

ОСОБЕННОСТИ «ПОЛЯРИЗАЦИИ» Т-ХЕЛПЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ САРКОИДОЗЕ

Кудрявцев И.В.^{1,2}, Лазарева Н.М.¹, Баранова О.П.¹,
Серебрякова М.К.², Сесь Т.П.¹, Илькович М.М.¹, Тотолян Арег А.^{1,3}

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Саркоидоз является полисистемным иммуноопосредованным заболеванием неизвестной этиологии, при котором могут отмечаться поражения различных органов и, прежде всего, легкие. Выделяют два клинических варианта дебюта саркоидоза: острое/подострое течения саркоидоза (ОС, или синдром Лефгрена) и хроническую форму течения саркоидоза (ХС, или «не Лефгрен-синдром») с высоким риском развития фиброза легких. Целью данного исследования было изучение субпопуляционного состава «поляризованных» Т-хелперов центральной и эффекторной памяти у больных с острым (n = 19) и хроническим (n = 63) дебютом саркоидоза, контролем служили образцы периферической крови, полученные от 48 условно здоровых добровольцев. С использованием многоцветной проточной цитометрии было показано, что при ХС наблюдается достоверное снижение CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов относительно как больных с ОС, так и группы контроля (38,94% (31,33-44,24) против 48,96% (43,34-53,54) и 47,63% (43,82-52,73), при p < 0,001 в обоих случаях). При ХС в циркуляции снижается как относительное, так и абсолютное содержание «наивных» Т-хелперов, а также СМ и ЕМ Т-хелперов при сравнении с контрольными значениями. У больных с ОС отмечено увеличение доли и концентрации в периферической крови ЕМ-клеток, способных к миграции в периферические воспаленные ткани, при сравнении с ХС. При анализе Т-хелперов популяции TEMRA отмечено увеличение как относительного, так и абсолютного содержания клеток данной популяции у больных с ОС относительно контрольных значений, так и пациентов с ХС. Достоверные различия по содержанию Th1- и Th2-клеток были отмечены только у пациентов с ХС (9,64% (7,06-13,65) против 13,80% (11,24-18,03) в контроле при p < 0,001, а также 11,96% (9,86-14,78) против 10,67% (9,13-12,98) в контроле при p = 0,048 соответственно). Достоверных различий по относительному содержанию CXCR5⁺CCR6⁺Th17 и CXCR5⁺ фолликулярным Т-хелперам (Tfh) отмечено не было. Для обеих групп пациентов с саркоидозом было показано снижение доли «не классических» Th17 и DN Th17 на фоне увеличения уровня DP Th17-клеток в рамках общего пула CXCR5⁺CCR6⁺ СМ Th, тогда как «классические» Th17 у пациентов с хроническим дебютом заболевания повышались. Сходная динамика изменения баланса между отдельными субпопуляциями Th17 была отмечена при исследовании CCR6-

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Кудрявцев, Н.М. Лазарева, О.П. Баранова,
М.К. Серебрякова, Т.П. Сесь, М.М. Илькович,
Арег А. Тотолян «Особенности «поляризации»
Т-хелперов периферической крови при остром
и хроническом саркоидозе» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 573-586.
doi: 10.15789/1563-0625-PBT-2468

© Кудрявцев И.В. и соавт., 2022

For citation:

I.V. Kudryavtsev, N.M. Lazareva, O.P. Baranova,
M.K. Serebriakova, T.P. Ses', M.M. Ilkovich,
Areg A. Totolian "Peripheral blood T helper cell subsets in
L fgren's and non-L fgren's syndrome patients", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 3, pp. 573-586.
doi: 10.15789/1563-0625-PBT-2468

DOI: 10.15789/1563-0625-PBT-2468

позитивных EM Th, способных покидать циркуляцию и мигрировать на периферию. Таким образом, полученные нами результаты подчеркивают важность баланса между различными субпопуляциями Th17-клеток при различных течениях саркоидоза, а также указывают на высокую значимость этих клеток как перспективных мишеней в терапии саркоидоза.

