болезней цитокинов как *интерфероны* (ИФН). В 1957 г. А. Айзекс и Дж. Линденманн описали факторы в супернатанте вирусинфицированных клеток в культуре *in vitro*, которые при добавлении в культуру неинфицированных клеток защищали последние от инфицирования вирусами (мешали инфицированию — *interfere with*, отсюда название «*interferons*»).

В 1965 г. Д. Плужник и Л. Сакс и в 1966 г. Т. Брэдли и Д. Меткалф описали факторы роста колоний гранулоцитарных и макрофагальных клеток в культурах на полужидком агаре — колониестимулирующие факторы (КСФ). Их также до настоящего времени относят к цитокинам, а именно к группе гематопоэтических факторов роста. Отсутствие рациональной классификации цитокинов проявляется в «спутанности» терминологии. Например, гемопоэтический мульти-CSF не имеет в своём названии «CSF». Обнаружившие его авторы обозначили этот фактор роста интерлейкином-3 (ИЛ-3) [26].

В 1976 г. Морган и соавт. обнаружили, что супернатант со смешанной культуры лейкоцитов оказывает бластогенное действие на лимфоциты. Так был открыт фактор роста Т-клеток, который затем получил название интерлейкина-2 (ИЛ-2) [8].

В 70-е годы XX в. использовали термины «лимфокины» и «монокины» применительно к гуморальным факторам в зависимости от того, что было известно о клетках-продуцентах (соответственно лимфоциты или моноциты). В 1974 г. в лаборатории Стенли Коена в супернатанте культивируемых клеток почки зеленой обезьяны, инфицированных вирусом SV40, обнаружили фактор, идентичный лимфоцитарному MIF.

В 1974 году С. Коен предположил, что гуморальные факторы, секретируемые из клетки, не являются исключительной особенностью лимфоцитов и моноцитов, и предложил более универсальный термин «*цитокины*», который является самым точным по смыслу и на сегодняшний день.

В 1978 г. на II Международном рабочем совещании, посвященном лимфокинам, был введён термин «*интерлейкины*». Больше 20 цитокинов получили именно это название с тем или иным номером (ИЛ-1, ИЛ-2 и т. д.). Но в целом номенклатуру цитокинов и до настоящего времени не «привели» к рациональному варианту, она представляет смесь первоначальный по тест-системе, в которой открыли тот или иной цитокин, и «интерлейкинов», но без чётких правил отнесения к этой рубрике [8; 17].

С середины 1980-х годов и по настоящее время в иммунологию вошли методы молекулярного клонирования, как пример можно привести использование трансгенных мышей и мышей

с удалением заданных генов (англ. knockout — нокаутирование). Например, использование трансгенных мышей TNF<sup>Δ</sup>Кат для изучения экспрессии гена фактора некроза опухолей [15]. Такие исследования постепенно, с одной стороны, вносят все больше понимания о соотношении структуры и функций цитокинов, с другой — резко увеличивают объём информации до такой степени, что её целостное осознание становится все труднее [26].

Уже в 1990-х годах было открыто субъединичное строение рецепторов цитокинов и сформировано понятие «Цитокиновая сеть».

С 1990-х годов стало развиваться и другое направление изучения цитокинов: анализ полиморфизма генов, уровни экспрессии м-РНК и генетический контроль транскрипции и экспрессии цитокинов и их рецепторов. За последние десятилетия (2—3) клонированы гены большинства цитокинов и получены рекомбинантные их аналоги. В начале XXI благодаря генетическому анализу стали известны новые цитокины [17], а также концепция «генных сетей» стала использоваться для анализа работы цитокиновых взаимодействий.

### Общие принципы влияния цитокинов на клеточном и организменном уровнях

Вся система цитокинов обладает общими закономерностями функционирования [8; 17; 19; 24—26]:

1. Цитокины являются полипептидами или белками, часто гликозилированными, с молекулярной массой (ММ) от 5 до 50 кДа. Для сравнения: ММ IgG составляет 160 кДа.

2. Цитокины не имеют антигенной специфичности биологического действия. Они влияют на функциональную активность клеток, принимающих участие в реакциях врожденного и приобретенного иммунитета. Тем не менее, воздействуя на Т- и В-лимфоциты, цитокины способны стимулировать антигензависимые процессы в иммунной системе.

3. Синтез цитокинов является индуцибельным процессом. Большинство цитокинов не синтезируется клетками вне воспалительной реакции и иммунного ответа. Экспрессия генов цитокинов начинается в ответ на проникновение в организм патогенов, антигенное раздражение или повреждение тканей. Одними из наиболее сильных индукторов синтеза цитокинов служат компоненты клеточных стенок бактерий: липополисахариды, пептидогликаны и мурамилдипептиды.

4. Цитокины синтезируются в ответ на стимуляцию через короткий промежуток времени. Синтез прекращается за счет раз-

нообразных механизмов ауторегуляции, включая повышенную нестабильность РНК, и существования отрицательных обратных связей, опосредуемых простагландинами, кортикостероидными гормонами и другими факторами.

5. Один и тот же цитокин может продуцироваться различными по гистогенетическому происхождению типами клеток организма в разных органах.

6. Избыточность действия цитокинов. Данное свойство проявляется в способности разных членов одного семейства молекул проявлять сходные влияния на функции одних и тех же клеток. Например, способностью стимулировать пролиферацию иммунокомпетентных клеток обладают ИЛ-2, 4, 10, 15 [24], при этом действие первых трех интерлейкинов может быть направлено на деление В-лимфоцитов.

7. Цитокины обладают плеiotропностью биологического действия. Один и тот же цитокин может действовать на многие типы клеток, вызывая различные эффекты в зависимости от вида клеток-мишеней. Так ИЛ-2 стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и натуральных киллеров. Пример плеiotропного действия ИЛ-1 представлен на рис. 1.

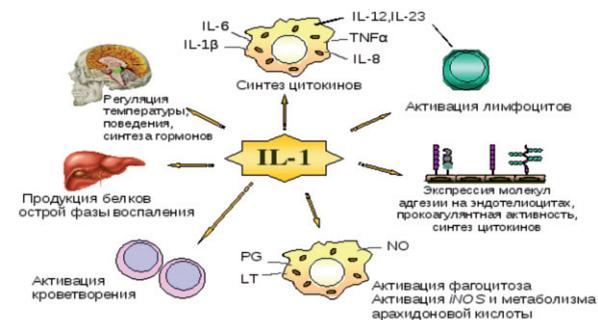


Рис. 1. Плеiotропное действие ИЛ-1

8. Многие цитокины проявляют синергичные (взаимоусиливающие) эффекты. В частности, ИЛ-3, 5, ГМ-КСФ совместно ускоряют созревание эозинофилов, а ФНО-α, ИЛ-1, 6 усиливают влияние друг друга на синтез белков острой фазы печеночными клетками. ИЛ-2 усиливает действие ИЛ-15 на терминальных стадиях дифференцировки натуральных киллеров, а ИЛ-10 и ТФР-β вместе участвуют в формировании толерантности.

9. Антагонизм действия цитокинов проявляется в том, что ряд цитокинов обладает противоположными биологическими

эффектами. Например, ИЛ-4 запускает, а ИФН- $\gamma$  угнетает синтез иммуноглобулина Е. ИЛ-1 активирует воспалительный процесс и резорбцию хрящевой ткани, а его рецепторный антагонист (ИЛ-1РА) подавляет развитие воспалительной реакции и деградацию хряща.

10. Биологические эффекты цитокинов опосредуются через специфические клеточные рецепторные комплексы, связывающие цитокины с очень высокой аффинностью, причем отдельные цитокины могут использовать общие субъединицы рецепторов. Каждый цитокин связывается со своим специфическим рецепторным комплексом, однако, все рецепторы цитокинов, представляющие собой трансмембранные белки, могут быть разделены на 5 основных типов. Наиболее распространен так называемый первый тип рецепторов, имеющих два экстраклеточных домена, один из которых содержит общую последовательность аминокислотных остатков WSXWS. Второй тип рецепторов также имеет два внеклеточных домена с большим количеством консервативных цистеинов. Третий тип представлен рецепторами цитокинов, относящихся к группе фактора некроза опухолей. Четвертый тип рецепторов цитокинов принадлежит к суперсемейству иммуноглобулиновых рецепторов, имеющих внеклеточные домены, напоминающие строение доменов молекул иммуноглобулинов. Наконец, пятый тип рецепторов, связывающих молекулы семейства хемокинов, представлен трансмембранными белками, пересекающими клеточную мембрану в 7 местах. Рецепторы цитокинов могут существовать в растворимой форме, сохраняя способность связывать лиганды.

11. Цитокины индуцируют либо подавляют синтез самих себя, других цитокинов и их рецепторов, участвуя в формировании цитокиновой сети.

12. Цитокины могут быть ассоциированными с мембранами синтезирующих их клеток, обладая в виде мембранной формы полным спектром биологической активности.

13. Цитокины могут влиять на пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность клеток-мишеней. Существует несколько вариантов проявления биологической активности в зависимости от участия различных внутриклеточных систем в передаче сигнала от рецептора, что связано с особенностями конкретных клеток-мишеней. Цитокины могут оказывать антиапоптотическое действие посредством проведения сигнала с участием bcl2 и связанных с ним белков. Митогенное действие с активацией синтеза ДНК осуществляется с участием с-Мус, mTOR, CdK. Оба описанных сигнала приводят к поддержанию жизнеспособности и длительному росту клеток. Напротив, сигнал к апоптозу проводится с участием специфического участка рецепторов группы ФНО, так называемого домена «смерти».

Дифференцировочный сигнал, приводящий к выбору пути развития либо терминальной дифференцировки клеток, осуществляется с участием внутриклеточных белков STAT (сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции). G-белки участвуют в передаче сигнала от хемокинов, что приводит к усилению миграции и адгезии клеток.

14. Цитокины действуют на клетки различными путями: аутокринно — на клетку, синтезирующую и секретирующую данный цитокин; паракринно — на клетки, расположенные вблизи клетки-продуцента, например, в очаге воспаления или в лимфоидном органе; эндокринно — дистантно на клетки любых органов и тканей после попадания цитокина в циркуляцию. В последнем случае действие цитокинов напоминает действие гормонов.

Таким образом, цитокиновая регуляция имеет огромное значение и в норме и при патологии. Все многообразие свойств цитокиновых медиаторов служит основным функциям — защите от инфекционных агентов и восстановлению тканей. В первую очередь цитокины регулируют развитие местных защитных реакций, происходит формирование воспалительной реакции. В случае несостоятельности местных реакций, воспаление развивается, продукция цитокинов продолжает возрастать, и они попадают в кровоток, следствием чего является действие уже на системном уровне.

Примеры системного действия цитокинов представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Системная воспалительная реакция (острофазовый ответ)**

| Органы и системы                  | Эффекты действия цитокинов   | Цитокины                 |
|-----------------------------------|--|--------------------------|
| Центральная нервная система       | Изменения поведения, индукция медленноволнового сна, снижение аппетита                       | ИЛ-1, -6, -8, ФНО-а      |
| Гипоталамус — гипофиз             | Лихорадочная реакция, изменение синтеза гормонов и рилизинг-факторов                         | ИЛ-1, -6, -8, ФНО-а, ИФН |
| Периферические эндокринные железы | Изменение уровней стероидных и других гормонов   | ИЛ-1, ФНО-а              |
| Печень                            | Увеличение синтеза острофазовых белков и компонентов комплемента, снижение синтеза альбумина | ИЛ-6, 1, ФНО-а           |

Окончание табл. 1

| Органы и системы | Эффекты действия цитокинов                               | Цитокины             |
|------------------|--|----------------------|
| Костный мозг     | Усиление гемопоэза, в основном гранулопоэза              | ИЛ-1, -6, -3, -7 КСФ |
| Плазма крови     | Усиление свертываемости, изменение ионного состава крови | ИЛ-1, ФНО-а          |

### Биологическое действие цитокинов

Согласно данным российских исследователей, в физиологической роли цитокинов в регуляции функций организма выделяются четыре основных составляющие:

- 1) регуляция эмбриогенеза, закладки и развития органов иммунной системы;
- 2) контроль отдельных нормальных физиологических функций;
- 3) регуляция защитных реакций организма на местном и системном уровнях;
- 4) регуляция процессов регенерации поврежденных тканей [17].

### Регуляция эмбриогенеза, закладки и развития органов иммунной системы

Экспрессия генов некоторых цитокинов происходит в период эмбрионального развития, прежде всего это касается ростовых факторов (фактор роста стволовых клеток, трансформирующие ростовые факторы), цитокинов группы ФНО и некоторых хемокинов, регулирующих миграцию лимфоидных предшественников и закладку органов иммунной системы.

Доказательством роли этих цитокинов служат опыты на knockout мышах, в которых показано, что избирательное выключение генов цитокинов семейства ФНО или их рецепторов или некоторых хемокинов приводит к тяжелейшим нарушениям нормального развития лимфоузлов, пейеровых бляшек центров размножения лимфоцитов в селезенке.

### Контроль нормальных физиологических функций

Исторически сложилось, что о цитокинах и их роли упоминают преимущественно во взаимосвязи с регуляцией иммунного ответа, однако действие цитокинов распространяется и на другие клетки и органы и выражается в регуляции функций всего организма. Для таких цитокинов характерны постоянно высокие уровни в циркуляции, а функция заключается в регуляции

пролиферации и дифференцировки отдельных типов клеток в течение всей жизни. Примерами цитокинов такого типа физиологической регуляции являются: фактор роста стволовых клеток (ФРСК), колониестимулирующий фактор для моноцитов/макрофагов (М-КСФ), который необходим для обеспечения постоянного обновления тканевых макрофагов, эритропоэтин (ЭПО), продуцируемый почками и регулирующий эритроидный росток кроветворения, его экспрессия зависит от парциального давления кислорода в ткани почки, тромбopoэтин (ТПО), синтезируемый в печени и регулирующий тромбопоэз.

### Регуляция защитных реакций организма на местном и системном уровнях

Цитокины принимают участие в регуляции развития воспаления и иммунного ответа. Выделяют два основных направления биологического действия цитокинов: защита от инфекционных агентов и восстановление поврежденных тканей.

В костном мозге, в тимусе и лимфоидных органах постоянно происходит спонтанный синтез цитокинов, выполняющих функции ростовых факторов, которые связываются с рецепторами на клетках-предшественниках, стимулируя процессы их пролиферации и дифференцировки. В очаге инфекции бактериальные компоненты и продукты (например, липополисахарид грамотрицательных бактерий, пептидогликаны грамположительных микроорганизмов или ДНК, богатая SpolyG последовательностями), взаимодействуя с паттернраспознающими рецепторами (Toll-рецепторами), индуцируют синтез макрофагами так называемых провоспалительных цитокинов (интерлейкины-1, -6, -8, -18, ФНО, хемокины, интерлейкин-12, стимулирующий дифференцировку Т-хелперов I типа), которые связываются с рецепторами на других макрофагах, лимфоцитах и эндотелиальных клетках. Их основные функции: активировать эндотелий, что приводит к увеличению проницаемости, повышению экспрессии адгезивных молекул и усилению прокоагулянтной активности, усилить приток лейкоцитов из кровяного русла в очаг инфекции, активировать синтез фагоцитирующими клетками бактерицидных молекул — супероксидных и нитрооксидных радикалов.

В динамике процесса воспаления те же макрофаги начинают продуцировать противовоспалительные цитокины — интерлейкины-10, -13, трансформирующий ростовой фактор, которые связываются со своими рецепторами на клетках, посылая к ядру сигналы ингибирования функций фагоцитирующих клеток, в том числе продукции провоспалительных цитокинов.

Цитокины, контролирующие силу и форму специфического иммунного ответа, продуцируются Th1 (гамма-интерферон и туморнекротизирующий фактор бета) или Th2 (интерлейкины-4, -5, -6, -10, -13). Первая группа цитокинов обеспечивает перевес клеточного иммунного ответа над гуморальным, а вторая обеспечивает перевес гуморального иммунного ответа над клеточным. Например, продукт Th2 интерлейкин-4 ингибирует большинство функций макрофагов, активированных гамма-интерфероном. Интерлейкин-10 ингибирует представление антигена, продукцию провоспалительных цитокинов, является синергистом ИЛ-4. Продукт Th1 гамма-интерферон ингибирует функции В-лимфоцитов, участвующих в гуморальном ответе. Таким образом, под влиянием отдельных цитокинов и их сочетаний может изменяться характер специфического иммунного ответа (рис. 2).

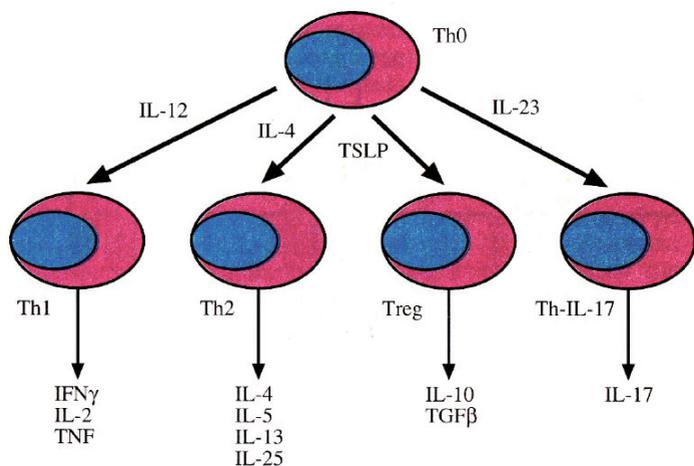


Рис. 2. Т-хелперные клоны и продуцируемые ими цитокины

Это значит, что от баланса цитокинов зависит эффективность противоинфекционной защиты, поскольку от внутриклеточно паразитирующих микроорганизмов эффективна клеточная защита, а против внеклеточно паразитирующих микроорганизмов эффективнее специфический гуморальный ответ. Цитокины выполняют функции межклеточных медиаторов, обеспечивающих передачу сигналов активации или ингибирования от одних клеток к другим.

На местном уровне цитокины ответственны за все последовательные этапы развития адекватного ответа на внедрение патогена, обеспечение его локализации и удаления, а затем

восстановления поврежденной структуры тканей. В случае неспособности местных защитных реакций воспаление продолжает развиваться, усиливается синтез цитокинов, они попадают в циркуляцию и их действие проявляется на системном уровне. В этом случае провоспалительные цитокины оказывают влияние практически на все органы и системы организма, участвующие в регуляции гомеостаза. В частности, под действием цитокинов в печени усиливается синтез острофазовых белков и компонентов системы комплемента, необходимых для борьбы с патогенном, снижается синтез альбумина, изменяется ионный состав плазмы крови, при этом снижается уровень ионов железа, повышается содержание цинка, активируется гемопоэз [17—9; 49; 50].

Таким образом, при развитии системного воспаления цитокины проявляют спектр биологической активности и влияют на функционирование практически всех систем организма.

Согласно Цитокиновой теории заболеваний состояние здоровья характеризуется постоянной сбалансированной продукцией цитокинов на низком уровне, что необходимо для поддержания гомеостаза. Однако при сверхпродукции некоторых цитокинов могут возникать различные заболевания, тяжесть которых варьирует от легкой до смертельной [18; 47].

Следует отметить, что при повышенной продукции цитокины опосредуют целый ряд патологических изменений в тканях при сепсисе, ревматоидном артрите, диабете, атеросклерозе, инфаркте миокарда и других заболеваниях человека.

### Классификации цитокинов, основные представители

Классификация цитокинов может проводиться по их биохимическим и биологическим свойствам, а также по типам рецепторов, посредством которых цитокины осуществляют свои функции. Первая классификация — по строению — учитывает аминокислотную последовательность, третичную структуру белка (табл. 2).

Таблица 2

### Классификация цитокинов по строению

| Группа | Особенности строения   | Цитокины   |
|--------|--|--|
| 1      | Альфа-спиральные тяжи, короткая цепь;<br>Альфа-спиральные тяжи, длинная цепь | IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-13, 15, IFN, M-CSF, GM-CSF<br>IL-6, 10, 11 онкостатин-М |
| 2      | Бета-складчатые структуры, длинная цепь                                      | Семейства ФНО, IL-1, TGF-b   |

Окончание табл. 2

| Группа | Особенности строения          | Цитокины |
|--------|-------------------------------|----------|
| 3      | Альфа/бета короткая цепь      | Хемокины |
| 4      | Смешанные мозаичные структуры | IL-12    |

По функциональному предназначению с известной долей относительности выделяют 5 групп цитокинов: (1) гематопозитические; (2) цитокины доиммунного воспаления; (3) цитокины — организаторы лимфоцитарного иммунного ответа; (4) цитокины — медиаторы иммунного воспаления; (5) противовоспалительные (иммуносупрессорные) цитокины.

Классификация, учитывающая биологические и биохимические свойства цитокинов, создана А. С. Симбирцевым в 2004 г, где все цитокины разделены на группы с учетом их биологической активности и особенностей строения их молекул и рецепторов, представлена в таблице 3 [8; 18].