Ключевые слова: саркоидоз, T-хелперы, дифференцировка T-хелперов, T-хелперы 17, Th17.1, проточная цитометрия

PERIPHERAL BLOOD T HELPER CELL SUBSETS IN L OFGREN'S AND NON-L OFGREN'S SYNDROME PATIENTS

Kudryavtsev I.V.^{a,b}, Lazareva N.M.^a, Baranova O.P.^a,
Serebriakova M.K.^b, Ses' T.P.^a, Ilkovich M.M.^a, Totolian Areg A.^{a,c}

^a First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Sarcoidosis is a multisystemic granulomatous disorder of unknown cause, characterized by formation of immune granulomas in various organs, mainly in lungs. Currently, two main phenotypes of pulmonary sarcoidosis are described, i.e., Lofgren's syndrome (LS) is an acute form with favorable outcome, and non-Lofgren's syndrome (nLS) is a chronic type of disease with a high risk of pulmonary fibrosis. Our study was aimed to investigate the balance of main "polarized" CD4⁺ central and effector memory T cells from treatment-naïve patients with pulmonary sarcoidosis (LS (n = 19) and nLS (n = 63)) compared to healthy volunteers (HC, n = 48). This marker might be used as immunological markers for predicting severity of this disorder. Multicolor flow cytometry analysis demonstrated that the patients with nLS showed significantly low levels of relative and absolute numbers of CD3⁺CD4⁺ lymphocytes if compared to patients with LS and control group (38.94% (31.33-44.24) versus 48.96% (43.34-53.54) and 47.63% (43.82-52.73), p < 0.001 in both cases). Moreover, patients with nLS had reduced frequencies and absolute numbers of "naïve", CM and EM Th cells if compared with healthy controls. Furthermore, the patients with LS showed increased relative and absolute numbers of peripheral blood EM Th cells, capable for migration to peripheral inflamed tissues, when compared with nLS. Finally, patients with LS had increased frequencies and absolute numbers of effector TEMRA Th cells as compared to HC and nLS. Next, significant differences Th1 and Th2 cells frequencies were shown between the patients with nLS and HC (9.64% (7.06-13.65) versus 13.80% (11.24-18.03) with p < 0.001, and 11.96% (9.86-14.78) versus 10.67% (9.13-12.98) with p = 0.048, respectively). But there were no significant differences in the relative numbers of CXCR5-CCR6⁺Th17 and CXCR5⁺ follicular T helper cells (Tfh) between the groups. Finally, both groups of patients with pulmonary sarcoidosis contained low proportions of "non-classical" Th17 and DN Th17 cell, but increased levels of DP Th17 cells within total CXCR5-CCR6⁺ CM Th if compared with HC. Nevertheless, patients with nLS had increased frequency of "classical" Th17 in comparison with healthy controls. A very similar imbalance between different Th17 cell subsets was observed within total CXCR5-CCR6⁺ effector memory Th, that were able to migrate from the bloodstream to the sites of infection, or tissue injury. Taken together, the data suggest that the proportions of Th17 cell subsets in pulmonary sarcoidosis can be evaluated as a diagnostic and/or prognostic marker in clinical practice and these cells could serve as a new therapeutic target.

Keywords: sarcoidosis, CD4⁺T cells, Th cell differentiation, Th17 cell subsets, Th17.1, flow cytometry

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-24-20013.

Введение

Саркоидоз является полисистемным иммуноопосредованным заболеванием неизвестной этиологии [1, 41]. При саркоидозе могут отмечаться поражения кожи, глаз, центральной нервной системы, сердца и других органов, однако более чем в 90% случаев поражаются легкие [24,

36]. Диагноз «саркоидоз» устанавливают на основании комплексного анализа особенностей клинического течения заболевания, рентгенологических исследований пораженных тканей, тогда как гистологическая верификация диагноза производится при обнаружении эпителиоидно-клеточных неказеифицирующихся гранул в биоптатах пораженных тканей [1, 33]. Причем в настоящее время различают два основных клинических варианта дебюта саркоидоза. Вариант

острого/подострого течения саркоидоза — синдром Лефгрена — проявляется внутригрудной лимфаденопатией, узловатой эритемой, суставным синдромом и лихорадкой. Острое же начало саркоидоза характеризуется более благоприятным прогнозом. По данным разных авторов, частота спонтанной ремиссии при синдроме Лефгрена отмечается в 30–85% случаев в первые два года от начала заболевания. При остром/подостром течении саркоидоза описан также более редко встречающийся в клинической практике синдром Хеерфордта–Вальденстрема, характеризующийся развитием лихорадки, увеита и паротита. Наиболее распространенной в клинической практике является хроническая форма течения саркоидоза, или, как ее еще называют, «не Лефгрена-синдром». При таком течении саркоидоза прогноз менее благоприятный, что связано с высоким риском развития фиброза легких [1, 33].