Таблица 3

## Структурно-функциональная классификация

| Семейства цитокинов  | Подгруппы и лиганды   | Основные биологические функции   |
|--|---|--|
| Интерфероны I типа   | ИФН- $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ , $\kappa$ , $\omega$ , $\tau$ , ИЛ-28, ИЛ-29                | Противовирусная активность, антипролиферативное, иммуномодулирующее действие   |
| Факторы роста гемопоэтических клеток                             | Фактор роста стволовых клеток, Г-КСФ, М-КСФ, ИЛ-7, ИЛ-11  | Стимуляция пролиферации и дифференцировки различных типов клеток-предшественников в костном, активация кроветворения |
|  | Лиганды gp140: ИЛ-3, ИЛ-5, ГМ-КСФ<br>Эритропоэтин, тромбопоэтин                                 |  |
| Суперсемейство интерлейкина I и фактора роста фибробластов (ФРФ) | Семейство ФРФ: кислый ФРФ, основной ФРФ, ФРФ3-ФРФ23   | Активация пролиферации фибробластов и эпителиальных клеток   |
|  | Семейство ИЛ-1 (Ф1-11): ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , рецепторный антагонист ИЛ-1, ИЛ18, ИЛ-23 | Провоспалительное действие, активация специфического иммунитета  |
| Семейство фактора некроза опухолей                               | ФНО, лимфотоксины $\alpha$ , $\beta$ , Fas-лиганд и др.   | Провоспалительное действие, регуляция апоптоза и межклеточного взаимодействия иммунокомпетентных клеток              |

Окончание табл. 3

| Семейства цитокинов   | Подгруппы и лиганды   | Основные биологические функции  |
|---|---|---|
| Семейство интерлейкина 6  | Лиганды gp130: ИЛ-6, ИЛ-11, ИЛ-31, онкостатин-М, кардиотропин-1       | Провоспалительное и иммунорегуляторное действие   |
| Хемокины  | СС, СХС (ИЛ-8), СХЗС, С   | Регуляция хемотаксиса различных типов лейкоцитов  |
| Семейство интерлейкина 10   | ИЛ-10, 19, 20, 22, 24, 26   | Иммуносупрессивное действие   |
| Семейство интерлейкина 12   | ИЛ-12, 23, 27   | Регуляция дифференцировки Т-лимфоцитов хелперов   |
| Цитокины Т-хелперных клонов и регулирующие функции лимфоцитов                                     | Т-хелперы I типа: ИЛ-2, 15, 21, ИФН $\gamma$                          | Активация клеточного иммунитета   |
|   | Т-хелперы II типа: ИЛ-4,5, 10,13                                      | Активация гуморального иммунитета, иммуномодулирующее действие  |
|   | Лиганды $\gamma$ -цепи рецептора ИЛ-2: ИЛ-2, 4,7, 13, 9, 15, 21       | Стимуляция дифференцировки, пролиферации и функциональных свойств различных типов лимфоцитов, дендритных клеток, натуральных киллеров, макрофагов и др. |
| Семейство интерлейкина 17   | ИЛ-17 А, В, С, D, Е, F  | Активация синтеза провоспалительных цитокинов   |
| Суперсемейство фактора роста нервов, тромбоцитарного фактора и трансформирующих ростовых факторов | Семейство фактора роста нервов: НРФ, мозговой нейротрофический фактор | Регуляция воспаления, ангиогенеза, функционирования нейронов, эмбрионального развития и регенерации тканей  |
|   | Факторы роста из тромбоцитов, ангиогенные ростовые факторы            |   |
|   | Семейство ТФР: ТФР $\beta$ , активины, ингибины                       |   |
| Семейство эпидермального ростового фактора  | ЭРФ, ТФР $\alpha$   | Стимуляция пролиферации различных типов клеток  |
| Семейство инсулиноподобных ростовых факторов  | ИРФ-I, ИРФ-I I  | Стимуляция пролиферации различных типов клеток  |

Таким образом, в настоящее время известно большое количество цитокинов, приведем краткую характеристику основных представителей данных биологически активных молекул.

**Интерлейкин 1** — продуцируется главным образом моноцитами и макрофагами. В настоящее время под названием ИЛ-1 объединены два полипептида обозначаемые ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ . У человека главной формой секретируемого активированными макрофагами/моноцитами является ИЛ-1 $\beta$ . ИЛ-1 $\alpha$  существует в основном в виде мембранной формы. Основные эффекты — активация В- и Т-лимфоцитов, стимуляция стволовых клеток. Усиливает пролиферацию только преактивированных антигеном лимфоцитов, т. е. играет роль второго сигнала в стимуляции пролиферации лимфоцитов. ИЛ-1 является главным медиатором развития местной воспалительной реакции. Пирогенность является одним из важных его свойств. ИЛ-1 очень быстро активирует практически все типы клеток, участвующих в формировании локальной воспалительной реакции, включая фибробласты, эндотелий, резидентные макрофаги и все типы лейкоцитов крови. ИЛ-1 регулирует функции эндотелия и системы свертывания крови индуцируя прокоагулянтную активность, синтез провоспалительных цитокинов, экспрессию на поверхности эндотелия адгезионных молекул, обеспечивающих прикрепление нейтрофильных лейкоцитов и лимфоцитов, стимулирует выход нейтрофилов в очаг воспаления. ИЛ-1 влияет на полиморфноядерные лейкоциты активируя их активность, усиливая адгезию, хемотаксис, фагоцитоз, продукцию свободных форм кислорода. Прямо не влияя на перечисленные функции нейтрофильных гранулоцитов, проявляет свое действие опосредованно путем индукции синтеза макрофагами, эндотелиальными клетками и фибробластами других цитокинов, главным образом ИЛ-8. Резюмируя следует отметить, что ИЛ-1 является индуцибельным белком, синтез которого начинается в ответ на внедрение микроорганизмов либо повреждение тканей и необходим для развития и осуществления всего комплекса защитных реакций, именуемых острофазным воспалительным ответом [1; 8; 9; 36; 51].

**Рецептор-антагонист ИЛ-1(РАИЛ-1, АРИЛ-1)** — это третий представитель семейства ИЛ-1, который также связывается с рецепторами I типа на мембране клеток, однако передачи сигнала не происходит. Следует отметить, что в системе ИЛ-1 $\beta$  — ИЛ-1Ra — ИЛ-1R отмечается тенденция к поэтапному взаимодействию лиганда с рецептором. В молекуле агониста и антагониста выявлен общий сайт, который непосредственно взаимодействует с рецептором при первоначальном связывании. Дальнейшее взаимодействие агониста и рецептора обусловлено

наличием второго сайта связывания, найденного у агонистов. Происходящие конформационные изменения приводят к трансдукции сигнала внутрь клетки. Таким образом, у ИЛ-1Ra отсутствует второй сайт и это не приводит к передаче сигнала, что в свою очередь является еще одним механизмом подавления активности ИЛ-1. В настоящее время описано две формы ИЛ-1Ra: секреторная — протеин с молекулярным весом 17 кДа, секретируемый моноцитами, макрофагами, нейтрофилами, и внутриклеточная — форма с массой 18кДа, которая остается в цитоплазме кератиноцитов и других эпителиальных клеток, моноцитов и фибробластов. Образование этих форм происходит при транскрипции одного и того же гена. Регуляция эффектов ИЛ-1 в клеточном микроокружении в большей степени осуществляется внеклеточной формой ИЛ-1Ra [1; 8; 9; 36].

**Интерлейкин 2** — продуцируется активированными Т-хелперами (Th1). Проявляет активность после связывания со специфическим клеточным рецептором ИЛ-2R. ИЛ-2 оказывает пролиферирующее и активирующее воздействие на Т-лимфоциты (киллеры) и В-клетки, а также на натуральные киллеры. ИЛ-2 также принимает участие во всех воспалительных и аллергических реакциях, противоопухолевом иммунитете. Недавно появились сообщения о существовании сходных циркулирующих в крови рецепторах (при ВИЧ-инфекции, раке, отторжении трансплантатов, артрите отмечается существенное увеличение уровня свободного рецептора). ИЛ-2 содействует активности LAK-клеток («лимфокин-активированных киллеров») и TIL-клеток («тумор-инфильтрирующих лимфоцитов») [1; 6; 8; 25—27].

**Интерлейкин 3** — продуцируется главным образом Т-клетками. Основное действие — содействие пролиферации и дифференциации гемопоэтических клеток, т. е. важный гемопоэтический фактор. Его называют мультиростковым колониестимулирующим фактором [1; 6; 8; 25—27].

**Интерлейкин 4** — продуцируется Т-лимфоцитами и в частности Th 2 (второго типа). Стимулирует ранние этапы дифференцировки В-лимфоцитов, синтез Ig E В-клетками [1; 6; 8; 25—27].

**Интерлейкин 5** — продуцируется Т-клетками (Th2). Наделен преимущественно двумя видами активности: способностью содействовать росту эозинофилов и способностью активировать В-клетки [1; 6; 8; 25—27].

**Интерлейкин 6** — продуцируется Т-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами. Ведет себя одновременно и как гемопоэтический фактор роста, и как лимфокин (усиление дифференциации В-лимфоцитов и усиление активации Т-лимфоцитов). В норме

ИЛ-6 начинает подавлять секрецию TNF $\alpha$  и ИЛ-1, активировать продукцию печенью белков острой фазы воспаления и стимулировать гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему, что способствует регуляции воспаления. ИЛ-6 участвует в многообразных процессах в организме:

- 1) участие в созревании В-клеток в плазматические клетки;
- 2) участие в активации Т-клеток;
- 3) индукция острофазового ответа;
- 4) стимуляция роста и дифференциации гематopoэтических предшественников;
- 5) участие в пролиферации синовиальных фибробластов;
- 6) участие в образовании остеокластов [35].

**Интерлейкин 7** — продуцируется клетками стромы костного мозга, селезенки, тимуса и других органов. Способствует пролиферации предшественников В- и Т-лимфоцитов [1; 6; 8; 25—27].

**Интерлейкин 8** — продуцируется моноцитами, моноцитами, фибробластами эндотелиальными клетками. Выступает в роли активатора нейтрофилов, т. к. является хемокином, т. е. эндогенным хемоаттрактантом. Стимулирует направленное движение различных типов лейкоцитов, усиливает генерацию активных форм кислорода [1; 6; 8; 25—27].

**Интерлейкин 9** — продуцируется Т-клетками, в частности Т-хелперами. Способствует дифференциации и пролиферации В- и Т-клеток. Сходное влияние оказывает также на красный росток костного мозга [1; 6; 8; 25—27].

**Интерлейкин 10** — ИЛ-10 является противовоспалительным цитокином с молекулярной массой 17—21 kDa. Он обладает многими противовоспалительными свойствами, включая способность подавлять лихорадку. ИЛ-10 является ключевым регулятором иммунного ответа [8]. Интерлейкин 10, продуцируемый Т-клетками (Th2), может рассматриваться как антагонист ряда цитокинов. Так, ИЛ-10 подавляет продукцию ИФ Th1-клетками. Кроме того он, тормозит пролиферативный ответ Т-клеток на антигены и митогены, а также подавляет секрецию активированными моноцитами ФНО и ИЛ-6. В то же время ИЛ-10 стимулирует секрецию Ig E. В своем ингибирующем действии на клеточный иммунитет ИЛ-10 синергичен с ИЛ-4. Стимуляция созревания Трег-лимфоцитов путем воздействия на дендритные клетки. Ингибирование созревания дендритных клеток, активирующих Th2, экспрессии ими молекул II класса главного комплекса гистосовместимости и костимуляторных молекул и, как следствие, подавление активации Th2 [1; 6; 8; 25—27].

**Интерлейкин 11** — вырабатывается стромальными клетками костного мозга, фибробластами. Относится к регуляторам гемо-

поэза и имеет сходный эффект с ИЛ-6. Стимулирует гемопоэз мегакариоцитов и эритроцитов [1; 6; 8; 25—27].

**Интерлейкин 12** — гетеродимер, источником являются активированные В-клетки, моноциты, макрофаги. Является ключевым цитокином для усиления клеточно-опосредованного ответа вызывает пролиферацию активированных Т-лимфоцитов и ЕК, усиливает действие ИЛ-2, стимулирует Т-хелперы 1-го типа и продукцию  $\gamma$ -интерферона, ингибирует синтез IgE. Активирует эффективную противoinфекционную защиту против вирусов, бактерий, грибов и простейших [1; 6; 8; 25—27].

**Интерлейкин 13** — выделяется Т-лимфоцитами (Th2), индуцирует дифференцировку В-клеток, секрецию IgM, IgE, IgG4. Подавляет синтез активированными макрофагами ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО [1; 6; 8; 25—27].

**Интерлейкин 14** — выделяется активированными Т-лимфоцитами, усиливает аутокринно пролиферацию В- лимфоцитов в В-лимфомах [1; 6; 8; 25—27].

**Интерлейкин 15** — выделяется макрофагами, активирует пролиферацию Т-лимфоцитов, Т-хелперов 1 типа, дифференцировку их в киллеры, активирует ЕК. Данный цитокин врожденного иммунитета, состоящий из 4-х  $\alpha$  спиралей, ингибируется гетеродимерным рецептором [33].

Основные биологические эффекты ИЛ-15:

- 1) стимуляция формирования Т-цитотоксических клеток;
- 2) активация моноцитов, Т-лимфоцитов, нейтрофилов, тучных клеток и натуральных киллеров;
- 3) стимуляция освобождения интерферона  $\gamma$  и фактора некроза опухолей  $\alpha$ ;
- 4) ИЛ-15 — потенциальный хемоаттрактант для Т-клеток;
- 5) замедление апоптоза в фибробласт-подобных синовиоцитах и эндотелиоцитах [33].

**Интерлейкин 16** — катионный гомотетрамер, состоит из 130 аминокислот, MM 14КД, является лигандом, хемотаксическим и активирующим фактором для CD4<sup>+</sup>-моноцитов, стимулирует их миграцию и экспрессию ИЛ 2 — рецепторов (CD25) на лимфоцитах. Выделяется под влиянием антигенов CD8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клетками, а также эпителием бронхов и эозинофилами при действии гистамина [1; 6; 8; 25—27].

**Интерлейкин 17** — цитокин, образуемый Т-клетками. По своей природе ИЛ-17 является гликозилированный гомодимерный полипептид, вырабатываемый CD4<sup>+</sup> активированными Т-клетками памяти [44]. Действуя синергично с ИЛ-1 и ФНО $\alpha$ , ИЛ-17 активирует общий транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B в различных типах клеток, все три цитокина способны индуцировать синтез хемокина — MIP-3 $\alpha$ , стимулируют фибробласты,

эндотелиоциты и эпителиальные клетки секретировать ИЛ-6, ИЛ-8 и простагландин  $E_2$  [1; 6; 8; 25–27].

**Интерлейкин 18** — член семейства ИЛ-1 с плейотропным действием. Он запускает воспаление, повышая уровни таких цитокинов, как ФНО $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-6. Основные функции ИЛ-18:

- 1) индукция пролиферации Th1;
- 2) позитивная регуляция экспрессии рецепторов к ИЛ-2;
- 3) запуск продукции ИФ $\gamma$ , ФНО $\alpha$ , ГМ-КСФ;
- 4) повышение цитотоксичности Т-клеток и натуральных киллеров;
- 5) повышение продукции ИФ $\gamma$  натуральными клетками [1; 6; 8; 25–27, 36].

**Интерлейкин 19** — гомологичен ИЛ-10, 9 имеет характерную структуру, представленную шестью спиралями, которая сохраняется у всех генов семейства ИЛ-10. ИЛ-19 не связывается с рецепторным комплексом ИЛ-10, а наряду с другими новыми членами семейства ИЛ-20, 24 передает сигнал через гетеродимер ИЛ-20R1/ИЛ-20R2. Одна из возможных функций ИЛ-19 состоит в поддержании баланса между Th 1 и Th2. С другой стороны ИЛ-19 может играть роль в иммунном воспалении [8].

**Интерлейкин 20** — является гомологом ИЛ-10 и относится к его семейству. Данных по его функциональной активности мало, отмечается, что ИЛ-20 усиливает хемотаксис нейтрофилов в зону воспаления и индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 и МСР, показана его роль в патогенезе ревматоидного артрита и псориаза [1; 6; 8; 25–27].

**Интерлейкин 21** — гомологичен ИЛ-2, 4 и 15. Он продуцируется активированными Т-клетками и влияет на пролиферацию Т- и В-клеток, цитолитическую активность натуральных киллеров. ИЛ-21 снижает отзываемость на ИЛ-12 развивающихся Th-клеток путем специфического снижения STAT4. ИЛ-21 блокирует активацию и созревание дендритных клеток [1].

**Интерлейкин 22** — гомологичен ИЛ-10. ИЛ-22 преимущественно продуцируется Th1-клетками, среди которых наиболее сильными продуцентами являются CD45RO — позитивные клетки памяти, В- и Т-лимфоциты и НК-клетки человека. Рецепторный комплекс ИЛ-22 состоит из ИЛ-22R1 и ИЛ-10R2. Кроме того, имеется растворимый (секреторный) одноцепочечный рецептор, названный связывающим ИЛ-22 белком. что ИЛ-22 ингибирует продукцию ИЛ-4 увеличивает экспрессию IFN- $\gamma$ . Выяснилось, что ИЛ-22 стимулирует продукцию клетками печени ряда острофазовых белков, включая сывороточный амилоид А,  $\alpha_1$  — антихимотрипсин и гаптоглобин. Более того, ИЛ-22 стимулирует продукцию  $\beta$ -дефензинов 2 и 3,

S100-белков, профиллагрина, кальмодулин-подобного белка 5 и калликреина 7 в кератиноцитах. Все они участвуют в терминальной дифференцировке кератиноцитов. ИЛ-22 усиливает экспрессию матриксных протеаз 1 и 3 и уменьшает экспрессию десмоколлина и аннексина А9. Нарушение этих функций наблюдается в коже больных псориазом [8].

**Интерлейкин 23** — член семейства ИЛ-12, гетеродимер, состоящий из двух субъединиц, одна — уникальна для ИЛ-23 (p19), а вторая общая с ИЛ-12 (p40), продуцируется макрофагами, дендритными клетками. Он стимулирует быстрое увеличение Т-клеток памяти, поляризации Th17, повышает секрецию ИЛ-17, играет существенную роль в индукции экспрессии ИЛ-22. по некоторым данным участвует в аутоиммунном воспалении, специфичном для мозга [1; 49].

**Интерлейкин 24** — среди всех цитокинов семейства ИЛ-10 только ИЛ-24 обладает уникальными свойствами в отношении возможного использования для лечения опухолей, так как это единственный член семейства, специфически и прямо стимулирующий апоптоз опухолевых клеток без участия лимфоцитов и других клеток иммунной системы [1].

**Интерлейкин 25** — провоспалительный цитокин, принадлежащий семейству ИЛ-17. Продуцируется Th2-клетками и стимулирует продукцию ИЛ-4, 5, 13 не Т-клеточной популяцией [1].

**Интерлейкин 26** — член семейства ИЛ10, вырабатывается естественными киллерами (NK), макрофагами, Th17-клетками. Биологическая функция ИЛ-26, видимо, заключается в том, что активированные эпителиальные клетки под воздействием ИЛ-26 участвуют в локальных механизмах иммунитета слизистых оболочек и эпидермиса кожи. ИЛ-26 связывается с рецептором комплекса ИЛ-20R1 / ИЛ-10R2 на клетках-мишенях, где он вызывает специфическую внутриклеточную передачу сигнала и секрецию ИЛ-1, ИЛ -8 и ФНО-а, а также увеличивает хемотаксис нейтрофилов человека [47].

**Интерлейкин 27** — новый член семейства ИЛ-12, участвующий в провоспалительных реакциях. Это гетеродимерный цитокин, продуцируемый в ответ на инфекцию и воспаление. Он характеризуется плейотропностью действия и может проявлять про/противовоспалительные свойства [33].

**Интерлейкин 28(А/В), интерлейкин 29** — члены семейства интерферонов лямбда (ИЛ-28А, ИЛ-28В, ИЛ-29). Основная функция — проявление антивирусной активности [1; 30].

**Интерлейкин 31** — данный цитокин был открыт в 2004 г. По химическому строению это белок с четырьмя цепями, обладающий незначительной гомологией с ИЛ-6. Клетками-продуцентами являются CD4+-клетки, особенно Th2-клетки,

тучные клетки, дендритные клетки, моноцитами/макрофагами. Прежде всего, его биологическое действие распространяется на кожу, легкие, нервную систему, кишечник. В отличие от других цитокинов семейства ИЛ-6, ИЛ-31 не использует рецептор gp130, а имеет свой собственный — ИЛ-R31A [1; 8].

**Интерлейкин 32** — недавно описанный провоспалительный цитокин, вырабатывается прежде всего естественными киллерами (NK), моноцитами, эпителиальными клетками, и Т-клетками. С момента своего открытия в 1992 году, ИЛ-32 был назван транскриптом 4 естественных киллеров (NK4) из-за его селективной экспрессии активированными ИЛ-2 NK-клетками. Биологические функции ИЛ-32 оставались невыясненными до 2005 г. В настоящее время сообщается, что он участвует в стимуляции и секреции макрофагального воспалительного белка-2 (MIP-2), а также различных хемокинов и воспалительных цитокинов, а именно ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО $\alpha$ . ИЛ-32 ген локализован на хромосоме 16p13.3 человека и, как сообщается, существует в девяти различных изоформах мРНК альтернативного сплайсинга, включая ИЛ-32 $\alpha$ , ИЛ-32 $\beta$ , ИЛ-32 $\gamma$ , ИЛ-32 $\delta$ , ИЛ-32 $\epsilon$ , ИЛ-32 $\zeta$ , ИЛ-32 $\eta$ , ИЛ-32 $\theta$  и ИЛ-32s. Показана роль данного интерлейкина в патогенезе различных заболеваний, таких как инфекционные, онкологические, воспалительных и аллергических заболеваний [39].

**Интерлейкин 33** — член семейства ИЛ-1 — первоначально был описан как индуктор иммунных реакций 2 типа, активации Т-хелперов 2 (Th2) и тучных клеток. В настоящее время накапливаются данные, что ИЛ-33 стимулирует регуляторные Т (Treg) клетки, Th1-клетки, CD8+ Т-клеток и естественные киллеры (NK). Этот интерлейкин обладает плеiotропным действием, а именно может оказывать влияние на метаболический гомеостаз, инфекции, воспаления, рака и заболеваний центральной нервной системы [40].

**Трансформирующий фактор роста  $\beta$  (ТГФ  $\beta$ )** — трансформирующий фактор роста  $\beta$ . Подавляет пролиферацию Т- и В-лимфоцитов. Отменяя эффекты многих цитокинов, является супрессорным фактором [1; 8].

**Фактор некроза опухолей альфа (ФНО $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )** — фактор некроза опухоли-альфа, кахексин, выделяется макрофагами, Т- и В-лимфоцитами, нейтрофилами, стимулирует воспаление, активирует и повреждает клетки, вызывает лихорадку (пироген). Получил своё название из-за способности ингибировать рост некоторых опухолей. Является одним из основных провоспалительных цитокинов. Его большие концентрации обуславливают токсический шок. Кроме того, через свои рецепторы вызывает апоптоз. Функции ФНО $\alpha$  обусловлены провоспалительным и

катаболическим действием, антимикробной и противоопухолевой активностью. Помимо этих основных черт ФНО повышает продукцию белков острой фазы воспаления, является хемоаттрактантом макрофагов и клеток Лангерганса, стимулятором ангиогенеза, потенциальным активатором моноцитов, а также фагоцитоза и продукции свободных радикалов [1; 6; 8; 25—27, 36].

Другим аспектом его действия может быть стимуляция фибробластов экспрессировать молекулы адгезии, например ICAM, что в свою очередь приводит к повышению транспорта лейкоцитов к участкам воспаления [1; 6; 8; 25—27, 36].

ФНО $\beta$  (синоним: лимфотоксин) — секретируют Т- и В-лимфоциты, медиатор воспаления, повреждает клетки, вызывая апоптоз.

**Интерфероны** — древнее семейство цитокинов, обладающих выраженной противовирусной и антипролиферативной активностью, включающее несколько подклассов. По химической природе интерфероны являются гликопротеинами. Различаются две серологические группы интерферонов: I типа — к которым относятся ИФН альфа, бета, омега, оказывающие противовирусное и противоопухолевое действие; II типа — регулируют специфический иммунный ответ и неспецифическую резистентность (ИФН гамма).

ИФН альфа, бета, отличаясь по структуре и клеткам-продуцентам, обладают практически одинаковым механизмом действия, ингибируют репликацию РНК или ДНК вируса под воздействием олигоденилат-синтазы. Кроме того, ИФН I типа усиливают литическое действие нормальных киллеров на клетки-мишени, индуцируют экспрессию антигенов МНС I.

ИФН гамма продуцируется Т-лимфоцитами и NK. Стимулирует активность Т- и В-лимфоцитов, усиливает экспрессию МНС I и МНС II, стимулирует дифференцировку Th0 в Th1, совместно с антагонистом ИЛ-4 поддерживает баланс Th1/ Th2, в ряде случаев индуцирует апоптоз активированных макрофагов, эндотелиоцитов, клеток костного мозга [6; 8].

#### Вопросы к 1-й главе

1. Перечислить основные свойства цитокинов.
2. Плеiotропное действие цитокинов это... Расшифруйте на примере ИЛ-1.
3. Антагонизм цитокинов. Приведите примеры цитокинов-антагонистов.
4. Привести примеры аутокринного, паракринного и эндокринного действия цитокинов.
5. Перечислить основные компоненты системы цитокинов.

6. Перечислить и охарактеризовать клетки-продуценты цитокинов.

7. Привести основные классификации цитокинов.

8. Охарактеризовать роль цитокинов в системе врожденного иммунитета.

9. Описать роль цитокинов в создании субпопуляций Т-лимфоцитов, переключении клеточного и гуморального иммунного ответов.

10. Какой лимфокин применяется с целью замещения функции Т-хелперов (в частности при СПИДе, опухолях). Как называются активированные им клетки?

11. Какой цитокин применяется с целью стимуляции гранулоцитопоза?

12. Какой цитокин стимулирует образование тромбоцитов?

13. Охарактеризовать основные семейства цитокинов:

- семейство интерферонов I;
- семейство интерлейкина 1;
- семейство интерлейкина 6;
- семейство интерлейкина 12;
- семейство интерлейкина 10;
- семейство интерлейкина 17;
- семейство трансформирующих ростовых факторов.

## Глава 2. Рецепторы к цитокинам

Основные вопросы:

1. Понятие о цитокиновых рецепторах, классификации.
2. Строение генов рецепторов цитокинов.
3. Общий план строения белковой молекулы рецепторов цитокинов.
4. Передача сигнала через цитокиновые рецепторы.

Взаимодействие цитокина с клеткой определяется универсальной биологической системой, специфическим механизмом которой является рецепторный аппарат, связанный с восприятием метаболического кода. Для проявления биологической активности цитокина необходимо присутствие на поверхности чувствительных клеток специфических рецепторов, которые могут экспрессироваться параллельно с синтезом цитокина [8; 18].

Существует несколько классификаций рецепторов к цитокинам.

Согласно первой классификации, все рецепторы цитокинов делятся: на мембранные и растворимые.

В большинстве случаев рецепторы для цитокинов представлены одной, двумя или тремя пептидными или гликопротеидными цепями, встроенными в клеточную мембрану — это мембранные рецепторы. При этом цитокин взаимодействует с внешней, экстрацеллюлярной, частью рецептора. Сигнал такого рода взаимодействия передается внутрь клетки интрацеллюлярной частью рецептора, которая обладает ферментативной активностью. Наиболее изученными мембранными рецепторами являются рецепторы к ИЛ-3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 17, КСФ, ФНО, ИФН [27].

Растворимый рецептор, связывающийся с цитокином, — это отщепленный ферментом внеклеточный домен мембранного рецептора.

## Основные семейства цитокиновых рецепторов

| Название классов рецепторов                               | Число внеклеточных доменов | Особенности строения   | Цитокины   |
|---|----------------------------|--|--|
| Класс I — Гемопоэтиновые рецепторы                        | 2–7                        | Наличие 4 цистеинов и последовательности аминокислот Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS)                             | ИЛ-2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, EPO, TPO, GM-CSF, G-CSF, пролактин, гормон роста |
| Класс II — Семейство рецепторов интерферона               | 1–2                        | Наличие 4 цистеинов  | IFN. ИЛ-10   |
| Класс III — Семейство рецепторов фактора некроза опухолей | 1                          | Три рецептора объединены в гомотример для взаимодействия с тримером ФНО                                    | Цитокины семейства ФНО   |
| Класс IV — Семейство рецепторов интерлейкина-1            | 3                          | Внутриклеточная часть рецептора имеет сходство в строении и механизмах передачи сигнала с Toll рецепторами | ИЛ-1, ИЛ-18  |
| Суперсемейство иммуноглобулиновых рецепторов              | 5                          | Общность строения с рецепторами иммунной системы   | M-CSF, c-kit, flt-3, EGF, PDGF   |
| Рецепторы хемокинов                                       | Нет                        | Полипептидная цепь рецептора 7 раз пересекает клеточную мембрану   | Хемокнины  |

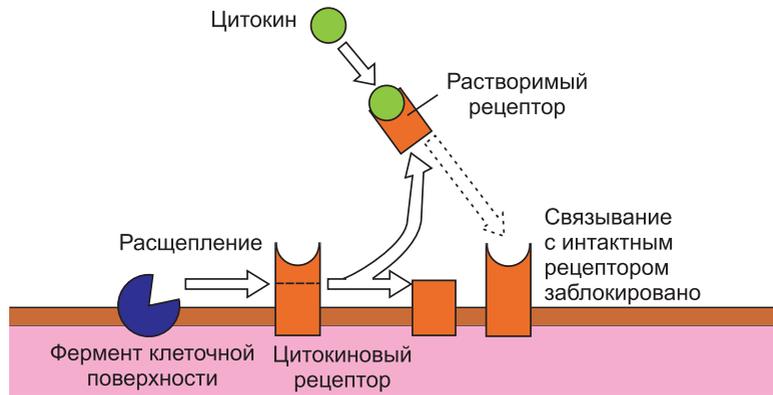


Рис. 3. Схема связывания цитокина с растворимым рецептором

Растворимые рецепторы сохраняют высокую аффинность в отношении своих лигандов и благодаря этому способны нейтрализовать цитокины, препятствуя их доступу к интактным мембранным рецепторам; их можно обнаружить в сыворотке и моче. Растворимые рецепторы могут выполнять функции конкурирующих антагонистов, а также участвовать в транспорте, доставке цитокинов в очаг поражения и выведении их из организма. Наиболее изученными растворимыми рецепторами являются рецепторы к ИЛ-2, 4, 6, ФНО и др.

Согласно второй классификации, рецепторы делятся на истинные и рецепторы-ловушки. Истинные рецепторы — это рецепторы, взаимодействующие с цитокинами и передающие сигнал в клетку.

В дополнение к обычным рецепторам, передающим сигнал к активации клеток, для многих лигандов существуют также мембранные рецепторы-ловушки или «молчащие» рецепторы, которые лишь связывают цитокины без проведения сигнала.

Существует еще одна классификация, делящая рецепторы цитокинов на семейства (табл. 4).

Наиболее крупное семейство цитокиновых рецепторов характеризуется наличием в составе молекул внеклеточных участков с гомологичной последовательностью длиной примерно в 200 аминокислотных остатков. К этому суперсемейству относятся рецепторы к ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-12, гранулоцитарному колониестимулирующему фактору (Г-КСФ) и гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору (ГМ-КСФ). В него же входят рецепторы для гуморальных факторов (гормона роста и пролактина), действующих преимущественно вне иммунной системы [8; 24; 26; 27]. Особенностью строения этой группы рецепторов является

наличие в молекуле четырех цистеинов и последовательности аминокислот Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS), расположенной недалеко от клеточной мембраны, схема строения рецептора ИЛ-2 представлена на рис. 4 [8; 24; 26; 27].

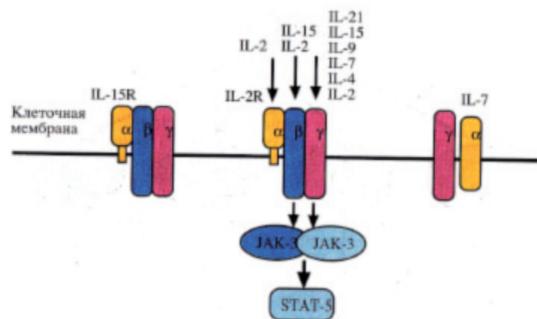


Рис. 4. Схема строения рецепторных комплексов цитокинов, использующих для передачи сигнала  $\gamma$ -цепь ИЛ-2

Второе по величине семейство объединяет рецепторы ко всем интерферонам, а также рецепторы к ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и макрофагальному колониестимулирующему фактору (М-КСФ). Это семейство входит как составная часть в иммуноглобулиновое суперсемейство, схема строения рецепторных комплексов представлена на рис. 5.

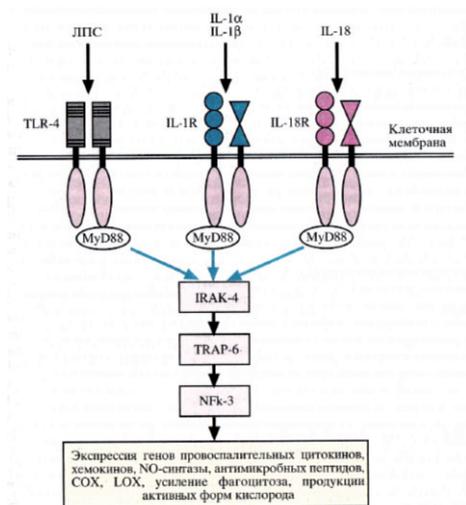


Рис. 5. Схема строения рецепторных комплексов ТЛР4, ИЛ-1, ИЛ-18 и путь передачи внутриклеточного сигнала

Цитокиновые рецепторы третьего семейства связывают ФНО- $\alpha$ , ФНО- $\beta$  (лимфотоксин) и ряд родственных цитокинов, в том числе фактора роста нервов (ФРН) [19].

В настоящее время известно более 20 различных рецепторов хемокинов, взаимодействующих с разной степенью аффинности с одним или несколькими лигандами хемокинового семейства. Рецепторы хемокинов принадлежат к суперсемейству родопсиновых рецепторов, имеют 7 трансмембранных доменов и проводят сигнал с участием G-белков. Основные структуры рецепторов цитокинов представлены на рис. 6.

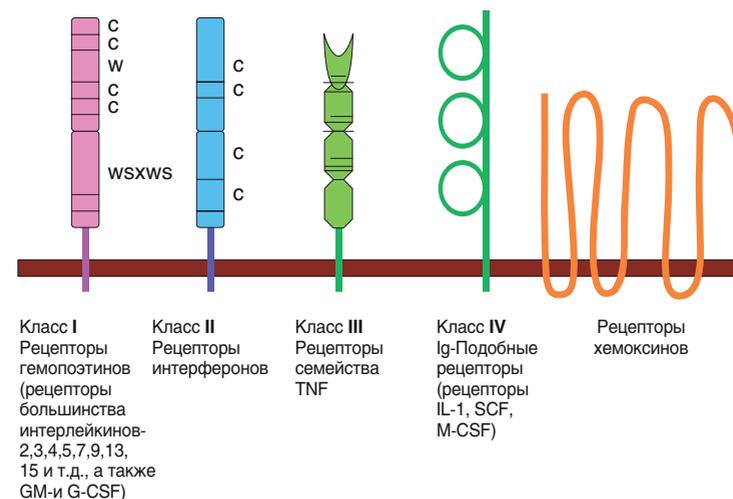


Рис. 6. Основные типы цитокиновых рецепторов

Таким образом, существует огромное количество цитокиновых рецепторов, которые различаются между собой особенностями строения и выполняемыми функциями.

### Строение генов рецепторов цитокинов

Важное место в формировании иммунного ответа занимают полиморфные гены цитокинов, гены их рецепторов и антагонистов. Показано, что уровень продукции цитокинов про- и противовоспалительной природы и их антагонистов, уровень экспрессии рецепторов к тому или иному цитокину и тому подобные эффекты определяются наследуемым человеком набором аллельных вариантов генов цитокинов и генов их рецепторов [8]. Гены рецепторов цитокинов и их отдельных цепей распределены в основном на 1, 2, 5 и X хромосоме [26; 27].

Рассмотрим строение генов наиболее хорошо изученных рецепторов цитокинов в геноме.

Ген рецептора Г-КСФ человека расположен на хромосоме 1 (p35-p34.3) и содержит 17 экзонов.

Известно 3 типа рецепторов для ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ , обозначаемых как рецепторы ИЛ-1 I типа и II типа, гены которых расположены, как и гены ИЛ-1, на 2 хромосоме у человека, и аксессуарный белок рецептора ИЛ-1. Рецепторы ИЛ-1 уникальны и не имеют аналогов среди других цитокинов [9].

Для ИЛ-8 существует 2 типа высокоаффинных рецепторов, рецепторы I и II типа, которые гомологичны друг другу на 77%. Гены этих рецепторов у человека расположены на хромосоме 2q34-q35 [8].

В настоящее время считается, что рецепторный комплекс ИЛ-2 состоит из 3 субъединиц, представляющих собой полипептиды разного размера, обозначаемые как  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепи, каждая из которых кодируется своим собственным геном. Ген  $\alpha$ -цепи рецепторного комплекса ИЛ-2 человека локализован на коротком плече хромосомы 10 [8].

Рецепторный комплекс ИФН $\gamma$  у человека состоит из двух субъединиц, обозначаемых как  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи рецептора. Ген  $\alpha$ -цепи рецептора находится на хромосоме 6. Ген  $\beta$ -цепи рецептора ИФН $\gamma$  человека расположен на хромосоме 21, трансмембранный полипептид состоит из 310 аминокислотных остатков.

Рецептор ИЛ-4 человека состоит из двух субъединиц: специфичной для ИЛ-4  $\alpha$ -цепи и общей для нескольких цитокинов  $\gamma$ -цепи. Ген  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-4 человека расположен на хромосоме 16p11-12 и кодирует одноцепочечный трансмембранный белок из 800 аминокислотных остатков. Из них 207 находятся экстраклеточно, содержат последовательность WSXWS и 4 консервативных цистеина, что характерно для группы гемопоэтиновых рецепторов [27].

Рецептор ИЛ-5 человека состоит из  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи. Ген  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-5 у человека расположен на хромосоме 3p26, а  $\beta$ -цепи — на хромосоме 22q12.3-13.1 [8].

Рецепторы ИЛ-13 бывают двух типов. Оба эти рецептора принадлежат семейству гемопоэтиновых рецепторов, их гены расположены на X хромосоме.

ИЛ-23R локализуется на хромосоме 1 человека на расстоянии 150 kb от гена субъединицы рецептора ИЛ-12R $\beta$ 1.

Структуры генов, кодирующих ИЛ-10R1 и ИЛ-10R2 весьма похожи друг на друга. Оба включают около 30–40 кДа геномной ДНК. Второй и третий экзоны этих генов кодируют первый домен SD100, четвертый и пятый экзоны кодируют второй до-

мен SD100, шестой экзон кодирует трансмембранный домена, седьмой экзон кодирует внутриклеточный домен [8].

Ген ФНОRII располагается на хромосоме 1p36. Большинство функциональных областей ФНОRII кодируются отдельными экзонами в гене. Экзон 6 кодирует небольшую часть трансмембранного региона. Была описана связь между СКВ и полиморфизм ФНОRII в экзоне 6 [8; 28].

Выделяют два подсемейства хемокинов на основе их локализации на хромосомах. Альфа-хемокины относятся к семейству хемокинов 4q, поскольку гены, кодирующие эти хемокины, располагаются на хромосоме 4. Бета-хемокины или семейство хемокинов 17q локализируются на хромосоме 17 (у мышей — на 11 хромосоме) [54].

Таким образом, гены рецепторов цитокинов располагаются не на одной или нескольких хромосомах, а разбросаны по всему геному.

#### Общий план строения белковой молекулы рецепторов цитокинов

Все рецепторы цитокинов представляют собой трансмембранные гликопротеины, у которых внеклеточная часть отвечает за связывание цитокина. Как правило, эти рецепторы состоят более чем из одной субъединицы, причем высокоаффинное связывание является следствием взаимодействия с разными субъединицами, каждая из которых сама способна связывать соответствующий цитокин, но с более низкой аффинностью. Нередко на клетках-мишенях цитокинов обнаруживаются несколько типов центров связывания, различающихся аффинностью к цитокину. В составе клеточных мембран одни цепи реагируют только с определенным цитокином, в то время как другие способны формировать общие рецепторы для разных цитокинов.

Наличие общих структур в рецепторах может обуславливать функциональное сходство ряда цитокинов. Примером подобной организации рецепторов цитокинов служит строение рецепторного комплекса ИЛ-2. Удивительным оказалось открытие того факта, что отдельные субъединицы рецепторного комплекса ИЛ-2 являются общими для ИЛ-2 и некоторых других цитокинов. Так,  $\beta$ -цепь является одновременно компонентом рецептора для ИЛ-15, а  $\gamma$ -цепь служит общей субъединицей рецепторов для ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-15 и ИЛ-21. Это означает, что все упомянутые цитокины, рецепторы которых также состоят из 2–3 индивидуальных полипептидов, используют  $\gamma$ -цепь в качестве компонента своих рецепторов, причем,

компонента, ответственного за проведение сигнала. Во всех случаях специфичность взаимодействия для каждого цитокина обеспечивается другими субъединицами, отличающимися по структуре. Среди рецепторов цитокинов существуют еще 2 общих рецепторных субъединицы, проводящих сигнал после взаимодействия с разными цитокинами. Это общая рецепторная субъединица  $\beta$ c (gp140) для рецепторов ИЛ-3, ИЛ-5 и ГМ-КСФ, а также рецепторная субъединица gp130, общая для членов семейства ИЛ-6. Присутствие общей сигнальной субъединицы в рецепторах цитокинов служит одним из подходов для их классификации, так как позволяет найти общность как в строении лигандов, так и в биологических эффектах [8; 24—27; 54].

Рассмотрим строение рецепторов цитокинов на конкретных примерах.

### Мембраносвязанные рецепторы

Рецепторы к ИЛ-1. Рецептор ИЛ-1 1 типа экспрессируется на многих клетках: Т-лимфоцитах, тимоцитах, фибробластах, эндотелиальных клетках, гепатоцитах и др. Тип 2 рецепторов характерен для В-клеток, макрофагов и моноцитов. Эти два рецептора имеют различные характеристики связывания с ИЛ-1- $\alpha$  и  $\beta$ . Обычно ИЛ-1 $\alpha$  лучше связывается с R1, и ИЛ-1 $\beta$  — лучше с R2. В сыворотке были выявлены растворимые формы обоих рецепторов. Кроме того, был обнаружен дополнительный белок — рецептор (ИЛ-1R-АсР), который образует комплексы с ИЛ-1R1, после чего он увеличивает аффинность этого рецептора к ИЛ-1, связываясь либо с ИЛ-1 $\alpha$ , либо с ИЛ-1 $\beta$ . Число рецепторов на клетках невелико и составляет, как правило, несколько десятков или сотен. Оба типа рецепторов представляют собой трансмембранные гликопротеиды с Ig-подобной структурой внеклеточного участка молекулы. Между ними имеется 28% гомологии.