Иммунологические аспекты патогенеза саркоидоза в последние годы исследуются весьма интенсивно. Результаты этих исследований указывают, что различные субпопуляции Т-хелперов, регулирующие функциональную активность основных эффекторных клеток врожденного и приобретенного иммунитета, играют ведущую роль в развитие данного патологического состояния [7, 17, 41]. В течение длительного времени сохранялась Th1-парадигма иммунопатогенеза саркоидоза и других гранулематозных заболеваний, связанных с активацией IFN γ макрофагов, развитием воспаления и деструктивных процессов в тканях за счет освобождаемых макрофагами провоспалительных цитокинов, протеолитических ферментов и активных форм кислорода. Так, при саркоидозе активированные макрофаги и дендритные клетки секретируют цитокины IL-12 и IL-18, способствующие дифференцировке «наивных» Th0 в Th1 [39]. Поляризованные Th1 в свою очередь усиливают иммунный ответ и секретируют ряд цитокинов, включая IFN γ и IL-2, что связано с активацией транскрипционного фактора T-bet и экспрессией на поверхности Th1 хемокинового рецептора CXCR3 [36]. Причем именно с активностью Th1 связывали интенсивность процесса гранулемообразования, характер клинического течения саркоидоза и его исход.

С открытием Т-хелперов 17 (Th17) парадигма иммунопатогенеза саркоидоза несколько изменилась. Так, в настоящее время многочисленные исследования свидетельствуют о важной роли не только Th1, но и Th17 в развитие данного заболевания [30, 45]. Более того, регулярно появляются новые данные о высокой «гетерогенности» и «пластичности» уже отдельных субпопуляций

Th17 у больных саркоидозом при различных типах клинического течения [14, 15]. Основными клетками-эффекторами при саркоидозе являются субпопуляции Т-лимфоцитов: Т-хелперы 1-го типа (Th1), 17-го типа (Th17), клетки, ответственные за одновременную продукцию интерферона гамма (IFN γ) и интерлейкина-17А (IL-17А) — «не классические» Th17, Th1/Th17 или Th17.1. Ряд авторов отмечают также нарушения в субпопуляционном составе [11, 19], фенотипических характеристиках [21] и функциональной активности регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), что может сопровождаться снижением эффективности в регуляции реакций врожденного и приобретенного иммунитета в целом, а также приводить к хронической форме течения саркоидоза и развитию фиброзу [8]. Более того, существенные нарушения отмечаются и в регуляции специфического гуморального иммунитета, что выражается не только в изменении состава циркулирующих в крови В-лимфоцитов [4, 27], но изменениями в функциональной активности фолликулярных Т-хелперов, которые контролируют все процессы дифференцировки и активации В-лимфоцитов в пределах лимфоидной ткани [20, 26].

Вместе с тем следует отметить, что Th1/Th17-парадигма патогенеза саркоидоза еще окончательно не сложилась. Многие данные, полученные на клиническом материале, в том числе при исследованиях, выполненных в периферической крови и ЖБАЛ при разных типах течения саркоидоза, нередко бывают противоречивыми. Ряд авторов указывают, что у пациентов с активным саркоидозом повышены уровни основного цитокина, продуцируемого Th17 — IL-17А, практически во всех исследуемых компартментах — в легочной ткани, в лимфатических узлах, в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ), а также и в периферической крови [14, 43]. Число клеток, продуцирующих одновременно несколько цитокинов — IL-17А/IFN γ , IL-17А/IL-4 — также достоверно повышено ЖБАЛ и в периферической крови больных саркоидозом [43]. При остром течении саркоидоза в ЖБАЛ больных отмечаются более низкие уровни IFN γ (секретируемого в основном Th1), по сравнению с величиной этого показателя у больных с хроническим течением. При этом уровни цитокинов, продуцируемых Th17 (IL-17А, IL-22 и IL-2), напротив, существенно превышали значения при хроническом течении саркоидоза [36].

Комплексное исследование экспрессии поверхностных маркеров Т-лимфоцитов — Т-хелперов при остром и хроническом дебюте заболевания, выполненное до начала назначения больным иммуносупрессивной терапии в настоящем исследовании, несомненно, может спо-

способствовать более полному пониманию иммуноопосредованных механизмов патогенеза при разных вариантах течения саркоидоза. **Целью данной работы** было изучение особенностей субпопуляционного состава Th различного уровня дифференцировки на основании экспрессии ключевых хемокиновых рецепторов в периферической крови больных с острым и хроническим дебютом впервые выявленного саркоидоза.