Рецептор к ИЛ-2. ИЛ-2 взаимодействует со специфическими мембранными рецепторами, экспрессирующимися на Т- и В-лимфоцитах, НК-клетках и моноцитах/макрофагах. В настоящее время считается, что рецепторный комплекс ИЛ-2 состоит из 3 субъединиц, представляющих собой полипептиды разного размера, обозначаемые как  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепи, каждая из которых кодируется собственным геном. Первой была открыта  $\alpha$ -цепь рецептора, представляющая собой полипептид с молекулярной массой 55 кДа. Эта рецепторная субъединица экспрессирована на активированных Т-лимфоцитах и вначале называлась поверхностным антигеном Tас, а позже была обозначена как CD25-антиген по классификации поверхностных молекул лейкоцитов. Полипептид состоит из 272 аминокислотных остатков, включая 21-членный сигнальный пептид, и имеет очень короткую внутриклеточную часть, всего лишь из 13 аминокислотных остатков, и трансмембранный участок из 19 остатков. Молекула CD25 является индуцибельным поверхностным белком лимфоцитов, специфически связывает ИЛ-2 и не взаимодействует с другими цитокинами. Тем не менее очень скоро после открытия стало очевидно, что одна она не может служить функционально активным рецептором ИЛ-2, в первую очередь вследствие невозможности передачи сигнала из-за очень короткого внутриклеточного участка. Действительно, вскоре был открыт другой полипептид, с молекулярной массой 70—75 кДа. Он конститутивно экспрессировался на некоторых типах лимфоидных клеток, отличался по структуре от CD25, не реагировал с антителами к нему и имел более высокую аффинность связывания с ИЛ-2. Эта субъединица получила название  $\beta$ -цепи рецепторного комплекса ИЛ-2. Она состоит из 525 остатков и имеет достаточно большой цитоплазматический участок, из 248 аминокислотных остатков. Дальнейшие эксперименты по изучению кинетики связывания ИЛ-2 с поверхностными структурами лимфоцитов привели к обнаружению и третьего компонента рецепторного комплекса, с молекулярной массой 64 кДа, —  $\gamma$ -цепи, также представляющей собой индивидуальный полипептид из 347 аминокислотных остатков, из которых 86 находятся в цитоплазме. Для высокоаффинного взаимодействия ИЛ-2 со своим рецептором требуется участие всех трех субъединиц, выполняющих в составе рецепторного комплекса разные функции.

Рецептор к ИЛ-3. Рецепторный комплекс ИЛ-3 состоит из двух субъединиц, обозначаемых как  $\alpha$  и  $\beta$ . Рецептор принадлежит к семейству гемопоезиновых рецепторов и по строению сходен с рецепторами ИЛ-5 и ГМ-КСФ. Все три рецептора имеют одну и ту же общую субъединицу  $\beta$ , но специфичные для каждого цитокина 3 разные индивидуальные  $\alpha$ -субъединицы. Специфичная для ИЛ-3  $\alpha$ -субъединица рецептора с ММ 41 кДа связывает ИЛ-3 с низкой аффинностью и не может обеспечить передачу сигнала внутрь клетки из-за очень короткой цитоплазматической части, не обладающей никакой ферментативной активностью. Высокоаффинный рецепторный комплекс ИЛ-3 формируется путем ассоциации между  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами. В-субъединица сама первоначально не связывает ИЛ-3, но взаимодействует с ИЛ-3, связанным с  $\alpha$ -субъединицей, с последующим образованием высокоаффинного комплекса.  $\beta$ -субъединица с ММ 96 кДа имеет длинный цитоплазматический участок, необходимый для передачи сигнала. И  $\alpha$ -, и  $\beta$ -субъединицы представляют собой гликолизированные полипептиды с одним трансмембранным участком.

кислотных остатков, включая 21-членный сигнальный пептид, и имеет очень короткую внутриклеточную часть, всего лишь из 13 аминокислотных остатков, и трансмембранный участок из 19 остатков. Молекула CD25 является индуцибельным поверхностным белком лимфоцитов, специфически связывает ИЛ-2 и не взаимодействует с другими цитокинами. Тем не менее очень скоро после открытия стало очевидно, что одна она не может служить функционально активным рецептором ИЛ-2, в первую очередь вследствие невозможности передачи сигнала из-за очень короткого внутриклеточного участка. Действительно, вскоре был открыт другой полипептид, с молекулярной массой 70—75 кДа. Он конститутивно экспрессировался на некоторых типах лимфоидных клеток, отличался по структуре от CD25, не реагировал с антителами к нему и имел более высокую аффинность связывания с ИЛ-2. Эта субъединица получила название  $\beta$ -цепи рецепторного комплекса ИЛ-2. Она состоит из 525 остатков и имеет достаточно большой цитоплазматический участок, из 248 аминокислотных остатков. Дальнейшие эксперименты по изучению кинетики связывания ИЛ-2 с поверхностными структурами лимфоцитов привели к обнаружению и третьего компонента рецепторного комплекса, с молекулярной массой 64 кДа, —  $\gamma$ -цепи, также представляющей собой индивидуальный полипептид из 347 аминокислотных остатков, из которых 86 находятся в цитоплазме. Для высокоаффинного взаимодействия ИЛ-2 со своим рецептором требуется участие всех трех субъединиц, выполняющих в составе рецепторного комплекса разные функции.

Рецептор к ИЛ-4. Рецептор ИЛ-4 человека состоит из двух субъединиц: специфичной для ИЛ-4  $\alpha$ -цепи с молекулярной массой около 140 кДа и общей для нескольких цитокинов  $\gamma$ -цепи рецепторного комплекса ИЛ-2 с молекулярной массой 64 кДа. ИЛ-4 прямо взаимодействует с  $\alpha$ -цепью рецептора с достаточно высокой аффинностью, после чего он связывается с  $\gamma$ -цепью рецептора для увеличения аффинности в 2–3 раза. Одна молекула ИЛ-4 взаимодействует одновременно с  $\alpha$ - и  $\gamma$ -цепью рецептора и приводит к их димеризации. На лимфоцитах и других клетках конститутивно экспрессируется от 100 до 400 рецепторов ИЛ-4. Активация лимфоцитов приводит к увеличению экспрессии рецепторов в 5–10 раз.

Рецептор к ИЛ-5. Рецептор ИЛ-5 человека состоит из двух субъединиц, обозначаемых как  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи рецепторного комплекса.  $\alpha$ -цепь представляет собой одноцепочечный трансмембранный белок с молекулярной массой 45 кДа, который специфично взаимодействует только с ИЛ-5 с промежуточной аффинностью, но имеет очень небольшую внутриклеточную часть без сайтов фосфорилирования, что делает невозможным передачу внутриклеточного сигнала.  $\beta$ -цепь рецепторного комплекса представляет собой более крупный белок с молекулярной массой около 100 кДа и является общей рецепторной субъединицей рецепторов ИЛ-5, ИЛ-3 и ГМ-КСФ — так называемая общая  $\beta$ -цепь. ИЛ-5 прямо не связывается с  $\beta$ -цепью рецептора. Сначала происходит связывание с  $\alpha$ -цепью, и только после этого — дополнительное связывание с  $\beta$ -цепью, приводящее к формированию высокоаффинного взаимодействия. В составе такого комплекса  $\alpha$ -цепь служит только для первичного специфичного контакта с ИЛ-5, а затем происходит связывание с  $\beta$ -цепью, обеспечивающей передачу активационного сигнала.

Рецептор к ИЛ-6. Высокоаффинный рецепторный комплекс для ИЛ-6 состоит из двух субъединиц: специфичной для ИЛ-6 рецепторной субъединицы с ММ 80 кДа и общей для всех членов семейства ИЛ-6 субъединицы gp130. Первая из них может существовать в виде мембранной и в виде растворимой формы. Эта субъединица имеет короткий трансмембранный участок, не участвует во внутриклеточном сигналинге и служит для связывания ИЛ-6, после чего происходит ее ассоциация с gp130. Для формирования функционально активного рецептора требуется связывание двух молекул gp80 с двумя молекулами ИЛ-6 и далее ассоциация с двумя молекулами gp130. Рецептор gp130 конститутивно экспрессирует большинство клеток организма, а рецептор gp80 экспрессируется в основном гепатоцитами и лейкоцитами.

Рецептор к ИЛ-7. Рецептор состоит из двух субъединиц:  $\alpha$ -цепи рецептора, специфичной только для ИЛ-7, и  $\gamma$ -цепи рецепторного ИЛ-2, выполняющей роль общей рецепторной субъединицы для ИЛ-2, ИЛ-7 и еще нескольких цитокинов.  $\alpha$ -субъединица рецептора ИЛ-7 представляет собой типичный трансмембранный полипептид с молекулярной массой 50 кДа, относящийся к группе гемопозитиновых рецепторов. Внеклеточная часть состоит из 219 аминокислотных остатков и в области N-конца имеет богатый цистеинами участок последовательности. Далее следует трансмембранный участок из 25 аминокислотных остатков и достаточно крупная внутриклеточная часть (195 остатков), имеющая сайты фосфорилирования.

Рецепторы к ИЛ-8 и хемокинам. Для ИЛ-8 существует 2 типа высокоаффинных рецепторов, рецепторы I и II типа, которые гомологичны друг другу на 77%. Согласно новой единой номенклатуре рецепторов хемокинов они обозначаются CXCR1 и CXCR2. Рецепторы ИЛ-8 принадлежат к семейству родопсиновых рецепторов. Структура представлена на рис. 7.

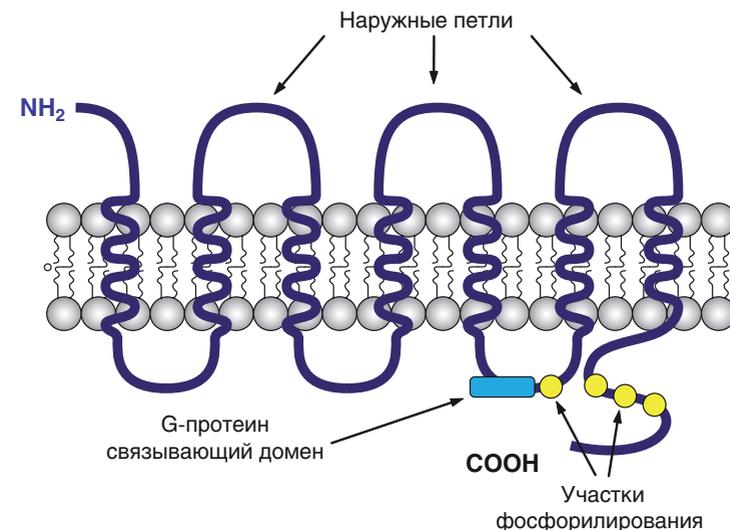


Рис. 7. Структура рецептора для хемокинов

Рецептор к ИЛ-9. Рецептор ИЛ-9 человека состоит из двух субъединиц, относящихся к группе гемопозитиновых рецепторов, — специфичной для ИЛ-9 цепи и  $\gamma$ -цепи рецептора ИЛ-2, общей субъединицы рецепторов ИЛ-2, 4, 7, 9, 15 и 21. Специфичная для ИЛ-9 цепь представляет собой трансмембран-

ный белок с молекулярной массой 64 кДа. Внеклеточная часть состоит из 233 аминокислотных остатков и имеет несколько консервативных цистеинов. Внутриклеточные домены представлены 231 аминокислотным остатком. Специфичная для ИЛ-9 цепь рецептора связывает цитокин с высокой аффинностью, но передача сигнала происходит только после взаимодействия ИЛ-9 с обеими цепями и изменения конформации рецепторного комплекса.

Рецептор к ИЛ-10. Активный рецепторный сигнальный комплекс ИЛ-10 состоит из двух различных рецепторных цепей: ИЛ-10R $\alpha$  и ИЛ-10R $\beta$  (ИЛ-10R1 и ИЛ-10R2). ИЛ-10R2 носит также название «рецептор семейства цитокинов тип 2 член 4». Формирование рецепторного комплекса проходит в 2 стадии: ИЛ-10 связывается с высокой аффинностью с ИЛ-10R1 и с меньшим аффинитетом с ИЛ-10R2.

Рецептор к ИЛ-12. Рецептор для ИЛ-12 состоит из двух субъединиц — ИЛ-12R $\beta$ 1 и ИЛ-12R $\beta$ 2, каждая из которых имеет достаточно высокую гомологию с gp130, являющимся общим рецептором для суперсемейства цитокинов подобных ИЛ-6. Они являются трансмембранными гликопротеинами I типа с молекулярной массой около 100 кДа и около 130 кДа. Рецептор с высокой степенью аффинности образуется только в результате коэкспрессии обеих субъединиц рецептора. Экспрессия ИЛ-12R обнаружена только на активированных Т-лимфоцитах и НК-клетках, тогда как клеток-продуцентов ИЛ-12 гораздо больше — активированные моноциты периферической крови, макрофаги, выходящие из моноцитов и костного мозга, нейтрофилы, мезоглия, кератиноциты и эндотелиальные клетки. Для создания высокоаффинного рецепторного комплекса требуется экспрессия обеих субъединиц ИЛ-12 рецептора.

Рецепторы к ИЛ-13. Рецепторы ИЛ-13 бывают двух типов. Первый тип функционального рецептора, обеспечивающего передачу активационного сигнала от ИЛ-13, состоит из двух полипептидных цепей: 1) специфической для ИЛ-13 субъединицы, или  $\alpha$ -1-цепи рецептора ИЛ-13 и 2)  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-4, общей субъединицы для рецепторов ИЛ-4 и ИЛ-13.  $\alpha$ -1-цепь рецептора ИЛ-13 (ИЛ-13R $\alpha$ 1) представляет собой типичный гемопозитиновый рецептор, состоящий из 380 аминокислотных остатков, из которых 317 находится внеклеточно и формирует домены для связывания ИЛ-13. Далее следует короткий трансмембранный домен, а затем очень небольшой внутриклеточный участок, не имеющий сайтов фосфорилирования или других участков для возможной передачи активационного сигнала. Эта рецепторная субъединица служит только для связывания ИЛ-13, после чего он взаимодействует с  $\alpha$ -цепью рецептора

ИЛ-4, которая отвечает за проведение сигнала. Этим определяется сходство биологических активностей ИЛ-13 и ИЛ-4.

Рецептор к ИЛ-15. Рецепторный комплекс для ИЛ-15 состоит из 3 субъединиц. Две из них одинаковы с рецепторным комплексом ИЛ-2 —  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепи, а третья представляет собой специфичную только для ИЛ-15 рецепторную субъединицу —  $\alpha$ -цепь рецептора. Рецепторы для ИЛ-15 экспрессируются на Т-лимфоцитах, НК-клетках, моноцитах, эндотелиальных и некоторых других клетках. Так же, как и в случае рецепторного комплекса ИЛ-2,  $\alpha$ -цепь рецептора ИЛ-15 не имеет достаточно большой внутриклеточной части для передачи сигнала. Эта субъединица обеспечивает специфичность и высокую аффинность связывания ИЛ-15 с рецепторным комплексом, тогда как передача сигнала происходит с помощью  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей.

Рецепторы к ИЛ-17. Рецептор для ИЛ-17 является трансмембранным белком I типа, экстрацеллюлярный домен рецептора состоит из 293, трансмембранный домен — из 25 и длинный цитоплазматический хвост — из 525 аминокислот. ИЛ-17AR mRNA интенсивно экспрессируется в легких, почках, печени и селезенке, так же как и в выделенных из тканей фибробластах, эпителиальных, мезотелиальных и миелоидных клетках мышей и крыс. Идентифицирован рецептор для ИЛ-17E человека, который имеет всего 26% гомологии с ИЛ-17AR. Рецептор, названный ИЛ-17Rh1, связывает только ИЛ-17E, но не ИЛ-17A, ИЛ-17B и ИЛ-17C. Рецептор представляет собой трансмембранный белок, состоящий из 502 аминокислот.

Рецептор к Г-КСФ. Рецепторы Г-КСФ экспрессируются главным образом на клетках миеломоноцитарного ростка кроветворения от миелобластов до зрелых нейтрофильных гранулоцитов, а также на некоторых клетках моноцитарного ростка и ряде трансформированных клеточных линий, не относящихся к системе кроветворения. Рецептор представляет собой одну полипептидную цепь с ММ около 150 кДа, обеспечивающую высокоаффинное связывание лиганда с  $K_d = 100$ рМ. Число рецепторов колеблется от 50 до 500 на клетку, причем по мере созревания нейтрофилов количество рецепторов возрастает.

Рецептор к М-КСФ. Рецепторы М-КСФ экспрессируются на на всех клетках моноцитарного ряда, гладкомышечных клетках и на трофобласте. Рецептор является интегральным трансмембранным белком, содержащим во внеклеточной части 5 иммуноглобулинподобных повторяющихся участков, а во внутриклеточной части тирозин-киназный домен, обеспечивающий передачу сигнала. Каждый из мономеров в составе гомодимерной молекулы М-КСФ взаимодействует с первыми

тремя иммуноглобулиновыми доменами и вызывает демиризацию рецептора. Димеризация приводит к быстрому фосфорилированию тирозиновых остатков и запускает механизм передачи сигнала к ядру клетки.

Рецепторы к ФНО. Существует 2 типа рецепторов — тип 1 и тип 2 с молекулярными массами 60 и 80 кДа. Оба рецептора относятся к типу 1 трансмембранных цитокиновых рецепторов. Оба являются трансмембранными гликопротеидами, характеризуются наличием 40 аминокислотных участков, богатых цистеинами, повторяющихся в экстрацеллюлярных регионах N-концевого домена. Оба типа рецепторов присутствуют во всех ядерных клетках человека. Первый тип рецептора более широко распространен и практически одинаково экспрессируется в клетках организма, тогда как второй тип рецептора в основном экспрессируется в эндотелиальных клетках и клетках гемопоэтического ряда.

Рецептор к ИФН- $\gamma$ . Рецепторный комплекс ИФН- $\gamma$  человека состоит из двух субъединиц, обозначаемых как  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи рецептора.  $\alpha$ -цепь рецептора представляет собой трансмембранный белок с молекулярной массой 90 кДа. Экстраклеточные домены, нужные для связывания ИФН- $\gamma$ , состоят из 288 аминокислотных остатков, а внутриклеточная часть — из 222 остатков. Гомодимер ИФН- $\gamma$  одновременно связывается с двумя  $\alpha$ -цепями рецептора, которые при этом не взаимодействуют друг с другом. Для формирования высокоаффинного рецепторного комплекса необходимо участие еще двух одинаковых рецепторных субъединиц,  $\beta$ -цепей рецептора [8; 17; 24; 27; 28; 44; 54].

### Растворимые рецепторы цитокинов

Растворимые цитокиновые рецепторы играют важную роль в регуляции функций своих лигандов. Способность образовывать данную форму рецепторов присуща всем семействам цитокинов, кроме хемокинов.

Несвязанные с мембранами клеток свободные рецепторные структуры обнаружены для следующих цитокинов: ФНО $\alpha$ , ИЛ-1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 22, ИФН $\alpha$ , - $\gamma$ , ТГФ- $\beta$ , ростовых факторов (М-КСФ, Г-КСФ, ГМ-КСФ, фактор роста нервов, эритропоэтин) [8].

Главное биологическое значение данной группы рецепторов состоит в блокировке эффектов цитокинов. Однако, имеются данные о расширении и усилении биологической активности цитокинов при наличии растворимых форм рецепторов.

Примером ингибиторного влияния служат свободные рецепторы ИЛ-1РІІ и ФНО $\alpha$ -РІ, ФНО $\alpha$ -РІІ (рецепторы-ловушки).

Растворимые  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-6 существенно усиливают сигнал своего лиганда, продлевая время циркуляции ИЛ-6.

Растворимый рецептор ИЛ-2. ИЛ-2 связывается с высокоаффинным ИЛ-2R, который состоит из трех субъединиц, включая ИЛ-2R $\alpha$  и ИЛ-2R $\beta$ . Субъединица ИЛ-2R $\beta$  является постоянным компонентом мембран лимфоцитов, а субъединица ИЛ-2R $\alpha$  образуется при связывании ИЛ-2. Эта субъединица соответствует низкоаффинному ИЛ-2R, и увеличение ее количества указывает на активацию клеток. После активации часть субъединицы высвобождается из мембраны, превращаясь в sИЛ-2R, циркулирующий маркер клеточной активации. Определение уровня sИЛ-2R позволяет детектировать и контролировать активацию Т-клеток после трансплантации органов (пересадки почек и др.). Измерение концентрации sИЛ-2R в сыворотке крови может быть использовано для постановки точного диагноза.

Растворимый рецептор ИЛ-4. Высокоаффинный ИЛ-4R представляет собой комплекс, состоящий, по крайней мере, из двух субъединиц:  $\alpha$ -субъединицы, связывающей ИЛ-4 с высоким сродством, и  $\gamma$ -субъединицы, вносящей дополнительный вклад в связывание.  $\alpha$ -цепь ИЛ-4R входит в семейство цитокиновых рецепторов. sИЛ-4R образуется в результате альтернативного сплайсинга. ИЛ-4R экспрессируется в незначительном количестве на пре-В-клетках, неактивированных зрелых Т- и В-лимфоцитах. Активация клеток приводит к росту числа ИЛ-4R.

Растворимый рецептор ИЛ-6. ИЛ-6R содержит две цепи: ИЛ-6R $\alpha$ , гликопротеин с молекулярной массой 130 кДа. Мембранный ИЛ-6R расщепляется с образованием sИЛ-6R с молекулярной массой 55 кДа. ИЛ-6 первоначально связывается с ИЛ-6R $\alpha$  и ИЛ-6R $\beta$  с образованием бинарного комплекса. Этот комплекс затем ассоциируется с двумя молекулами ИЛ-6R $\beta$ , и образовавшиеся молекулы фосфорилируются. Ответственным за сигнальную трансдукцию является гомодимер ИЛ-6R $\beta$ , который активируется также LIF, CNTF, онкостатином М и ИЛ-11.

Растворимый рецептор ФНО I ФНО проявляет свою биологическую активность при связывании со специфическими высокоаффинными мембранными рецепторами. ФНО-RI, известный также как CD120a, является белком с молекулярной массой 55—60 кДа. Он экспрессируется клетками большинства типов тканей. Активация различных типов клеток приводит к протеолитическому расщеплению мембранных рецепторов и образованию их растворимых форм. pФНО-RI стабилизирует циркулирующий ФНО и увеличивает период полураспада данного цитокина. Он принимает участие в апоптозе и образовании герминативного центра, а также обладает антивирусной активностью.