Материалы и методы

Объектом исследования служила венозная кровь больных с хроническим ($n = 63$) или острым ($n = 19$) дебютом саркоидоза в возрасте 20-65 лет, не получавших иммуносупрессивную терапию, в том числе системные кортикостероиды, и плазмаферез. Все больные саркоидозом проходили обследование на базе клиники НИИ интерстициальных и орфанных заболеваний легких при ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России. Диагноз саркоидоз для больных с хроническим дебютом был подтвержден с помощью гистологического исследования у 100% больных. Диагноз острый саркоидоз (синдром Леффрена) был поставлен в соответствии с характерными клиническими симптомами. В качестве контроля использовали образцы периферической крови 48 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными саркоидозом. Все исследования были проведены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Образцы венозной крови получали собирали в вакуумные пробирки с содержанием K_3 ЭДТА. Все исследования проводились в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными Зурочкой и соавторами [2]. Для выявления Т-хелперов периферической крови использовали антитела против CD3 (клон UCST1) и CD4 (клон 13B8.2), Т-хелперы выявляли как $CD3^+CD4^+$ лимфоциты. С целью выявления отдельных популяций Th, находящихся на различных стадиях дифференцировки применяли антитела против поверхностных CD45RA (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4)) и CD62L (клон DREG56). «Наивные» Th с фенотипом $CD45RA^+CD62L^+$ для дальнейших исследований не использовали в силу отсут-

ствия экспрессии интересующих хемокиновых рецепторов на их поверхности [3]. «Терминально-дифференцированные» $CD45RA$ -позитивные эффекторные Т-хелперы (TEMRA) с фенотипом $CD45RA^+CD62L^-$ также исключались из дальнейшего анализа ввиду практически полного отсутствия данной популяции клеток в периферической крови условно здоровых доноров. В рамках проведенного исследования основное внимание было уделено Th памяти, которые на основании экспрессии CD62L и CD45RA подразделялись на Т-хелперы центральной (CM Th) и эффекторной (EM Th) памяти с фенотипами $CD45RA-CD62L^+$ и $CD45RA-CD62L^-$ соответственно. На указанных выше субпопуляциях Th, находившихся на разных стадиях дифференцировки, при помощи моноклональных антител анализировали уровень экспрессии следующих хемокиновых рецепторов: CCR4 (CD194, клон L291H4), CCR6 (CD196, клон G034E3), CXCR3 (CD183, клон G025H7) и CXCR5 (CD185, клон J252D4). В работе использовали антитела против CD3, CD4, CD45RA и CD62L, конъюгированные с APC-AlexaFluor750, Pacific Blue, FITC и PE соответственно (Beckman Coulter, США), а антитела против CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 были конъюгированы с Brilliant Violet 510™, PE/Cy7, APC и PerCP/Cy5.5 соответственно (Biolegend, США). Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США), к 975 мкл которого ex tempore добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOtest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 330 g в течение 7 минут, после чего надосады удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2-7,4, содержащем 2% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v. 1.2 и Kaluza™ v. 2.0 (Beckman Coulter, США). Анализ коэкспрессии хемокиновых рецепторов CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 проводили с применением тактики «гейтирования», основанной на иерархических дендрограммах для CM и EM клеток памяти, описанной детально ранее [3, 16].

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона хи-квадрат. Результаты выра-

жали в виде % позитивных клеток от искомой популяции и приводили в виде медианы и интерквартильного размаха (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})). Сравнение уровней экспрессии основных хемокиновых рецепторов Т-хелперами различных стадий дифференцировки проводили при помощи U-критерия Манна–Уитни.

Результаты

В ходе проведенного исследования было показано, что относительное содержание Т-лим-

фоцитов было достоверно снижено в группе больных с хроническим дебютом саркоидоза при сравнении с группой пациентов с острым дебютом саркоидоза и группой контроля (69,54% (61,15-74,36) против 75,37% (72,33-78,02) и 78,49% (73,81-80,77) при p = 0,003 и p < 0,001 соответственно). Абсолютное содержание CD3⁺ лимфоцитов между больными с острым и хроническим дебютом заболевания достоверно не различалось (p = 0,557) и составляло 982 кл/мкл (712-1259) и 946 кл/мкл (689-1139) соответственно, что

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ И АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ЭКСПРЕССИИ CD45RA И CD62L, У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ И ОСТРЫМ ДЕБЮТОМ САРКОИДОЗА (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})), РЕЗУЛЬТАТЫ ПРЕДСТАВЛЕНЫ В ВИДЕ ОТНОСИТЕЛЬНОГО (% ОТ ОБЩЕГО ЧИСЛА ЛИМФОЦИТОВ) И АБСОЛЮТНОГО (#, КОЛ-ВО КЛЕТОК В 1 мкл ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ) ЧИСЛА ЛИМФОЦИТОВ