Растворимый рецептор ФНО II. ФНО-RII (CD120b) является белком с молекулярной массой 75—80 кДа. Он экспрессируется клетками большинства типов тканей. При активации клеток происходит протеолиз мембранных рецепторов, в результате чего образуются растворимые формы. рФНО-RII стабилизирует циркулирующий ФНО и увеличивает период полураспада данного цитокина в сыворотке крови. Определение рФНО-RII позволяет оценить состояние иммунной системы [32].

### Передача сигнала через цитокиновые рецепторы

Существует несколько вариантов проявления биологической активности в зависимости от участия различных внутриклеточных систем в передаче сигнала от рецептора, что связано с особенностями конкретных клеток-мишеней.

Во-первых, цитокины могут оказывать антиапоптотическое действие. Это приводит к поддержанию жизнеспособности и длительному росту клеток. Напротив, сигнал к апоптозу проводится с участием специфического участка рецепторов группы ФНО, так называемого домена «смерти».

Во-вторых, дифференцировочный сигнал, приводящий к выбору пути развития либо терминальной дифференцировки клеток, осуществляется с участием внутриклеточных белков STAT (сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции). G-белки участвуют в передаче сигнала от хемокинов, что приводит к усилению миграции и адгезии клеток [24; 27].

Основные этапы передачи сигнала представлены на рис. 8.

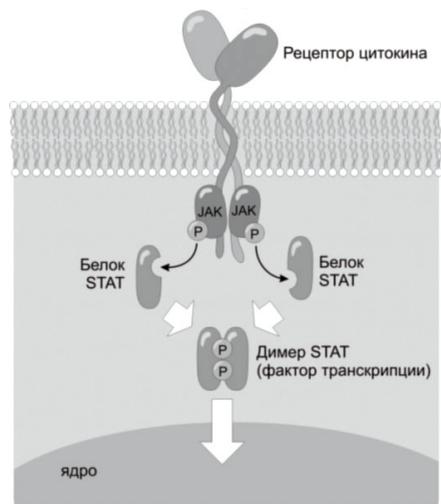


Рис. 8. Компоненты внутриклеточной передачи сигнала от цитокинов

Проведение сигналов с рецепторов к цитокинам отличается *быстротой*, что ожидаемо в соответствии с физиологическими функциями, зависящими от цитокинов (очень быстро, но не надолго).

Связывание цитокина со своими рецепторами вызывает фосфорилирование остатков тирозина и активацию Jak-тирокиназы (Janus kinase, названных так благодаря присутствию в одной молекуле двух киназных доменов), ассоциированных с рецепторами цитокинов. Система молекул Jak-STAT представлена четырьмя цитоплазматическими тирозин-киназами: Jak1, Jak2, Jak3 и Tyk2. Киназы Jak1, Jak2 и Tyk2 экспрессируются конститутивно во многих типах клеток, тогда как экспрессия киназы Jak3 индуцибельна и связана только с клетками гемопоэтического происхождения. Киназа Jak1 ассоциирована с внутриклеточными доменами специфичных субъединиц рецепторов из группы лигандов  $\gamma$ -цепи, тогда как сама  $\gamma$ -цепь ассоциирована с Jak3. Исключение из этого правила только одно: Jak3 также взаимодействует с  $\beta$ -цепью рецептора ИЛ-2 и ИЛ-15. Таким образом, Jak3 является единой сигнальной молекулой, связанной с общей  $\gamma$ -цепью нескольких рецепторов цитокинов. Однако Jak тирозинкиназы неактивны пока (аналогично рецепторам факторов роста) рецепторы не агрегируют под действием цитокинов. После агрегации происходит активация Jak за счет их фосфорилирования. Активированные Jak фосфорилируют множество тирозинов в цитоплазматической части рецепторов. Теперь к этим фосфотирозинам присоединяются молекулы белков, известных под общим названием белки STAT (signal transducers and activators of transcription).

Последующие события в передаче внутриклеточного сигнала связаны с молекулами STAT, впервые открытыми при изучении передачи сигнала от рецепторов IFN- $\alpha$ . Семейство цитоплазматических молекул STAT у млекопитающих состоит из 7 белков: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b и STAT6, взаимодействующих с фосфорилированными с участием Jak-цитокиновыми рецепторами. STAT находятся в цитоплазме клеток в неактивной форме в виде мономеров. Последующее фосфорилирование STAT приводит к их димеризации и транслокации в ядро, где они связываются с коактиваторами транскрипции, взаимодействуют с промотерными участками и регулируют экспрессию генов. Активация Jak1 и Jak3 приводит к фосфорилированию сигнальных молекул STAT5a и STAT5b, а также STAT1 и STAT3, участвующих в регуляции пролиферации и других функций лимфоцитов.

Разные киназы Janus и различные факторы транскрипции STAT «работают» при разных рецепторах для цитокинов.

Цитокины сами по себе неспецифичны по Аг, но их эффекты тем не менее реализуются в норме антигеннаправляемо. Так происходит потому, что в норме цитокины секретируются направленно в межклеточный синапс, формируемый между двумя взаимодействующими клетками. Формирование наиболее прочных синапсов происходит именно вокруг Рц лимфоцитов для Аг, связавших свои лиганды на АПК [8; 24; 26; 27].

### Вопросы ко 2-й главе

1. Охарактеризуйте семейства рецепторов цитокинов.
2. Охарактеризовать рецепторы интерферонового типа.
3. Для каких цитокинов характерно использование общей рецепторной цепи.
4. Дать характеристику растворимым рецепторам.
5. Составить схему передачи сигнала от ИЛ-4, -13.
6. Составить схему передачи сигнала от ИЛ-1, -6, ФНО $\alpha$ .
7. Система Jak/STAT.

## Глава 3. Полиморфизм цитокиновых генов. Методы исследования системы цитокинов

Основные вопросы:

1. Понятие полиморфизма, виды.
2. Примеры наиболее изученных полиморфных сайтов генов цитокинов.
3. Популяционные особенности распределения полиморфных сайтов генов цитокинов.
4. Биологическое значение. Ассоциация полиморфизма генов цитокинов с мультифакторными заболеваниями.
5. Методы исследования системы цитокинов.

### Понятие полиморфизма, виды

Генетическая вариабельность, ограниченная одним видом (например, *Homo sapiens sapiens*), получила название **генетического полиморфизма (ГП)**.

Ф.Фогелем и А. Мотульски дано следующее определение полиморфизма «Полиморфным называется менделевский (моногенный) признак, по которому в популяции присутствуют по крайней мере два фенотипа (и предположительно два генотипа), причем ни один не является редким, т. е. не встречается с частотой 1—2%». Геномы всех людей, за исключением однояйцевых близнецов, различны. Выраженные популяционные, этнические и, главное, индивидуальные различия геномов как в их смысловой части (экзоны), так и в их некодирующих последовательностях (межгенные промежутки, интроны и прочее) обусловлены различными мутациями, приводящими к ГП.

ГП может быть **качественным**, когда происходят замены нуклеотидов, либо **количественным**, когда в ДНК варьирует число нуклеотидных повторов различной протяженности. Тот и другой виды ГП встречаются как в смысловых (белок-кодирующих), так и во внегенных последовательностях молекулы ДНК [5].

Примеры полиморфных систем: Для человека первый описанный полиморфный признак — система групп крови АВО, другие системы антигенов крови, HLA система. В конце 1980-х — начале 1990-х годов было установлено, что гены цитокинов и их рецепторов в популяции человека характеризуются аллельным полиморфизмом. В это время появились первые работы по изучению полиморфизма генов цитокинов, широко представленных в различных районах (на длинных и коротких плечах) большинства хромосом человека.

### Виды полиморфизма

1. SNP (single nucleotide polymorphism), или полиморфизм по одному нуклеотиду, который связан с точечными заменами или микроделециями и инсерциями в геноме. SNP представляет собой нуклеотидный сайт, для которого показана высокая частота замещения в популяции между индивидуальными образцами. Большой заслугой комплекса работ по расшифровке генома человека явилось выявление ошибочных и не подтвержденных SNP (примерно 5% от числа известных), которые были отнесены к артефактам. SNP широко распространены — около 1,4 миллиона SNP в геноме человека.

В связи с широкой распространенностью SNP являются наиболее широко изучаемыми полиморфизмами промоторных регионов генов цитокинов и их рецепторов, исследуемых при популяционных исследованиях и при исследованиях ассоциативных связей с заболеваниями человека. Большинство аллельных вариантов по нуклеотидным заменам диморфны, то есть в популяции присутствует только два аллеля (норма и мутация).

2. Тандемные повторы. Геном человека содержит огромное число полиморфных локусов, значительная часть из которых представлена так называемыми тандемными повторами с изменяющимся числом копий. Этот класс полиморфных локусов условно разбит на два подкласса:

- 1) минисателлитов с длиной повтора семь и более нуклеотидов, часто называемых собственно тандемными повторами с изменяющимся числом копий (VNTRs — variable number of tandem repeats);
- 2) микросателлитов, у которых длина повторяющейся единицы составляет от 1 до 6 нуклеотидов, их также называют короткими тандемными повторами (STRs — short tandem repeats) [5].

Аллельный полиморфизм микро- и минисателлитов, в первую очередь, основан на различиях в числе тандемных повто-

ров, содержащихся в разных аллелях, то есть на полиморфизме «длины», нежели «последовательности». Обычно в популяции обнаруживается определенный спектр аллелей, отличающихся друг от друга по числу повторяющихся единиц, а у каждого человека имеется строго по два аллеля каждого полиморфного локуса равной (*гомозиготный* генотип) или разной (*гетерозиготный* генотип) длины [5]. Причем каждый вариант наследуется как простой кодоминантный признак [5]. Вероятно, в этом может проявляться механизм действия VNTR, когда гомозиготные состояния характеризуются определенными уровнями экспрессии белковых продуктов, а гетерозиготные представляют промежуточные варианты со средней активностью экспрессии пептидов.

Кроме того, есть полиморфизм, обусловленный инсерциями, делециями. Отличия в том, что мутация — это явление, возникшее *de novo*, полиморфизм — когда-то в процессе эволюции была мутация, но она закрепилась в популяции.

### Примеры наиболее изученных полиморфных сайтов генов цитокинов

Неконсервативные мутации внутри кодирующих регионов (экзонов) генов цитокинов достаточно редки, т. к. гены цитокинов и их рецепторов являются высококонсервативными структурами. Подобные мутации в кодирующих участках генов обуславливают отсутствие/отмену функций конечного экспрессируемого протеина или их изменение [12].

Консервативные (молчащие) мутации не затрагивают аминокислотную последовательность, но они могут влиять на экспрессию белка другими путями: например, могут изменять сплайсинг мРНК, стабильность мРНК, уровень транскрипции исследуемого гена [12].

Наиболее широко встречающиеся аллельные варианты образуются в результате мутаций некодирующих (интронных) областей генов. Они напрямую не изменяют аминокислотную последовательность и встречаются гораздо чаще и также могут иметь влияние на продукцию и функциональную активность белков. Это влияние может быть опосредовано через изменение функциональных сайтов, контролирующих транскрипцию, созревание и транспортировку соответствующих мРНК. Например, полиморфизм внутри 5'- и 3'-фланкирующих регуляторных районов или внутри интронов может оказывать существенное влияние на уровни трансляции, стабильности РНК и механизмы сплайсинга про-мРНК [5]. Например, полиморфизм VNTR ИЛ-1Ra образован последовательностью из 86 пар азотистых

оснований во втором интроне, которая и составляет единицу повтора, и в ней локализируются три потенциальных белок-связывающих сайта: IFN $\alpha$ -сайленсер А, IFN $\beta$  — сайленсер В и элемент остро-фазового ответа, поэтому предполагается, что количество повторов влияет на продукцию белка [12; 21; 23].

Большое количество аллельных вариантов генов цитокинов установлено именно для их промоторов — участков, ответственных за связывание РНК-полимеразы с ДНК, которые также отличаются друг от друга в основном по интенсивности экспрессии генов. Мутации в промоторах, влияя на уровень экспрессии контролируемого гена (генов), который находится под их контролем, тем не менее, не изменяют кодируемых генами продуктов. Влияние подобных полиморфизмов на транскрипцию осуществляется путем изменения структуры сайтов связывания транскрипционных факторов внутри промоторов генов (или структур энхансеров и сайленсеров внутри интронов). Наконец, подобный полиморфизм может изменять сайты присоединения пространственных факторов транскрипции в ядерном матриксе, что может изменить саму геометрию промоторов [12].

Раздел преимущественно составлен по данным международной базы данных Allele frequencies in worldwide populations, а также обзоров В. И. Коненкова, М. В. Смольникова (2003), М. V. Hollegaard (2006) [12; 38; 55].

На первой хромосоме человека в участке 1q31-32 локализован ген *ИЛ10*, содержащий 4 экзона. В результате секвенирования гена *ИЛ10* были выявлены полиморфные участки промотора этого гена, в том числе ИЛ10.G и ИЛ10.R из 5'-фланкирующего региона, различающиеся количеством СА-повторов. В 1997 году описаны шесть полиморфизмов гена *ИЛ10* в позициях -1082, -819, -652, -592, -127, -41 относительно транскрипционного сайта.

Кроме гена *ИЛ10* на первой хромосоме расположен ген макрофагального колониестимулирующего фактора (М-КСФ) в положении 1p13-p21, его ген содержит в себе 10 экзонов и для него до сих пор не описано полиморфных вариантов.

В участке 1q41 расположен ген одной из трех изоформ трансформирующего ростового фактора  $\beta$  (ТГФ  $\beta$ 2), содержащий семь экзонов. В 1993 году показано наличие четырех полиморфизмов по длине рестрикционных фрагментов (RFLP) в некодирующей части гена этого цитокина.

ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  кодируются двумя различными генами, содержащими по семь экзонов и расположенными на второй хромосоме в участках 2q13 и 2q13-q21, соответственно. В некодирующей части гена, в шестом интроне ИЛ-1 $\alpha$  показан по-

лиморфизм вариабельного числа tandemных повторов. Описаны динуклеотидные повторы в гене *ИЛ1 $\alpha$* . В промоторном регионе изучены аллельные варианты гена в участке -889, авторы показывают неравновесие по сцеплению между этим полиморфизмом и заменой Т+4345G в пятом экзоне. В промоторном регионе гена *ИЛ1 $\beta$*  показаны точечные замены Т-35С, G-511А и в кодирующей части гена описан полиморфизм в пятом экзоне (С+395 Для ИЛ-1 $\beta$  считается, что два из них могут влиять на продукцию белка: SNPs -511 и +3953. Генетическая гетерогенность ИЛ-1Ra определяется наличием полиморфизма типа VNTR во втором интроне и SNPs в точках +2017, +2072, +3600, +5111.

Установлено, что редкий аллель +2017 связан с аллельным вариантом 2г VNTR во втором интроне, такая же связь показана для редких аллелей других SNPs, кроме +51111. Во втором интроне содержится последовательность из 86 пар азотистых оснований, которая и составляет единицу повтора, и в ней локализируются три потенциальных белок-связывающих сайта: ИФН $\alpha$ -сайленсер А, ИФН $\beta$  — сайленсер В и элемент остро-фазового ответа, поэтому предполагается, что количество повторов влияет на продукцию белка [8; 23; 35].

На второй хромосоме в районе 2p11-2p13 локализован ген *ТФР $\alpha$* , он содержит шесть экзонов. Выявлен полиморфизм по длине рестрикционных фрагментов, связанный с наличием/отсутствием сайта рестрикции для *TaqI*.

На пятой хромосоме человека локализован целый кластер генов цитокинов, многие из которых имеют полиморфную структуру в различных участках. Здесь расположены гены *ИЛ3* (в позиции 5q23-31), *ИЛ4* (5q23-31), *ИЛ5* (5q23-31), *ИЛ9* (5q31-32), *ИЛ12В* (5q31-33), *ИЛ13* (между генами *ГМ-КСФ* и *ИЛ4*) и *ГМ-КСФ* (5q22-31).

Одним из самых полиморфных из этого списка является ген *ИЛ3*, содержащий пять экзонов.

Ген *ИЛ4* имеет протяженность около 10 кб и содержит 4 экзона. Его кодирующая последовательность высоко консервативна (характерный признак и для других цитокинов) — до сих пор не обнаружено ни одной мутации в экзонах *ИЛ4*. В то же время выявлено несколько точечных полиморфизмов в промоторной области гена (С-590Т, С-285Т, А-81G) и микросателлиты во втором и третьем интронах.

Ген *ИЛ5* картирован и секвенирован двумя независимыми группами. В настоящее время известна только одна его мутация — транзигция С-703Т в промоторной области.

Ген *ИЛ9*, длиной около 4 кб, локализован ближе к теломерному концу хромосомы по отношению к кластеру других

интерлейкинов и состоит из 5 экзонов. Полиморфизм гена *ИЛ9* представлен динуклеотидными повторами в некодируемой части. В другом исследовании найден вариант *ИЛ9*, связанный с заменой С на Т в позиции 338 экзона 5.

Ген второй субъединицы *ИЛ12* (р40, ИЛ12В) содержит восемь экзонов. В гене *ИЛ12В* показаны полиморфизмы во втором и четвертом интронах, не влияющие на аминокислотную последовательность белкового продукта, а также замена А→С для *TaqI* в 3'-нетранслируемом регионе (3'UTR) в позиции 1188.

Структура гена *ИЛ13* подобна генам *ИЛ3*, *ИЛ5*, *ИЛ4* и *ГМ-КСФ*, в нем содержится четыре экзона. Ген *ГМ-КСФ* содержит четыре экзона, о его полиморфизме данных в литературе пока нет.

Ген фактора некроза опухолей  $\alpha$  ( $\text{ФНО}\alpha$ ) локализован в третьем классе генов главного комплекса гистосовместимости между HLA-B и HLA-DR. Ген  $\text{ФНО}\alpha$  является, пожалуй, одним из самых полиморфных генов цитокинов. Его промоторно-энхансерная область содержит от 9 до 13 полиморфных сайтов типа SNPs, наиболее известными среди которых являются транзиции G/A в точках -376, -308, -238, -163; транзиция T/C и C/T в сайтах -1031, -857, и трансверсия C/A -863. Кроме того, транскрибируемая часть гена содержит полиморфизмы типа SNP (+70, +467, +488, +851, +943, +1304) и микросателлиты.

Транскрипционная регуляция гена  $\text{ФНО}\alpha$  представляет собой сложный процесс, в который вовлечены промоторный регион и сайты связывания с белками-регуляторами (консенсусный  $\kappa\text{B}$  элемент, GC box/Sp-1 связывающий сайт, «Y-box» — подобная десятинуклеотидная последовательность, cAMP — отвечающий элемент и сайты связывания для AP-1, AP-2). Промотор гена TNF $\alpha$  содержит четыре элемента или потенциальных сайтов связывания для универсального во многих типах клеток транскрипционного фактора NF- $\kappa\text{B}$ . Самые сильные сайты располагаются в точках -510 ( $\kappa\text{B3}$ ) и -810 ( $\kappa\text{B1}$ ), слабые — -655 ( $\kappa\text{B2}$ ) и -210 ( $\kappa\text{B4}$ ). К настоящему времени нет единого мнения относительно функциональной значимости полиморфных сайтов в гене  $\text{ФНО}\alpha$ : в одних работах показано влияние SNPs промоторной области на транскрипцию белка  $\text{ФНО}\alpha$ . Замены в точках -1031, -863, -857, -376 -308 повышают экспрессию, а замена в -238 наоборот снижает. Предполагается, что два SNPs -308 и -238 ассоциированы друг с другом: аллель -308\*А встречается с -238\*G, а аллель -308\*G сочетается с -238\*А. Вероятно, -308 и -238 взаимодействуют с SNP-376, в связи с чем, могут не обладать функциональной значимостью, но формируя в гаплотипы, оказывающие влияние на транскрипцию гена  $\text{ФНО}\alpha$ : -238\*G-308\*А-376\*G — повышающий, -238\*А-308\*G-376\*А —

снижающий продукцию. В  $\text{ФНО}$  локусе располагаются микросателлиты:  $\text{ФНО}\alpha$ ,  $\text{ФНО}\beta$ ,  $\text{ФНО}\gamma$ ,  $\text{ФНО}\delta$ ,  $\text{ФНО}\epsilon$ . Все эти полиморфные сайты создают аллельные варианты с высокими показателями встречаемости (больше 1%) в популяции и предположительно влияют на экспрессию  $\text{ФНО}\alpha$ , и как следствие могут быть связаны с восприимчивостью к различным мультифакторным и инфекционным заболеваниям [13; 17; 22; 29; 31; 38].

На седьмой хромосоме в регионе 7p21-p14 расположен ген *ИЛ6*, содержащий пять экзонов. Наиболее изученным является полиморфизм G-174C промотора этого гена [38].

Восьмая хромосома содержит ген *ИЛ7* в участке 8q12-q13, который не характеризуется своей полиморфностью, в отличие от генов интерферонов, два из которых ( $\text{ИФН}\alpha$  и  $\text{ИФН}\beta$ ) по соседству друг от друга локализованы на девятой хромосоме в 9p22. Для гена  $\text{ИФН}\alpha$  описан полиморфизм динуклеотидных повторов в некодирующей части, а для  $\text{ИФН}\beta$  — RFLP для *MspI* в 3'-нетранслируемой части гена.

Ген  $\text{ИФН}\gamma$  локализован на двенадцатой хромосоме в участке 12q24.1 и содержит пять экзонов. Показан полиморфизм СА-повторов в первом интроне гена  $\text{ИФН}\gamma$  — пока единственный описанный для этого важного интерферона полиморфизм.

На четырнадцатой хромосоме в районе 14q24 локализован ген третьей изоформы *ТФР $\beta$ 3*, который, в отличие от первых двух, высококонсервативен.

И, наконец, на девятнадцатой хромосоме локализованы гены *ИЛ11* (19q13.1-13.4) и одна из изоформ *ТФР $\beta$ 1* (19q13). Для гена *ИЛ11* характерен полиморфизм СА-динуклеотидных повторов в 5'-некодирующей последовательности. Ген *ТФР $\beta$ 1* имеет несколько полиморфных участков в нетранслируемой области и в промоторном регионе (-988, -800, -509), а также описаны замены в 869, 915, 72, 713, 788 нуклеотидах гена, считая от первого АТГ кодона.