TABLE 1. RELATIVE (% WITH TOTAL LYMPHOCYTES SUBSET, %) AND ABSOLUTE (NUMBER OF CELLS IN 1 μL OF PERIPHERAL BLOOD, #) OF Th SUBSETS USING CD45RA-vs.-CD62L CLASSIFICATION IN PATIENTS WITH CHRONIC (NON-LOFGREN'S SYNDROMES, nLS, n = 63) AND ACUTE (LOFGREN'S SYNDROMES, LS, n = 19) SARCOIDOSIS VERSUS HEALTHY CONTROL (HC, n = 48). THE QUANTITATIVE DATA ARE REPRESENTED AS MEDIAN AND QUARTILE RANGES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Популяция Th Th subset		Хронический nLS	Острый LS	Контроль HC	p
«Наивные» Th (CD45RA ⁺ CD62L ⁺) "Naïve" Th (CD45RA ⁺ CD62L ⁺)	%	11,90 (7,12-17,32)	13,18 (10,41-16,15)	14,56 (12,44-18,51)	p ₁₋₂ = 0,222 p ₁₋₃ = 0,006 p ₂₋₃ = 0,204
	#	159 (77-235)	177 (113-225)	217 (188-325)	p ₁₋₂ = 0,342 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,005
Th центральной памяти (CD45RA ⁻ CD62L ⁺) Central memory Th (CD45RA ⁻ CD62L ⁺)	%	14,79 (12,52-18,23)	16,31 (12,90-21,01)	19,20 (16,74-22,98)	p ₁₋₂ = 0,121 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,066
	#	208 (143-288)	204 (157-323)	333 (267-469)	p ₁₋₂ = 0,571 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,001
Th эффекторной памяти (CD45RA ⁻ CD62L ⁻) Effector memory Th (CD45RA ⁻ CD62L ⁻)	%	8,13 (6,06-10,45)	12,31 (10,28-15,64)	10,62 (9,00-13,07)	p ₁₋₂ < 0,001 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,130
	#	117 (75-171)	157 (115-238)	178 (139-231)	p ₁₋₂ = 0,025 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,279
TEMRA Th (CD45RA ⁻ CD62L ⁺)	%	0,53 (0,11-1,36)	1,71 (0,33-6,52)	0,29 (0,12-0,95)	p ₁₋₂ = 0,004 p ₁₋₃ = 0,312 p ₂₋₃ < 0,001
	#	7 (2-22)	25 (5-83)	5 (2-15)	p ₁₋₂ = 0,012 p ₁₋₃ = 0,816 p ₂₋₃ = 0,006

Примечание. p₁₋₂ – различия между группами пациентов с острым и хроническим дебютом саркоидоза достоверны; p₁₋₃ – различия достоверны между группами пациентов с хроническим дебютом саркоидоза и контролем; p₂₋₃ – различия достоверны между группами пациентов с острым дебютом саркоидоза и контролем. Различия достоверны согласно U-критерию Манна–Уитни.

Note. p₁₋₂, the differences between LS and nLS groups; p₁₋₃, the differences between nLS and healthy control groups; p₂₋₃, the differences between LS and healthy control groups. Differences between the groups calculated by nonparametric Mann–Whitney U test are shown.

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ «ПОЛЯРИЗОВАННЫХ» Т-ХЕЛПЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В РАМКАХ ОБЩЕГО ПУЛА Т-ХЕЛПЕРОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ПАМЯТИ ПРИ САРКОИДОЗЕ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. RELATIVE NUMBER OF MAIN "POLARIZED" Th SUBSETS IN PERIPHERAL BLOOD FROM PATIENTS WITH CHRONIC (NON-LOFGREN'S SYNDROMES, nLS, n = 63) AND ACUTE (LOFGREN'S SYNDROMES, LS, n = 19) SARCOIDOSIS VERSUS HEALTHY CONTROL (HC, n = 48). THE QUANTITATIVE DATA ARE REPRESENTED AS MEDIAN AND QUARTILE RANGES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Популяция Th Th subsets	Хронический nLS	Острый LS	Контроль HC	p
Th1	9,64% (7,06-13,65)	11,25% (8,31-15,25)	13,80% (11,24-18,03)	p ₁₋₂ = 0,229 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,053
Th2	11,96% (9,86-14,78)	13,39% (9,52-16,85)	10,67% (9,13-12,98)	p ₁₋₂ = 0,895 p ₁₋₃ = 0,048 p ₂₋₃ = 0,164
Th17	39,50% (32,66-45,88)	38,53% (33,09-41,37)	37,24% (33,46-43,25)	p ₁₋₂ = 0,672 p ₁₋₃ = 0,278 p ₂₋₃ = 0,829
Tfh	18,23% (15,53-23,42)	19,36% (15,52-23,01)	18,16% (16,50-21,63)	p ₁₋₂ = 0,934 p ₁₋₃ = 0,854 p ₂₋₃ = 0,776

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for table 1.