Таким образом, мы с вами познакомились с примерами генетической организации генов основных цитокинов.

Зачем необходимо изучать генетический полиморфизм цитокинов?

Действие цитокинов, как участников сложной сети усложняет анализ функций отдельно взятых индивидуальных цитокинов, влияние полиморфизма их генов на развитие иммунного ответа. Известно, что существуют значительные индивидуальные различия в продукции цитокинов. Различия между максимальным и минимальным уровнями продукции некоторых цитокинов часто достигают десятикратных величин, и эти показатели постоянны в разные промежутки времени.

С помощью изучения аллельного полиморфизма генов делаются попытки определить генетическую основу межиндивидуальных различий в иммунном ответе путем определения взаимосвязи между индивидуальными полиморфными аллелями, или гаплотипами генов цитокинов и продукцией белкового продукта *in vitro*. Результатом таких работ является выявление отдельных аллелей генов, ассоциированных с повышенной, либо пониженной продукцией соответствующего цитокина. Как уже отмечалось выше, на уровень продукции отдельного цитокина может оказывать влияние полиморфизм, как в кодирующей части, так и в интронном или промоторном участках его гена.

Изучив достаточное количество кандидатных генов, можно выделить определенные генетические профили полиморфных генов цитокинов. Например, индивиды с вариантами генов, отвечающими за высокую продукцию ИФН $\gamma$ , высокое содержание ФНО $\alpha$  и низкое — ИЛ-10 и ТФР $\beta$ 1, имеют ассоциацию с воспалительными процессами. Такие генотипы имеют функциональную важность, т. к. дают возможность объяснить индивидуальную восприимчивость ко многим аутоиммунным, инфекционным заболеваниям.

Исследования полиморфизма генов цитокинов в их связи с продукцией соответствующего белка является актуальным вопросом в изучении функционирования цитокиновой сети при иммунном ответе организма на антиген. С помощью этого подхода можно понять межиндивидуальные различия в реагировании и работе иммунной системы, возникающей на внешние и внутренние стимулы [2; 3; 5; 12].

### **Популяционные особенности распределения полиморфных сайтов генов цитокинов**

Важнейшей характеристикой популяции являются частоты аллелей и генотипов, обычно в популяции обнаруживается определенный спектр аллелей различных генов, а генофонд популяции воплощается в значениях частот генотипов. Исследования генетического компонента популяции позволяют определить иммуногенетический профиль той или иной популяции и установить ее специфические особенности.

В настоящее время установлено, что для многих полиморфных сайтов генов цитокинов характерны межпопуляционные различия.

В частности для полиморфизма в различных точках промотора гена ФНО $\alpha$  предполагается, что различия в распределении аллелей в разных этнических группах неслучайны и могут быть связаны с эволюцией человека. Такая гипотеза выдвинута группой ученых во главе с А. Ваена, которые в своем

исследовании показали различия в распределении SNPs ФНО $\alpha$ . Одновременное присутствие аллелей с заменами в большинстве полиморфных сайтов ФНО $\alpha$  у представителей Малави, Нигерии и афро-американцев, по сравнению с европеоидами и монголоидами Камбоджи и американскими индейцами. Эти данные свидетельствуют в пользу гипотезы происхождения человека «из Африки» и согласуются с данными анализа митохондриальной ДНК [31].

Среди SNPs полиморфизмов гена ФНО $\alpha$  полиморфный сайт -308 G/A обладает наибольшими различиями между популяциями: частота аллеля с заменой -308\*A выше в европеоидных популяциях, по сравнению с монголоидными и популяциями латиноамериканского и африканского происхождения [29]. А в популяциях американских индейцев, например Чачи, проживающих на Эквадоре, и Пима в Аризоне, редкий аллель -308\*A не обнаруживался [31].

Таким образом, данные по распределению SNPs в африканских и неафриканских популяциях могут пролить свет на демографическую историю ФНО локуса, и на представления о селективном преимуществе или недостатках определенных аллелей ФНО $\alpha$  в отношении различных заболеваний [31].

Одним из объяснений различий в частотах встречаемости полиморфизма -308 G/A ФНО $\alpha$  между популяциями является тот факт, что редкий аллель -308\*A входит в состав расширенного анцестрального европейского гаплотипа АН 8.1. (HLA-A\*01, В\*08, ФНО $\alpha$  (-308), BfS, C4AQ0, C4B1, DRB1\*03, DQA1\*05:01, DQB1\*02:01), который характеризуется генетически обусловленной гиперпродукцией цитокина и, с одной стороны, способствует устойчивости носителей гаплотипа к инфекционным заболеваниям, а с другой — обуславливает развитие более 30 аутоиммунных патологий [13; 29; 41].

Основные частоты SNP ФНО $\alpha$  в европеоидных и монголоидных популяциях представлены в таблице 4 (данные взяты из базы данных «Allele frequencies in worldwide populations» [55] и исследования Д. С. Сташкевич [3; 23]).

Таблица 5

Генотипы SNPs -1031, -863, -857, -308, -238 ФНО $\alpha$   
в различных популяциях мира, %

| SNP  | генотип | шведы<br>А. М. | европеоиды<br>Нидер-<br>ландов | корейцы | японцы | Русские<br>ЧО | Башкиры<br>ЧО |
|------|---------|----------------|--------------------------------|---------|--------|---------------|---------------|
| -238 | AA      | 0,07           | 0                              | 0,3     | 0      | 0             | 1,08          |
|      | GA      | 8,1            | 9,5                            | 5,2     | 4,0    | 7,98          | 17,2          |
|      | GG      | 91,8           | 90,5                           | 94,5    | 96,0   | 92,02         | 81,72         |
| -308 | AA      | 3,2            | 4,5                            | 0,8     | 0      | 1,4           | 2,15          |
|      | GA      | 27,5           | 38,6                           | 16,9    | 2,8    | 23,9          | 20,4          |
|      | GG      | 69,3           | 56,6                           | 82,3    | 97,2   | 74,7          | 77,4          |

В исследовании иммуногенетического профиля популяций русских и башкир Челябинской области по генам основных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-4, проведенном на кафедре микробиологии, иммунологии и общей биологии с 2005 по 2009 гг. Показаны межпопуляционные различия в распределении следующих вариантов генов: ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-4, -238 SNP G/A ФНО $\alpha$ . У башкир аллель -238\*A ФНО $\alpha$ , ответственный за снижение экспрессии ФНО $\alpha$ , встречается чаще, чем у русских, кроме того, повышена частота гетерозиготного генотипа, по сравнению с русскими. Полученные данные подтверждаются другими исследованиями.

Для генов кластера ИЛ-1 межпопуляционные различия свойственны +3953C/T ИЛ-1 $\beta$  между европеоидными и монголоидными популяциями, как видно из таблицы 6, у представителей монголоидных популяций преобладает генотип C/C, связанный со средним уровнем продукции ИЛ-1, а европеоиды характеризуются повышенными частотами аллеля с заменой +3953T ИЛ-1 $\beta$  и его гетерозиготного генотипа.

Таблица 6

Распределение генотипов +3953ИЛ-1 $\beta$   
в различных популяциях мира

| генотипы | Французы,<br>А. Santagrel | Швейцарцы,<br>S. Geneva | Итальянцы,<br>B. Tolusso | Голландцы,<br>E. L. Kaijef | Китайцы,<br>C-G. You | Китайцы,<br>C-M. Huang | Японцы,<br>Y. Soga | Индусы,<br>P. K. Manchanda | Русские, Новосибирская<br>обл., О.А. Герцог | Телеуты, Южной Сибири,<br>А. В. Шабалин | жители Башкирии, Россия |
|----------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------|------------------------|--------------------|----------------------------|---|---|-------------------------|
| ТТ       | 4,7                       | 5                       | 5,6                      | 6,1                        | 0,6                  | 0                      | 0                  | 14,5                       | 4   | 5,15                                    | 5                       |
| СТ       | 32,0                      | 33                      | 32,6                     | 30,2                       | 4,4                  | 4,9                    | 6,2                | 61,2                       | 37,3  | 26,80                                   | 49                      |
| СС       | 63,3                      | 62                      | 61,8                     | 63,7                       | 95                   | 95,1                   | 93,8               | 24,3                       | 58,7  | 68,04                                   | 46                      |

Для VNTR ИЛ-1 $\alpha$  разнообразие частот аллелей и генотипов еще выше за счет существования редких аллелей, в связи с чем возникают различия и внутри популяций. В целом у монголоидов ниже частота аллеля с двухкратным повтором (2R), предположительно повышающего уровни ИЛ-1, по сравнению с европеоидами [35; 55].

В исследовании Сташкевич Д.С. получено, что для гена ИЛ-4 характерны сильные межпопуляционные различия: у башкир повышена частота аллеля с двухкратным повтором (2R) за счет накопления гомозиготного генотипа 2r/2r и гетерозиготного генотипа 3r/2r. В то время как у русских чаще встречается аллель с трехкратным повтором (3R), в свое гомозиготном состоянии 3r/3r. Распределение генотипов ИЛ-4 у русских сходно с частотами генотипов у европеоидных популяций. Для монголоидных популяций в целом характерно накопление генотипов, несущих аллель 2R. Количество гетерозигот 3r/2r в группе башкир приближается к таковому в выборке японцев. Для китайцев характерна самая высокая частота 2r/2r генотипа [3; 23].

Подводя итог всему сказанному, можно сделать вывод, что наследование полиморфных аллелей генов цитокинов сильно зависит от этнической принадлежности и может влиять на предрасположенность или устойчивость к аутоиммунным

и инфекционным заболеваниям и предопределять вариабельность течения патологических процессов и исход болезней.

Только изучая вариации в человеческом геноме, мы можем расширить наши знания о том, почему некоторые люди имеют предрасположенность к развитию того или иного заболевания, почему люди по-разному отвечают на различные фармацевтические препараты. Наиболее дискуссионными данными в настоящее время являются знания о генетических вариациях между различными этническими группами и внутри популяций человека. В настоящее время ясно, что «паттерны» генетических различий в современных человеческих популяциях, включая вариации, влияющие на развитие заболеваний, являются результатом многих эволюционных событий, понимание этих процессов может помочь исследователям в идентификации генов-кандидатов в развитии мультифакторных и других заболеваний.

#### **Ассоциация полиморфизма генов цитокинов с мультифакторными заболеваниями**

Существующие на сегодня данные позволяют предположить, что полиморфные гены цитокинов способны принимать активное участие в формировании специфического иммунного ответа на патологические состояния человека. При этом отдельные аллельные варианты могут быть ассоциированы с уровнем продукции соответствующего белкового продукта, что тоже оказывает влияние на характер течения, возникновение определенных осложнений заболеваний. В то же время пока не ясно, какие именно мутации и каких цитокинов имеют решающее значение в развитии отдельных заболеваний. Вероятно, что большую роль играют не столько отдельные аллели генов, сколько их сочетания. Поэтому, перспективными направлениями молекулярно-генетических исследований являются изучение вкладов конкретных аллелей в подверженности к развитию патологии и инфицированию; расширение патогенетически важных количественных иммунологических признаков для оценки плейотропных эффектов анализируемых генов.

Исследования ассоциации генетического полиморфизма цитокинов и различных заболеваний ведутся по всему миру (GWAS). Последние 20—25 лет интенсивно ведутся работы по изучению полиморфизма генов цитокинов, и ряда других генов с различными мультифакторными заболеваниями. Первая международная база данных была опубликована в журнале *Genes and Immunity* (1999 г.) с последующими обновлениями в 2001 и 2002 гг. и содержала сведения о функциональных полиморф-

ных сайтах в генах цитокинов и их ассоциации с различными заболеваниями.

На сегодняшний момент времени актуальная информация по характеристике полиморфных сайтов генов цитокинов, их распределении в мировых популяциях представлена в международном проекте «Allele frequencies in worldwide populations» [55].

Рассмотрим примеры ассоциации генетического полиморфизма с различными заболеваниями.

**Ревматоидный артрит (РА)** — сложнаследуемое мультифакторное заболевание с неизвестной этиологией. Ревматоидный артрит (РА) — яркий пример неинфекционного заболевания, где целый ряд цитокинов играет существенную роль в развитии тканевого воспаления и формировании клинических симптомов поражения суставов.

Наибольшее значение в иммунопатогенезе РА имеют следующие группы провоспалительных цитокинов: цитокины семейства ИЛ-1 (ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-18 и, вероятно, ИЛ-36); цитокины семейства ФНО, ИЛ-6, цитокины, продуцируемые Тх17, прежде всего ИЛ-17А и ИЛ-17F, определяющие тип развития тканевого воспаления и запускающие синтез ИЛ-1 и ФНО.

Перечисленные цитокины самостоятельно либо посредством индукции синтеза других медиаторов активируют функциональную активность всех типов клеток, участвующих в развитии воспаления и поражения суставов.

В исследовании, проведенном на кафедре микробиологии, иммунологии и общей биологии в 2009 г. установлено:

1. Гетерозиготный генотип С/Т полиморфного сайта +3953 ИЛ-1 $\beta$  является протекторным для развития РА у башкир и входит в комбинацию генов ИЛ-1 $\beta$  — ИЛ-4, ассоциированных с устойчивостью к РА.

2. У русских гетерозиготный генотип С/Т +3953 ИЛ-1 $\beta$  является маркером неблагоприятного признака — раннего возраста начала РА (OR = 3,17; 95% ДИ 1,19×8,45), и входит в комбинацию генотипов ИЛ-1 $\beta$  — ИЛ-4, определяющих чувствительность к РА у женщин.

3. Гомозиготный генотип 3г/3г VNTR ИЛ-4 способен образовывать комбинации с различными генотипами ИЛ-1 $\beta$ , и эти вариации межгенных взаимодействий имеют различную ассоциацию с РА в одной и той же популяции: у башкир — комбинация С/С — 3г/3г проявляет себя как предрасполагающая к развитию РА, а С/Т — 3г/3г — ассоциирована с устойчивостью к РА [23].

### Сепсис

Несмотря на значительные достижения современной медицины, сепсис продолжает оставаться заболеванием, в лечении которого не достигнуто серьезных успехов. В основе патогенеза сепсиса лежит воспалительная реакция на инфицирование микроорганизмами.

В исследовании Е. П. Кузминой, проведенном на кафедре микробиологии, иммунологии и общей биологии в 2013 г. установлены общие особенности экспрессии генов основных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ФНО $\alpha$ , ИФН $\gamma$ , ИЛ-6, ИЛ-10. В группе ожоговых больных важными факторами, определяющими предрасположенность/устойчивость пострадавших к развитию сепсиса, являются полиморфные варианты генов ИЛ-1 $\rho$ а и TLR 2. Маркеры предрасположенности: генотипы 2г/2г и 4г/5г гена ИЛ-1 $\rho$ а; аллель \*753A и генотип G/A гена TLR 2. Протекторный эффект на развитие сепсиса оказывают: генотип 2г/4г гена ИЛ-1 $\rho$ а, аллель \*753G и генотип G/G гена TLR2. Осложненное течение сепсиса у ожоговых больных ассоциировано с наличием гетерозиготности гена ИЛ-10 в точке -819 и гаплотипа GTA гена ИЛ-10 -1082/-819/-592, что может выступать в качестве маркеров предрасположенности к развитию сепсиса с синдромом полиорганной недостаточности. На ранних сроках развития ожоговой болезни (с 3 по 17 сутки после травмы) происходят изменения в экспрессии генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов: снижение экспрессии генов цитокинов ИЛ-6, ИФН $\gamma$  и одновременное повышение экспрессии генов цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ФНО $\alpha$ , ИЛ-10. Предиктивными показателями развития сепсиса с синдромом полиорганной недостаточности и неблагоприятного исхода у ожоговых больных на 10—17 сутки можно считать пониженную экспрессию генов HLA-DRA, -DMA, ИФН $\gamma$  и повышенную экспрессию генов ФНО $\alpha$ , TLR 2, TLR 4 и TREM-2 [14].

### Туберкулез легких

Туберкулез (ТБ) является одной из постоянных глобальных проблем здоровья населения планеты. Несмотря на широкомасштабную вакцинацию, использование современных лекарственных препаратов и осуществление национальных и международных программ контроля за туберкулезом ежегодно в мире регистрируется 10 млн новых случаев первичного туберкулеза и около 1,7 млн смертей в год. Более того, по данным статистических исследований, 1/3 населения Земли инфицирована *M.tuberculosis* и только 10% от всех инфицированных демонстрируют прогрессию к активным формам туберкулеза.

В исследовании, проведенном на кафедре микробиологии, иммунологии и общей биологии в 2014 г. установлен вклад полиморфизма цитокинов в предрасположенность и клинические формы туберкулеза легких:

1. Конкретный клинический фенотип туберкулеза легких ассоциируется с определенной прописью частот генов системы HLA: фиброзно-кавернозный — отсутствие генов DRB1\*07 и DQA1\*02:01, высокая частота — В\*08 и DRB1\*03, по сравнению с очаговым и инфильтративным; очаговый — отсутствие В\*08 и низкая частота DRB1\*03 по сравнению с фиброзно-кавернозным, высокая частота В\*15, DRB1\*15, DQB1\*06:02-8 по сравнению с инфильтративным.

2. Для больных с активным туберкулезом легких характерна высокая частота встречаемости низкопродуктивного аллеля ФНО $\alpha$ (-238)\*A, генотипа ФНО $\alpha$ (-238)\*G/A и гаплотипа ФНО $\alpha$ (-308)\*G-ФНО $\alpha$ (-238)\*A, и низкая частота среднепродуктивного аллеля — ФНО $\alpha$ (-238)\*G и его гомозиготного генотипа ФНО $\alpha$ (-238)\*G/G по сравнению с контрольной группой.

3. Наличие провоспалительных цитокиновых генотипов является отличительной чертой фиброзно-кавернозной и инфильтративной (распространенный вариант) клинических форм: высокие частоты высокопродуктивных гена ФНО $\alpha$ (-308)\*A, генотипа ФНО $\alpha$ (-308)\*G/A и генотипа ИЛ-1 $\beta$ (+3953)\*T/T (только для фиброзно-кавернозной формы).

4. У русских Челябинской области маркерами потенциального риска развития активного туберкулеза легких и его тяжелых клинических (фиброзно-кавернозная, инфильтративная в фазе распада, экссудативный плеврит) форм можно считать гаплотипы, в состав которых входит аллель ФНО $\alpha$ (-308)\*A: HLADRB1\*16-ФНО $\alpha$ (-308)\*A и анцестральный аутоиммунный европейский гаплотип AN 8.1 [2].

### Воспалительные заболевания кишечника

Неспецифические воспалительные заболевания кишечника (НВЗК) — болезнь Крона, неспецифический язвенный колит — представляют одну из наиболее серьезных и нерешенных проблем в современной гастроэнтерологии. Генами кандидатами НВЗК являются гены цитокинов, среди которых наиболее вероятными являются гены семейства ИЛ-1 (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-1 $\rho$ а, ИЛ-18, ФНО $\alpha$ ). В настоящее время результаты исследований генетической составляющей НВЗК противоречивы [4].

**Болезнь Крона (БК)** — хроническое рецидивирующее заболевание желудочно-кишечного тракта неясной этиологии, характеризуется трансмуральным, сегментарным, гранулематозным

воспалением с развитием местных и системных осложнений. Классическим геном восприимчивости к БК, согласно литературным данным, является ген NOD2 (CARD15), белковый продукт которого отвечает за активацию нуклеарного фактора (NF- $\kappa$ B), регулирующего экспрессию цитокинов. Многочисленные исследования показывают ассоциацию между носительством определенных аллельных вариантов генов ИЛ-18, ФНО $\alpha$  с предрасположенностью к болезни Крона [43]. В качестве примера приведем результаты исследования новосибирских ученых, изучавших взаимосвязь полиморфизма -308 G/A ФНО $\alpha$  с восприимчивостью к воспалительным заболеваниям кишечника [4]. У больных с БК генотип А/А встречается в 7,7 и аллель А в 2,2 раза чаще, чем в популяции ( $p = 0,000$  и  $p = 0,004$  соответственно), что дает основания предположить вклад именно этого генотипа в развитие заболевания. За счет группы пациентов с БК у больных с ВЗК в целом частота аллеля -308\*А оказалась в 1,7 раза выше, чем в популяции ( $p = 0,018$ ). Носительство генотипа G/G, наоборот, является протективным в отношении БК: OR = 0,43 (95% CI 0,24—0,77,  $p = 0,01$ ). Таким образом, при анализе —G308A полиморфизма гена ФНО- $\alpha$  у больных с ВЗК в Новосибирске выявлено увеличение частоты генотипа А/А и аллеля А при болезни Крона.

**Неспецифический язвенный колит.** Неспецифический язвенный колит (НЯК) является хроническим, рецидивирующим, иммунологически опосредованным воспалительным заболеванием, которое входит в группу воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). Согласно сложившейся в настоящее время рабочей гипотезе в основе патогенеза НЯК лежит неадекватный иммунный ответ слизистой кишечника на кишечную микрофлору у генетически восприимчивых индивидуумов.

НЯК-ассоциированными генами являются несколько групп:

- 1) белковые продукты генов обеспечивают поддержание целостности эпителиального барьера (например, ESM1, CN1, MDR1 и так далее);
- 2) белковые продукты генов обеспечивают распознавание антигенных образцов (NLRs, TLRs);
- 3) белковые продукты генов участвуют во врожденном и адаптивном иммунном ответах (например, ФНО $\alpha$ , ИЛ-10, ИЛ-12в, STAT3 и другие);
- 4) белковые продукты генов обеспечивают привлечение лейкоцитов (например, ICAM-1, MAdCAM-1, CXCLs, CCRs) [46].