было достоверно ($p = 0,001$ и $p < 0,001$ соответственно) ниже значений контрольной группы – 1270 кл/мкл (1090-1580). Более того, при хроническом дебюте саркоидоза нами было отмечено достоверное снижение CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов относительно как больных с острым дебютом, так и группы контроля (38,94% (31,33-44,24) против 48,96% (43,34-53,54) и 47,63% (43,82-52,73) соответственно, при $p < 0,001$ в обоих случаях). Концентрация Т-хелперов в периферической крови была снижена при сравнении с контролем в обеих группах больных (775 кл/мкл (671-1053) против 607 кл/мкл (490-743) в случае острого и 505 кл/мкл (372-704) в случае хронического дебютов при $p = 0,003$ и $p < 0,001$ соответственно), тогда как сами пациенты саркоидозом между группами не различались ($p = 0,074$).

Следующим этапом проведенного нами исследования был анализ уровня дифференцировки Т-хелперов периферической крови у больных саркоидозом, результаты которого приведены в таблице 1. Показано, что при хроническом дебюте саркоидоза в циркуляции снижается как относительное, так и абсолютное содержание «наивных» Т-хелперов, а также СМ и ЕМ Т-хелперов при сравнении с контрольными значениями. Тогда как для острого дебюта было характерно сниженное содержание только «наивных» и СМ клеток. Следует также подчеркнуть и тот факт, что у больных с острым дебютом заболевания отмече-

но увеличение доли и концентрации в периферической крови ЕМ клеток, способных к миграции в периферические воспаленные ткани, при сравнении с пациентами, у которых наблюдалась хроническая форма саркоидоза (12,31% (10,28-15,64) против 8,13% (6,06-10,45) при $p < 0,001$, а также 157 кл/мкл (115-238) против 117 кл/мкл (75-171) при $p = 0,025$ соответственно). Более того, при анализе Т-хелперов популяции ТЕМРА отмечено увеличение как относительного, так и абсолютного содержания клеток данной популяции у больных с острым дебютом относительно контрольных значений ($p < 0,001$ и $p = 0,006$ соответственно), так и пациентов с хроническим дебютом ($p = 0,004$ и $p = 0,012$ соответственно).

В ходе дальнейших исследований особое внимание было уделено Т-хелперам популяций СМ, способным к миграции во вторичные лимфоидные органы, и ЕМ, которые могут покидать кровеносное русло и мигрировать в очаги воспаления в периферических тканях. При анализе субпопуляционного состава СМ Th у больных саркоидозом нами была отмечена тенденция к снижению доли Th1 и увеличение процентного содержания Th2 (табл. 2). Однако достоверные различия по содержанию Th1 и Th2 клеток были отмечены только у пациентов с хроническим дебютом (9,64% (7,06-13,65) против 13,80% (11,24-18,03) в контроле при $p < 0,001$, а также 11,96% (9,86-14,78) против 10,67% (9,13-12,98) в