В качестве примера можно привести результаты исследования, проведенного в 2016 году на кафедре микробиологии, иммунологии и общей биологии ЧелГУ.

Был проведен сравнительный анализ распределения частот аллелей, генотипов и комбинаций генотипов генов основных провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$  у больных неспецифическим язвенным колитом (НЯК) и здоровых лиц русской популяции Челябинской области. Установлено снижение частоты аллеля с заменой +3953\*Т IL-1 $\beta$  у больных НЯК. В доминантной модели наследования аллель дикого типа +3953\*С ИЛ-1 $\beta$  в гомозиготной форме чаще встречается у больных НЯК, и вероятно может влиять на предрасположенность к данной патологии. Показаны маркерные комбинации генотипов для неспецифического язвенного колита: ИЛ-1 $\beta$  +3953СС-ИЛ-6 -174 GG, ФНО $\alpha$  -308 GG — ИЛ-6 -174 CC. Выявлено снижение носительства комбинации генотипов ИЛ-1 $\beta$  +3953 TC — ИЛ-6 -174 CC у больных НЯК [22].

Исследования по всему миру очень часто изучают генетический компонент БК и НЯК совместно с целью выделения общих паттернов генов белковые продукты, которых вовлечены в патогенез НВЗК, и аллельных вариантов генов и их комбинаций, которые могут послужить диагностическими маркерами данных патологий.

**Синдром раздраженного кишечника.** Сегодняшние представления о патофизиологии СРК позволяют предположить, что в основе запуска или усиления патологического процесса лежит комбинация факторов — недостаточная или избыточная активация иммунной системы и дисбиоз кишечника. Участие цитокинов в патофизиологических процессах при СРК подтверждают данные лабораторных исследований: снижена экспрессия иммунорегуляторных цитокинов и повышена экспрессия провоспалительных цитокинов [21].

Группой исследователей биологического факультета ЧелГУ и ЮУГМУ показаны следующие особенности иммуногенетического статуса больных синдромом раздраженного кишечника:

1. Маркерами предрасположенности к СРК у русских Челябинской области являются: генотип -592С/А и гаплотип -819\*С-592\*А ИЛ-10, а маркер устойчивости — генотип -592С/С ИЛ-10.

2. Установлены маркеры предрасположенности к СРК среди генов цитокинов в зависимости от гендерной принадлежности: +3953 SNP ИЛ-1 $\beta$  в предрасположенности к СРК у женщин; у мужчин, больных СРК выявлены различия в частотах встречаемости аллелей и генотипов ИЛ-1Ра.

3. Носительство генотипа 2R/2R IL-1Ra может являться маркером атрофических изменений слизистой кишечника и повышать вероятность развития тревожного синдрома у боль-

ных СРК. Частота генотипа 4R/4R IL-1Ra снижена у больных СРК с клиническим вариантом «запор» и с тревожным синдромом.

4. Носительство межгенной комбинации: IL-1b+3953 C/C — -863C/C TNFa может повышать; а комбинации SNPs IL-1-b+3953 C/C — -863C/A TNFa; TNFa -308G/G — -863 C/A — снижать вероятность развития СРК [20; 21].

Приведенные примеры позволяют предположить, что подробное изучение полиморфной структуры цитокиновой сети, расшифровка механизмов регуляции функциональной активности клеток иммунной системы и генетического контроля иммунного ответа поможет исследователям в процессах разработки критериев предрасположенности и резистентности человека к развитию патологических состояний.

### Методы оценки системы цитокинов

В учебном пособии коллектива авторов Л. В. Ковальчука, Г. А. Игнатъевой, Л. В. Ганковской подробно представлен подход к анализу системы цитокинов, состоящий из следующих этапов:

#### 1. Оценка клеток-продуцентов

этот раздел состоит из следующих этапов:

— определение экспрессии:

- рецепторов, распознающих патоген или антиген (Т-клеточный рецептор, толлподобные рецепторы) на уровне генов и молекулы белка (ПЦР, метод проточной цитофлюориметрии);
  - адаптерных молекул, проводящих сигнал, запускающий транскрипцию цитокиновых генов (ПЦР и ее модификации);
  - генов цитокинов (ПЦР и ее модификации); белковых молекул цитокинов;
- количественное определение субпопуляций клеток, содержащих те или иные цитокины: Th1, Th2, Th17 (метод внутриклеточного окрашивания цитокинов); определение количества клеток, секретирующих определенные цитокины (метод ELISPOT).

#### 2. Оценка цитокинов и их антагонистов в биологических средах организма:

- тестирование биологической активности цитокинов;
- количественное определение цитокинов с помощью ИФА;
- иммуногистохимическое окрашивание цитокинов в тканях;

— определение соотношения оппозитных цитокинов (про- и противовоспалительных), цитокинов и антагонистов рецепторов цитокинов.

#### 3. Оценка клеток-мишеней

- определение экспрессии рецепторов цитокинов на уровне генов и белковых молекул (ПЦР, метод проточной цитофлюориметрии);
- определение сигнальных молекул во внутриклеточном содержимом;
- определение функциональной активности клеток-мишеней [10].

Приведем краткую характеристику групп методов оценки системы цитокинов:

Молекулярно-биологические методы могут использоваться для оценки экспрессии генов цитокинов в клетках продуцентах, экспрессии генов рецепторов, адаптерных молекул, а также полиморфизм указанных генов.

Наиболее распространенные молекулярно-генетические методы анализа полиморфизма системы цитокинов представлены в табл. 7 [5; 16].

Таблица 7

### Молекулярно-биологические методы определения системы цитокинов

| № | Название метода   | Краткая характеристика  |
|---|---|---|
| 1 | Аллель-специфическая ПЦР                                  | Самый простой способ анализа — в основе лежит репликация искомого участка ДНК (амплификация) <i>in vitro</i> . Основана на использовании двух самостоятельных пар праймеров (затравок) к конкретному участку гена. Один праймер является общим, а два других комплементарны: один — к «нормальной» последовательности ДНК (аллел дикого типа), второй — к «мутантной» последовательности ДНК (аллель с заменой, мутантный). Результатом является наличие или отсутствие аллеля при электрофоретической схеме детекции (рисунок 15). |
| 2 | Полиморфизм длин амплификационных фрагментов (AFLP, ПДАФ) | Данный метод позволяет идентифицировать аллели, различающиеся между собой по длине на один повтор (и даже на 1 нуклеотид), точно определять размеры аллелей. Состоит из этапов: ПРЦ-амплификация, обработка ампликонов эндонуклеазой рестрикции, детекция — электрофорез (рис. 12, 13, 14).   |

| № | Название метода   | Краткая характеристика  |
|---|---|---|
| 3 | Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP, ПДРФ) | Данный метод основан на прямой амплификации с последующей обработкой эндонуклеазами рестрикции.   |
| 4 | Методы, основанные на лигазной реакции (LDL)            | Ферментативная реакция, осуществляемая <i>in vitro</i> с помощью термостабильной ДНК-лигазы на матрице ДНК с использованием двух олигонуклеотидных ДНК-затравок, сплошь комплементарных нуклеотидной последовательности ДНК-мишени.   |
| 5 | ПЦР в реальном времени                                  | Осуществляемая <i>in vitro</i> репликация нуклеиновых кислот, но детекция результатов проводится непосредственно во время протекания реакции. Чаще всего используется резонансное тушение флуоресценции в Taqman системе, позволяющее контролировать кинетику ПЦР-амплификации.   |
| 6 | ПЦР с обратной транскрипцией                            | Постановке ПЦР предшествует получение комплементарной ДНК. Важным условием является наличие экспрессии гена. На первом этапе из биологического материала выделяется мРНК, проводится обратная транскрипция (образование ДНК на матрице РНК под действием фермента обратной транскриптазы). Затем полученная кДНК подвергается амплификации и детекции (электрофорез, секвенирование).   |
| 7 | Секвенирование  | Определение последовательностей нуклеиновых кислот.<br><b>Основные виды:</b><br>1. Секвенирование первого поколения (химическая деградация — метод Максама — Гилберта; остановка полимеразы на дидезокси-нуклеотидах — метод Сенгера).<br>2. Секвенирование второго поколения — коммерческие технологии высокопроизводительного секвенирования, основанные на разных принципах, но требующие получения сигнала от множества одинаковых молекул ДНК<br>3. Секвенирование третьего поколения — способны регистрировать сигнал от единственной молекулы нуклеиновой кислоты, например секвенирование через нанопоры. |

| №  | Название метода   | Краткая характеристика  |
|----|---|---|
| 8  | Гибридизация <i>in situ</i>                                 | Данный метод используют для выявления специфических мРНК в образце ткани. Он позволяет установить пространственно-временные особенности экспрессии генов в клетках и тканях.<br>Метод включает: замораживание органа, приготовление криостатных срезов, фиксацию параформальдегидом, выявление мРНК с помощью меченной кДНК.  |
| 9  | Метод масс-спектрометрии                                    | Относится к тонким физическим методам, основан на измерении отношения массы заряженных частиц к их заряду. В качестве матрицы, выступают молекулы ДНК, в которых любые изменения, например аллельные варианты, приводят к изменению массы.  |
| 10 | Метод ДНК-чипов   | Биочипы, в отличие от технологий ПЦР в реальном времени или массспектрометрии, позволяют анализировать множество мутаций у одного человека одновременно, и являются удобной и в, известном смысле, универсальной технологией для массовых исследований генетического полиморфизма и скрининга мутаций. ДНК-микрочип ( <i>DNA microarray</i> ) состоит из тысяч дезоксиолигонуклеотидов (зондов, или проб), сгруппированных в виде микроскопических точек и закреплённых на твёрдой подложке. Каждая точка содержит несколько пикомолей ДНК с определённой нуклеотидной последовательностью. Олигонуклеотиды ДНК-микрочипа могут быть короткими участками генов или других функциональных элементов ДНК и используются для гибридизации с кДНК или мРНК (кРНК). Гибридизация зонда и мишени регистрируется и количественно характеризуется при помощи флуоресценции или хемилюминесценции, что позволяет определять относительное количество нуклеиновой кислоты с заданной последовательностью в образце. |
| 11 | Денатурирующая жидкостная хроматография высокого разрешения | Предложен в 1995 г. Данный метод представляет собой модификацию гетеродуплексного анализа с последующим автоматическим учетом результатов при помощи жидкостного хроматографа.  |

Много методов, существующих на сегодняшний день созданы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), предложенной в 1983 году. Данный метод по праву можно считать

базовым методом современной ДНК-диагностики. Принципиальная схема ПЦР представлена на рис. 9.

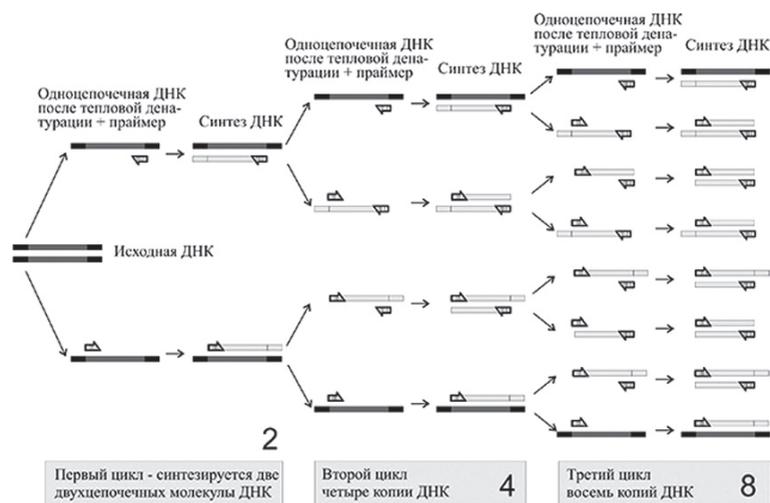


Рис. 9. Принципиальная схема полимеразной цепной реакции

Приведем примеры различных вариантов ПЦР, используемых для анализа полиморфизма генов цитокинов.

Для VNTR во втором интроне ИЛ-1Ra в результате прямой амплификации идентифицируются фрагменты ДНК размером 438, 524, 610, и 696 н. п. соответственно с 2, 3, 4 и 5 копиями тандемных повторов. Примеры генотипов представлены на рис. 10.

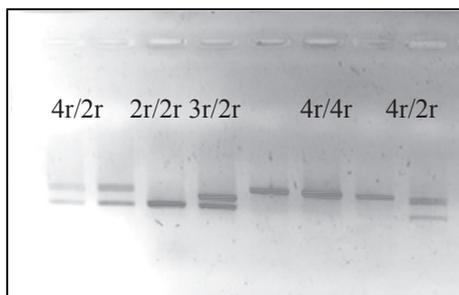


Рис. 10. Полиморфизм типа VNTR во 2-м интроне гена ИЛ-1Ra

Для VNTR ИЛ-4 в результате амплификации идентифицируются фрагменты ДНК размерами 255 и 325 н. п. соответственно с 2 и 3 копиями тандемных повторов. Эти аллели обозначены

как 2R и 3R, образуемые ими генотипы представлены на рисунке 11.

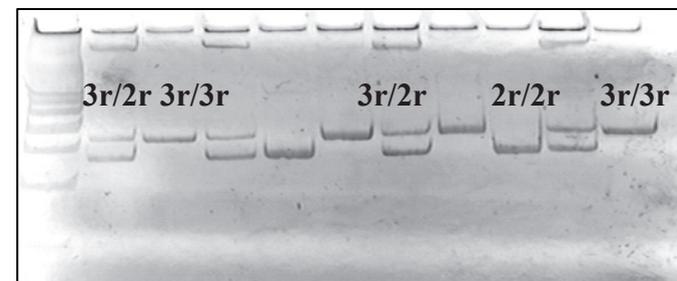


Рис. 11. Полиморфизм типа VNTR в 3-ем интроне гена ИЛ-4

Использование полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) представлено на рис. 12, 13, 14.

При гидролизе амплификационного фрагмента гена ИЛ-1β эндонуклеазой рестрикции Taq I выявляются три фрагмента размером 550 п. н., 146 п. н. и 404 п. н. Фрагмент 550 п. н. соответствует амплификационному фрагменту, не подвергнувшемуся гидролизу, что указывает на наличие аллеля ИЛ-1β +3953\*Т. При наличии аллеля +3953\*С происходит разрезание ампликона на два фрагмента 146 п. н. и 404 п. н.

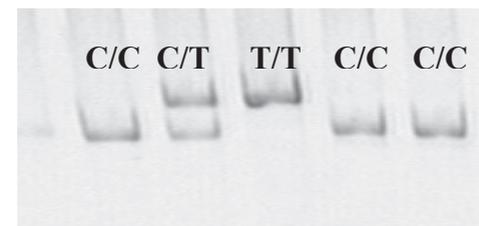


Рис. 12. Генотипы SNP +3953 C/T ИЛ-1β

Электрофореграммы SNPs, расположенных в промоторной области гена ФНОα можно увидеть на рис. 13, 14.

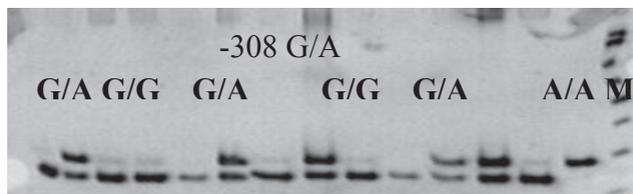
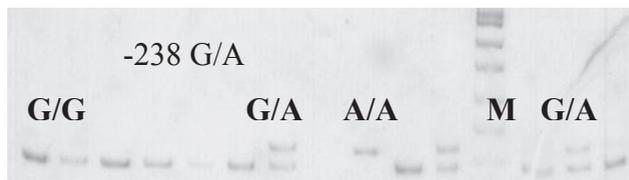


Рис. 13. Генотипы SNP -238 G/A и -308 G/A ФНО $\alpha$

При обработке эндонуклеазами рестрикции ампликонов происходит разрезание только в случае наличия аллелей дикого типа в точках -238\*G, -308\*G.

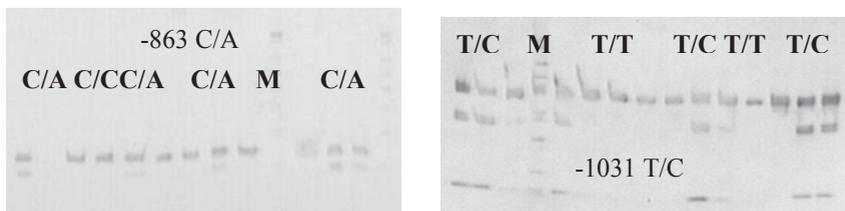


Рис. 14. Генотипы SNP -863C/A и -1031T/C ФНО $\alpha$

В случае с полиморфными сайтами -863C/A и -1031T/C ФНО $\alpha$ , расстриганию под действием эндонуклеаз рестрикции подвергаются ампликоны, содержащие аллель с заменой (редкий, мутантный вариант) [23].

Как пример использования аллельспецифической ПЦР для определения генетического полиморфизма приведем схему определения SNP в точке -1082 G/A ИЛ-10 (реактивы производства НПФ «Литех», г. Москва).

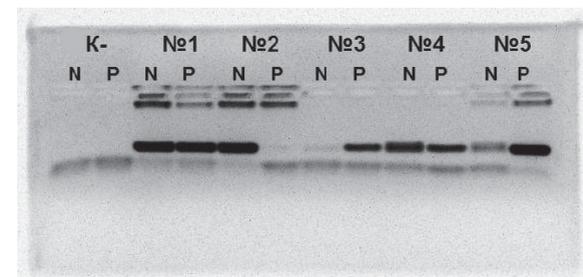


Рис. 15. Генотипы SNP -1082 G/A ИЛ-10

На рисунке представлены под номерами различные варианты генотипов: № 1, 4 — гетерозиготы — образцы, содержащие аллель дикого типа (-1082\*G) и аллель с заменой (-1082\*A); №2 — гомозигота по аллелю дикого типа (-1082 G/ G); № 3 — гомозигота по аллелю с заменой (-1082 A/A).

Кроме представленных методов, широко распространенным является метод определения содержания цитокинов в биологических жидкостях — на основе иммуноферментного анализа.

Кратко охарактеризуем данный метод.

**Иммуноферментный анализ** — лабораторный иммунологический метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса «антиген — антитело» за счет введения в один из ком понентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску. Основой проведения любого варианта ИФА служит определение продуктов ферментативных реакций при исследовании тестируемых образцов в сравнении с негативными и позитивными контролями. Различают несколько десятков модификаций ИФА: 1. ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay) — метод определения с помощью им муносорбентов, связанных с ферментами; 2. EIA (enzyme immunoassay) — метод на основе фермент-иммуноопределения; 3. EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) — способ, основанный на связи с ферментами. ELISA и EIA — это методы гетерогенного или твердофазного анализа (тИФА), EMIT является гомогенным ИФА. Для определения антигенов и антител применяются твердофазный (гетерогенный) вариант иммуноферментного анализа. Использование твердой фазы позволяет упростить процесс разделения компонентов реакции за счет иммобилизации одного из компонентов на твердой фазе и удаления субстанций, не участвующих в реакции. тИФА основан на двух принципиальных научных открытиях. Первое заключается

в способности энзимов и антител, ковалентно или нековалентно связанных с твердой основой, сохранять свою функциональную активность, т. е. расщеплять субстрат (ферменты) и связывать антигены/антитела; второе базируется на создании комплекса антитело-фермент (Ab-F) в виде конъюгата, сохраняющего свою биологическую активность в растворе. Ab-F-конъюгаты характеризуются высочайшей специфичностью и чувствительностью, достигающей 97–99% [53].

Для определения цитокинов могут использоваться отечественные тест-системы, разработанные в ГосНИИ ОЧБ (Санкт-Петербург) и производимые фирмами «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург) для цитокинов: ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-альфа и ТОО «Цитокин» для ИФН-гамма. Тест-системы основаны на «сэндвич» — методе твёрдофазного иммуноферментного анализа с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента. Иммуноферментное выявление цитокинов имеет ряд преимуществ перед другими методами (высокая чувствительность, специфичность, независимость от присутствия антагонистов, возможность точного автоматизированного учета, стандартизации учета). Однако и этот метод имеет свои ограничения: ИФА не характеризует биологическую активность цитокинов, может давать ложные результаты за счет перекрестно-реагирующих эпитопов [10].

Таким образом, изучение различных уровней системы цитокинов позволяет получить информацию о функциональной активности разных типов иммунокомпетентных клеток, о тяжести воспалительного процесса, о его переходе на системный уровень и о прогнозе заболевания.

### Вопросы к 3-й главе

1. Охарактеризовать понятие, виды генетического полиморфизма и примеры полиморфных генов цитокинов.

2. Составить таблицу «Ассоциация полиморфизма генов цитокинов с мультифакторными заболеваниями» со следующими критериями для заполнения: позиция полиморфного сайта в гене, название заболевания, ассоциация с восприимчивостью, влияние на иммунопатогенез, литературный источник.

3. Привести примеры современных методов исследования цитокинов.

4. Охарактеризовать методы определения содержания цитокинов.

5. Охарактеризовать методы изучения функций цитокинов.

6. Описать процесс определения внутриклеточного содержания цитокинов.

7. Составить алгоритм определения дефектов на уровне клеток-продуцентов.

8. Дать характеристику ПЦР и ее разновидностям, привести примеры использования ПЦР-технологий для оценки генов цитокинов.

9. Дать характеристику ИФА, привести примеры использования ИФА для оценки содержания цитокинов.

## Заключение.

### Перспективы изучения системы цитокинов

Таким образом, не вызывает сомнения, что цитокины являются важнейшими мишенями иммунодиагностики широкого круга заболеваний человека.