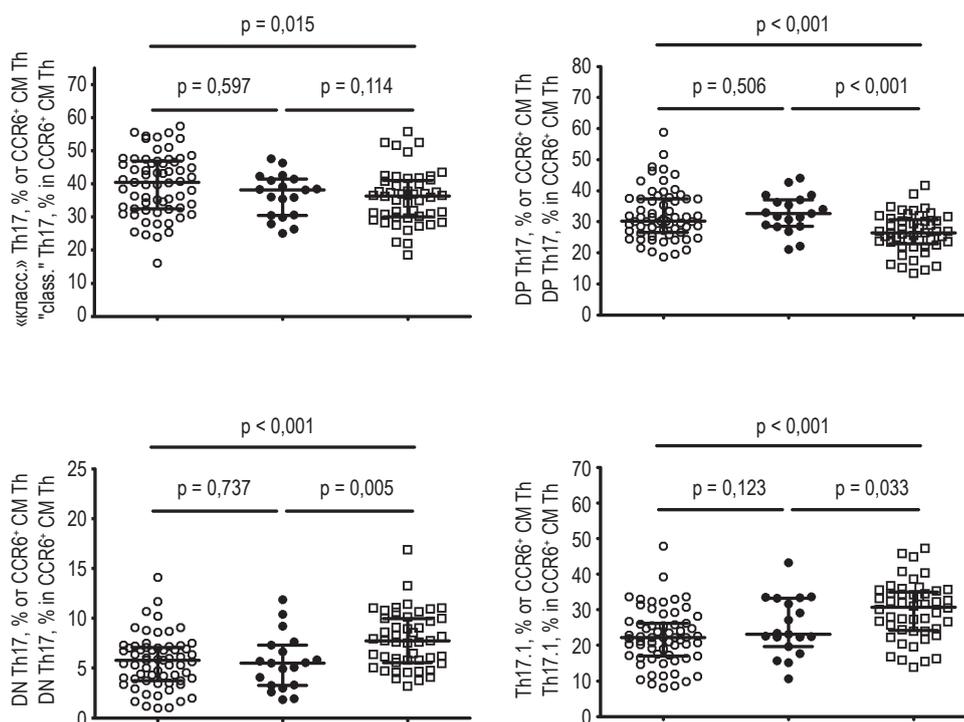


Рисунок 1. Распределение Th17 по основным субпопуляциям клеток в пределах общего пула CCR6⁺Th центральной памяти (CM) с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺

Примечание. Здесь и на рисунке 2: белые круги – больные с хронической формой саркоидоза (n = 63); черные круги – больные с острой формой саркоидоза (n = 19); квадраты – группа условно здоровых доноров (n = 48). Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})). Различия между сравниваемыми группами указаны согласно непараметрическому критерию Манна–Уитни. Основные субпопуляции Th17-клеток обладают следующими фенотипами: «классические» Th17 – CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻; «дважды-позитивные» DP Th17 – CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺; «не классические» или Th17.1 – CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁺, а также «дважды-негативные» DN Th17 – CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁻.

Figure 1. Relative numbers of main Th17 subsets within total CCR6⁺ central memory Th cells (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺, CM). Note. Hereinafter, symbols in Figure 1 and 2 denote the following groups: white circles, patients with chronic sarcoidosis (non-Lofgren's Syndromes, n = 48); black circles, patients with acute sarcoidosis (Lofgren's Syndromes, n = 19); white squares, healthy control group (n = 48). The data are presented as median with interquartile range (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})). Differences between the groups calculated by nonparametric Mann-Whitney U test are shown. Among CCR6⁺T cells, four subsets expressing different patterns of CCR4 and CXCR3 were identified: "classical" Th17 (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻), "double positive" DP Th17 (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺), "non classical" Th17.1 (CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁺) and "double negative" Th17 (CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁻).

контроле при p = 0,048 соответственно). Достоверных различий по относительному содержанию CXCR5⁺CCR6⁺Th17 и CXCR5⁺ фолликулярным T-хелперам (Tfh) отмечено не было. Более того, при анализе ключевых субпопуляций «поляризованных» Th в пределах общего пула EM T-хелперов нами отмечено не было.

Среди CCR6⁺CM и EM Th нами были выделены четыре основные субпопуляции Th17, которые различались как по паттернам экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR4, так и по спектру функциональных активностей [34, 44]. В настоящее время выделяют «классические» Th17 с фенотипом CCR4⁺CXCR3⁻, CCR4⁺CXCR3⁺ Th17 обозначаемые как «дважды-позитивные» или DP Th17, затем «не классические» CCR4⁻CXCR3⁺ или

Th17.1 и, наконец, «дважды-негативные» CCR4⁻CXCR3⁻ или DN Th17 лимфоциты. На рисунке 1 приведены результаты сравнения относительно содержания указанных выше популяций CM Th17 у пациентов с хроническим и острым дебютами саркоидоза, а также условно здоровых доноров. У пациентов с хроническим дебютом саркоидоза в рамках общего пула CCR6⁺CM Th отмечено снижение «не классических» Th17 и DN Th17 относительно значений группы контроля (22,15% (16,98-26,11) против 30,65% (24,14-34,93) при p < 0,001 и 5,76% (3,76-7,05) против 7,73% (5,66-10,03) при < 0,001 соответственно). Тогда как уровень CCR4-экспрессирующих типов популяций этих клеток – «классических» и DP Th17 – у пациентов, входивших в группу хрони-