Движущей силой интенсивного изучения цитокинов всегда была многообещающая перспектива их клинического использования для лечения широко распространенных заболеваний. Рекомбинантные (генно-инженерные) цитокины получают методами биотехнологии. При применении рекомбинантных цитокинов как лекарственных препаратов они воспроизводят биологические эффекты эндогенных цитокинов, способны влиять на патогенез различных заболеваний, поэтому являются средствами патогенетической терапии иммунозаместительного типа действия. Как лекарственные средства рекомбинантные цитокиновые препараты хорошо охарактеризованы. Идентифицированы их специфические рецепторы и описана фармакодинамическая активность большинства рекомбинантных препаратов цитокинов. Известна их фармакокинетика при использовании обычных и пролонгированных лекарственных форм и подтверждена зависимость выраженности клинических и иммунокорректирующих эффектов от используемых доз.

Для некоторых цитокиновых препаратов (преимущественно для рекомбинантных интерферонов) имеются международные стандарты назначения и российские методические рекомендации по лечению конкретных инфекционных заболеваний, а также сопутствующих иммунных нарушений.

Основная цель проведения иммунозаместительной терапии рекомбинантными цитокинами — активация иммунореактивности организма посредством коррекции дефектных звеньев иммунной системы и реализация индуктивного воздействия применяемых пептидных медиаторов на цитокиновую сеть, что

позволяет в условиях проведения цитокинотерапии добиваться значимых клинических эффектов.

В настоящее время для лечения инфекционных больных во всем мире наиболее широко используют следующие генноинженерные цитокины:

- 1) препараты рекомбинантных альфа и гамма интерферонов (гемоконтактные гепатиты, ВИЧ-инфекция, другие острые и хронические вирусные инфекции, передающиеся половым путем инфекции мочеполового тракта, сепсис, лейшманиоз);
- 2) препараты рекомбинантных колониестимулирующих факторов и рИЛ-1 $\beta$  (осложнения этиологической терапии при инфекционных заболеваниях, вялотекущие гнойно-воспалительные процессы);
- 3) препараты некоторых рекомбинантных интерлейкинов — рИЛ-2 (ронколейкин), рИЛ-12 (гемоконтактные гепатиты, ВИЧ-инфекция, сепсис).

При оценке патогенетической направленности цитокинотерапии необходимо учитывать степень дисбаланса звеньев иммунореактивности, выраженность общей депрессии иммунной системы. Должна также учитываться возможность вмешательства цитокинов, имеющих системные эффекты, — ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6; их рецепторных антагонистов — ИЛ-1Ра, а также цитокинов с высоким регуляторным потенциалом — ИЛ-2, ИФН $\gamma$  в функционирование нервно-иммуно-гормональной системы как единой системы регуляторной интеграции организма, а также в субпопуляционные взаимоотношения клеток иммунореактивности [8; 11; 17].

Также необходимо помнить, что цитокины являются антиген-неспецифическими факторами, поэтому специфическая диагностика инфекционных, аутоиммунных и аллергических заболеваний с помощью определения уровней тех или иных цитокинов невозможна.

Существует три принципиальных варианта применения цитокинов в клинической практике:

1. Лечение препаратами цитокинов, а именно, усиление действия эндогенных цитокинов путем введения в организм природных или рекомбинантных молекул цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, КСФ, ИФН и др.) либо заместительная терапия (эритропоэтин).

2. Цитокиновая генотерапия рака путем введения генов цитокинов в опухолевые клетки для усиления их иммуногенности и повышения воспалительной реакции в области опухолевого узла и иммунного отторжения опухоли.

3. Антицитокиновая терапия, направленная на удаление или блокирование действия эндогенных цитокинов с использованием специфических ингибиторов (в том числе членов семейства цитокинов, например ИЛ-1Ра для блокирования действия ИЛ-1), моноклональных антител к цитокинам, а также растворимых рецепторов.

Примеры клинического использования цитокинов представлены в таблице 8.

Таблица 8

**Примеры клинического применения цитокинов**

| <b>Название цитокина</b>   | <b>Основные направления использования</b>   |
|--|---|
| <b>Интерлейкин 1 (беталейкин)</b>  | Восстановление кроветворения при химиотерапии опухолей, радиозащита, инфекционные болезни, заживление ран |
| <b>Рецепторный антагонист ИЛ-1 (анакинра)</b>  | Ревматоидный артрит, септический шок  |
| <b>Интерлейкин 2 (ронколейкин)</b>   | Иммуноterapia рака, инфекционные заболевания, сепсис, СПИД, травма, панкреатит                            |
| <b>Интерлейкин 3</b>   | Тромбоцитопении и анемии различного генеза  |
| <b>Интерлейкин 4</b>   | Иммуноterapia при солидных опухолях   |
| <b>Интерлейкин 11</b>  | Тромбоцитопении, воспалительные заболевания кишечника   |
| <b>Интерлейкин 12</b>  | Онкопатология, гепатит, вирусные заболевания  |
| <b>Интерферон <math>\alpha</math></b>  | Онкопатология, вирусный гепатит, СПИД   |
| <b>Интерферон <math>\beta</math></b>   | Множественный склероз   |
| <b>Интерферон <math>\gamma</math></b>  | Лейшманиаз, инфекционные заболевания, сепсис  |
| <b>Эритропоэтин</b>  | Анемия при почечной недостаточности   |
| <b>Тромбопоэтин</b>  | Тромбоцитопении различного генеза   |
| <b>Колонистимулирующие факторы</b>   | Нейтропении различного генеза, инфекционные заболевания, сепсис   |
| <b>Суперлимф (комплексный донорский препарат: ИЛ-1, ИЛ-6, <math>TNF\alpha</math>, <math>TGF\beta</math>)</b> | Лечение гнойных ран, трофических язв, воспалительно-деструктивных осложнений                              |

В России при лечении инфекционных больных имеется обширный клинический опыт применения рекомбинантных препаратов альфа интерферона, дрожжевого рекомбинантного ИЛ-2 (препарат Ронколейкин®) (острые и хронические инфекционные болезни различной этиологии, гемоконтактные гепатиты, ВИЧ-инфекция, сепсис) и бактериального рекомбинантного ИЛ-1 $\beta$  (препарат Беталейкин) (вялотекущие хронические инфекции, туберкулез, гемоконтактные гепатиты) [11; 17; 27]. Таким образом, цитокиновая сеть является древнейшей регуляторной системой организма, которая на уровне окооклеточной и межклеточной регуляции обеспечивает взаимосвязь внеклеточного матрикса, как среды реализации основных пространственных взаимодействий клеток и места энергетического обеспечения этих взаимодействий, с периферической нервно-эндокрино-иммунной сетью.

## Список сокращений

|              |  |
|--------------|--|
| Ag           | антиген  |
| MIF          | фактор ингибирования миграции макрофагов (Macrophage migration inhibitory factor)                  |
| ИЛ           | интерлейкин  |
| рИЛ          | рекомбинантный интерлейкин   |
| ФНО $\alpha$ | фактор некроза опухолей альфа  |
| ИЛ-1Ra       | Рецептор-антагонист интерлейкина 1   |
| ИФН          | интерферон   |
| ЛПС          | липолисахарид  |
| КСФ          | колониестимулирующие факторы   |
| ГМ-КСФ       | гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор  |
| ТФР          | трансформирующий фактор роста  |
| WSXWS        | последовательность аминокислотных остатков: триптофан, серин, любая аминокислота, триптофан, серин |
| bcl2         | регулятор апоптоза   |
| c-Мyc        | протоонкогенный белок Мус  |
| mTOR         | протеинкиназа серин-треониновой специфичности  |
| CdK          | циклинзависимая киназа   |
| STAT         | сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции  |
| ФРСК         | фактор роста стволовых клеток  |
| М-КСФ        | колониестимулирующий фактор для моноцитов/макрофагов   |
| ТПО          | тромбопоэтин   |
| Th1          | T-хелперы 1 типа   |
| Th2          | T-хелперы 2 типа   |
| NK           | естественные киллеры   |

## Список литературы

1. *Белова, О. В.* Роль цитокинов в иммунологической функции кожи / О. В. Белова, В. О. Арион, В. И. Сергиенко // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2008. — № 1. — С. 41—55.
2. *Беляева, С. В.* Гены иммунного ответа и их комбинации в качестве предиктивных маркеров потенциального риска развития активного туберкулеза легких и его клинических фенотипов у представителей русской популяции Челябинской области : автореф. дис. ... канд. биол. наук / С. В. Беляева. — Челябинск, 2014. — 23 с.
3. *Бурмистрова, А. Л.* Гены цитокинов и их рецепторов маркеры предрасположенности и клинических вариантов течения ревматоидного артрита в различных этнических группах Челябинской области / А. Л. Бурмистрова, Т. А. Суслова, Д. С. Сташкевич // Биотехнология как научно-практический приоритет развития Кировской области : сб. материалов междунар. конф. — Т. 1. — Киров, 2007. — С. 9—13.
4. *Валуйских, Е. Ю.* Клинико-генетические аспекты воспалительных заболеваний кишечника / Е. Ю. Валуйских, И. О. Светлова, С. А. Курилович и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2008. — Т. 18. — № 6. — С. 68—74.
5. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины / под ред. В. С. Баранова. — СПб. : Изд-во Н-Л, 2009. — 528 с.
6. *Глотов, А. В.* Основы иммунологии, иммуногенетики и иммунобиотехнологии : учеб. пособие / А. В. Глотов, М. Г. Потуданская. — Ч. 1. Общая иммунология. — Омск : Омский гос. ун-т, 2009 — 119 с. [Электронный ресурс]. — URL: //biblioclub.ru/index.php?page=book&id=237156 (21.11.2016).
7. *Иванова, Е. Л.* Генетический полиморфизм IL-1b и вариабельность течения синдрома раздраженного кишечника /

Е. Л. Иванова, Д. С. Шашкевич, А. С. Сарсенбаева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2014. — № 11 (111). — С. 102.

8. *Кетлинский, С. А.* Цитокины. / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. — СПб : Фолиант, 2008. — 552 с.

9. *Ковальчук, Л. В.* Анализ молекулярного взаимодействия в системе: IL-1 $\beta$ -IL-1Ra-IL-1R / Л. В. Ковальчук, Б. Н. Соболев, Л. В. Ганковская, А. А. Юдин // Иммунология. — 2001. — № 1. — С. 6—9.

10. *Ковальчук, Л. В.* Иммунология: практикум : учеб. пособие / под ред. Л. В. Ковальчука, Г. А. Игнатъевой, Л. В. Ганковской. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. — 174 с.

11. *Козлов, В. К.* Цитокиноterapia: патогенетическая направленность при инфекционных заболеваниях и клиническая эффективность: руководство для врачей / В. К. Козлов. — СПб. : Альтер Эго, 2010. — 148 с.

12. *Коненков, В. И.* Структурные основы и функциональная значимость аллельного полиморфизма генов цитокинов человека и их рецепторов / В. И. Коненков, М. В. Смольникова // Медицинская иммунология. — 2003. — Т. 5. — № 1—2. — С. 11—28.

13. *Коненков, В. И.* Полиморфизм гена TNFA и неравновесное сцепление TNFA и HLA-генов II класса (DRB1, DQA1 DQB1) в популяции сибирских европеоидов / В. И. Коненков, О. В. Голованова, В. В. Дортман // Иммунология. — 2008. — № 1. — С. 6—10.

14. *Кузьминова, Е. П.* Полиморфизм и особенности экспрессии генов врожденного и адаптивного иммунитета у пациентов с тяжелой термической травмой : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е. П. Кузьминова — Челябинск, 2013. — 22 с.

15. *Кучмий, А. А.* Новая линия трансгенных репортерных мышей для изучения экспрессии фактора некроза опухолей / А. А. Кучмий, А. А. Круглов, А. Р. Галимов [и др.] // Российский иммунологический журнал. — 2011. — Т. 5(14). — № 3—4. — С. 205—214.

16. *Ребриков, Д. В.* NGS: высокопроизводительное секвенирование / Д. В. Ребриков, Д. О. Коростин, Е. С. Шубина, В. В. Ильинский. — М. : Бином. Лаборатория знаний, 2014. — 232 с.

17. *Сибиряк, С. В.* Цитокиновая регуляция биотрансформации ксенобиотиков и эндогенных соединений / С. В. Сибиряк, В. А. Черешнев, А. С. Симбирцев, Д. С. Сибиряк, Т. В. Гаврилова. — Екатеринбург : УрО РАН, 2006. — 160 с.

18. *Симбирцев, А. С.* Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека / А. С. Сим-

бирцев. Медицинский академический журнал. — 2013. — Т. 1. — № 3. — С. 18—41.

19. *Симбирцев, А. С.* Цитокины: классификация и биологические функции / А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т. 3. — № 2. — С. 16—22.

20. *Шашкевич, Д. С.* Ассоциация полиморфизма промоторной области гена IL-10 с предрасположенностью к синдрому раздраженного кишечника у русских Челябинской области / Д. С. Шашкевич, А. Л. Бурмистрова, Е. Л. Иванова и др. // Вестник Уральского медицинской академической науки. — 2012. — № 4 (41). — С. 245—246.

21. *Шашкевич, Д. С.* Вклад полиморфизма генов цитокинов IL-1RA, IL-1b, TNFA, IL-10 в вариабельность течения синдрома раздражённого кишечника / Д. С. Шашкевич, Е. Л. Иванова, А. Л. Бурмистрова // Вестник Челябинского государственного университета. — 2013. — № 7 (298). — С. 18—20.

22. *Шашкевич, Д. С.* Полиморфизм генов провоспалительных цитокинов IL-1B, IL-6, TNFA у больных неспецифическим язвенным колитом русской популяции Челябинской области / Д. С. Шашкевич, А. Л. Бурмистрова, А. А. Кобеляцкая // Современные проблемы науки и образования. — 2016. — № 4. [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25083> (дата обращения: 27.08.2016).

23. *Шашкевич, Д. С.* Аллели и генотипы генов основных цитокинов и их межгенные и внутригенные связи в ассоциации с ревматоидным артритом у русской и башкирской популяций : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Д. С. Шашкевич. — Челябинск, 2009 — 23 с.

24. *Черешнев, В. А.* Иммунология : учебник. — 4-е изд., перераб. и доп. / В. А. Черешнев, К. В. Шмагель. — М. : Центр стратегического партнерства, 2014. — 520 с.

25. *Хаитов, Р. М.* Иммунология : атлас / Р. М. Хаитов, А. А. Ярилин, Б. В. Пинегин. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. — 624 с.

26. *Хаитов, Р. М.* Иммунология : учебник для вузов / Р. М. Хаитов. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. — 521 с. : ил. + 1 CD.

27. *Ярилин, А. А.* Иммунология : учебник для вузов / А. А. Ярилин. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 749 с.

28. *Al-Ansari, S.* Tumor necrosis factor receptor II (TNFR2) exon 6 polymorphism in systemic lupus erythematosus / S. Al-Ansari, W.E.R. Ollier, J. Villarreal, J. Ordi, L.-S. Teh, A.H. Hajeer // Tissue antigens. — 2000. — Vol.55. — P. 97-99.

29. *Aguillon, J. C.* Could single-nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting the tumour necrosis factor promoter be considered as part

of rheumatoid evolution / J. C. Aguilón, A. Cruzat, O. Aravena et al. // Immunobiology. — 2006. — Vol. 211. — P. 75–84.

30. *Arpaci, D.* Increased Serum Levels of IL-28 and IL-29 and the Protective Effect of IL28B rs8099917 Polymorphism in Patients with Hashimoto's Thyroiditis / D. Arpaci, S. Karakas Celik, M. Can et al. // Immunological Investigations. — 2016. — Vol. 45(7). — P. 668–678.

31. *Baena, A.* TNF- $\alpha$  promoter single nucleotide polymorphisms are markers of human ancestry / A. Baena, J. Y. Leung, A. D. Sullivan et al. // Genes and Immunity. — 2002. — Vol. 3. — P. 482–487.

32. *Banner, D. W.* Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation / D. W. Banner, A. D'Arcy, W. Janes et al. // Cell. — Vol. 73 (3). — P. 431–445.

33. *Behzadi, P.* IL-12 Family Cytokines: General Characteristics, Pathogenic Microorganisms, Receptors, and Signalling Pathways / P. Behzadi, E. Behzadi, R. Ranjbar // Acta microbiologica et immunologica Hungica. — 2016. — Vol. 63(1). — P. 1–25.

34. *Baslund, B.* Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis / B. Baslund, N. Tvede, B. Danneskiold-Samsoe // Arthritis & Rheumatism. — 2005. — Vol. 52. — № 9. — P. 2686–2692.

35. *Camargo, J. F.* Interleukin-1 $\beta$  polymorphisms in Colombian patients with autoimmune rheumatic diseases / J. F. Camargo, P.A. Correa, J. Castiblanco, J.-M. Anaya // Genes and Immunity. — 2004. — Vol. 5. — P. 609–614.

36. *Christodoulou, C.* Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis / C. Christodoulou, E. H. Choy // Clinical and Experimental Medicine — 2006. — Vol. 6. — P. 13–19.

37. *Dinarello, C. A.* The interleukin-1 family: 10 years of discovery // The FASEB Journal. — 1994. — Vol. 8. — P. 1314–1325.

38. *Hollegaard, M. V.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. / M. V. Hollegaard, J. L. Bidwell // Genes and Immunity. — 2006. — Vol. 7. — P. 269–276.

39. *Khawar, M. B.* IL-32: A Novel Pluripotent Inflammatory Interleukin, towards Gastric Inflammation, Gastric Cancer, and Chronic Rhino Sinusitis / M. B. Khawar, M. H. Abbasi, N. Sheikh // Mediators of Inflammation. — 2016. — Vol. 2016. [Электронный ресурс] — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4837279/>.

40. *Liew, F. Y.* Interleukin-33 in health and disease. / F. Y. Liew, J.P. Girard, H. R. Turnquist // Nature Reviews Immunology. — 2016. — Vol. 16. — P. 676–689.

41. *Lio, D.* Colombo and et al Genetically Determined High Setting of TNF- $\alpha$  Influences Immunologic Parameters of HLA-B8, DR3 Positive Subjects: Implications for Autoimmunity / D. Lio, A. Candore // Human Immunology. — 2001. — Vol. 62. — P. 705–713.

42. *Magyari, L.* Interleukin and interleukin receptor gene polymorphisms in inflammatory bowel diseases susceptibility / L. Magyari, E. Kovessi, P. Sarlos, A. Javorhazy, K. Sumegi, B. Melegh // World Journal of Gastroenterology. — 2014. — 20 (12). — P. 3208–3222.

43. *Mao, Y. Q.* Association between TNF- $\alpha$  rs1799724 and rs1800629 polymorphisms and the risk of Crohn's disease / Y. Q. Mao, S. Q. Dong, M. Gao // Genetics and molecular research. — 2015. — Vol. 14(4). — P. 15811–15821.

44. *Pestka, S.* The interferon gamma (IFN-gamma) receptor: a paradigm for the multichain cytokine receptor / S. Pestka, S. V. Kotenko, G. Muthukumaran, L. S. Izotova, J. R. Cook, G. Garotta // Cytokine Growth Factor Review. — 1997. — Vol. 8 (3). — P. 189–206.

45. *Pollard, L.* Rheumatoid arthritis: non-tumor necrosis factor targets / L. Pollard, E. Choy // Current Opinion in Rheumatology. — 2005. — Vol. 17. — P. 242–246.

46. *Sarlos, P.* Genetic update on inflammatory factors in ulcerative colitis: Review of the current literature / P. Sarlos, E. Kovessi, L. Magyari et al. // World journal of Gastrointestinal Pathophysiology. — 2014. — V. 5. — I. 3. — P. 304–321.

47. *Tengvall, S.* Interleukin-26: An Emerging Player in Host Defense and Inflammation / S. Tengvall, K. F. Che, A. Lindh // Journal of Innate Immunity. — 2016. — Vol. 8(1). — P. 15–22.

48. *Tracey, K.* Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway // J. Clin. Invest. — 2007. — Vol. 117. — P. 289–296.

49. *Yoon, J.* IL-23 induced in keratinocytes by endogenous TLR4 ligands polarizes dendritic cells to drive IL-22 responses to skin immunization / J. Yoon, J. M. Leyva-Castillo, G. Wang, et al. // The Journal of experimental medicine. — 2016. — Vol. 213(10). — P. 2147–2166.

50. База знаний по биологии человека. Цитокины: общие сведения [Электронный ресурс]. — URL: <http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/00142edc.htm>.

51. Цитокиновый контроль иммунной системы. Местное действие цитокинов. Механизм действия цитокинов на иммунитет [Электронный ресурс]. — URL: <http://meduniver.com/Medical/Physiology/353.html> MedUniver

52. Беталейкин. Инструкция [Электронный ресурс]. — URL: <http://betaleukin.ru/instruktsiya-po-meditsinskomu-primeneniyu-preparata-betaleukin>.

53. Иммуноферментный анализ [Электронный ресурс]. — URL: [http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o\\_pass/MMoB/8.pdf](http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o_pass/MMoB/8.pdf)

54. Новое о трансдуцерном рецепторе цитокинов gp130 в онкогематологии [Электронный ресурс]. — URL: <http://nature.web.ru/db/msg.html?mid=1170083&uri=index2.html>

55. Allele frequencies in worldwide populations [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.allelefrequencies.net/>

Учебное издание

Дарья Сергеевна Сташкевич, Юлия Юрьевна Филиппова,  
Александра Леонидовна Бурмистрова

**Актуальные вопросы иммунологии:  
система цитокинов, биологическое значение,  
генетический полиморфизм, методы определения**

*учебное пособие*

Верстка *В. Б. Феркель*

Подписано в печать 20.12.2016 г.  
Формат 60×84/16. Усл. печ. л. 4,88.  
Бумага Гознак.  
Тираж 500 экз.  
Заказ № 154.

Издательство «Цицеро»  
454080, г. Челябинск, Свердловский пр., 60.

Отпечатано в типографии  
ООО «Фотохудожник»  
454091, г. Челябинск, ул. Свободы, 155/1.