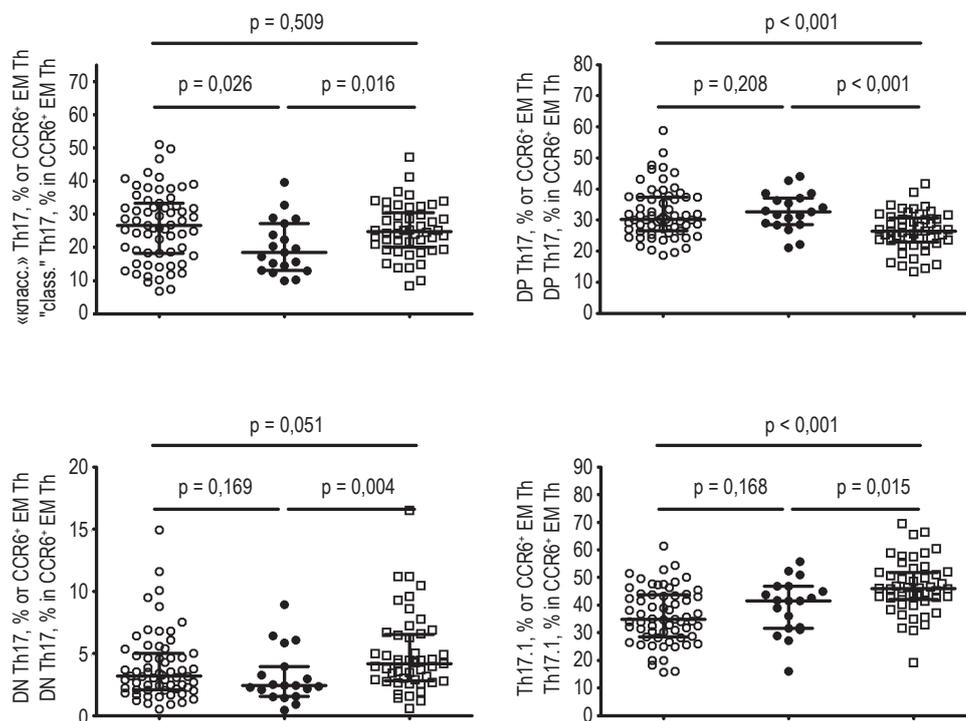


Рисунок 2. Распределение Th17 по основным субпопуляциям клеток в пределах общего пула CCR6⁺Th эффекторной памяти (EM) с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Relative numbers of main Th17 subsets within total CCR6⁺ effector memory Th cells (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁻; EM)

Note. As for Figure 1.

ческого саркоидоза, был достоверно выше контрольных показателей (40,39% (32,41-46,88) против 36,28% (30,05-40,96) при $p = 0,015$ и 30,29% (26,57-37,43) против 26,40% (22,93-30,60) при $p < 0,001$ соответственно). Для острого дебюта саркоидоза было характерно увеличение при сравнении с условно здоровыми добровольцами доли DP Th17 ($p < 0,001$) на фоне снижения уровней DP и «не классических» Th17 ($p = 0,005$ и $p = 0,033$ соответственно).

Сходная динамика изменения баланса между отдельными субпопуляциями Th17 была отмечена при исследовании CCR6-позитвных EM Th, способных покинуть циркуляцию и мигрировать на периферию (рис. 2). Так, для пациентов с хроническим и острым дебютами саркоидоза наблюдалось увеличение доли DP Th17 с 23,72% (19,24-36,90) до 31,83% (24,05-41,00) и 36,12% (27,24-48,01) соответственно (в обоих случаях $p < 0,001$), а также снижения «не классических» Th17 с 45,89% (41,96-51,87) до 34,86% (28,52-43,77) и 41,57% (31,55-46,86) соответственно (при $p < 0,001$ и $p = 0,015$ соответственно). При остром

дебюте заболевания имело место снижение DN Th17 относительно контроля ($p = 0,004$), тогда как уровень «классических» Th17 был достоверно ниже не только при сравнении с контрольными показателями (18,54% (13,08-27,16) против 24,71% (20,11-30,43), $p = 0,004$), но и значений, полученных для пациентов с хроническим саркоидозом (18,54% (13,08-27,16) против 26,67% (18,16-33,33), $p = 0,026$).

Обсуждение

В настоящем исследовании были сопоставлены показатели у больных с разными формами саркоидоза до назначения им терапии и показано, что среди циркулирующих лимфоцитов уровень CD3⁺T-клеток и CD3⁺CD4⁺T-хелперов существенно снижен у больных хронической формой саркоидоза по сравнению с острой формой и группой контроля. Снижение уровня CD3⁺ и CD3⁺CD4⁺ клеток в периферической крови было отмечено при сравнении больных саркоидозом и условно здоровых добровольцев [43]. Вероятно, это может быть связано с более интенсив-

ным процессом перераспределения лимфоцитов из периферической крови в легочную ткань при хроническом течении саркоидоза относительно острого. Полученные данные указывают на более глубокую степень анергии периферического ответа общей популяции Т-лимфоцитов-хелперов при хронической форме заболевания с менее благоприятным течением и прогнозом.

Более того, при хроническом дебюте саркоидоза нами показано достоверное снижение относительного и абсолютного содержания Т-хелперов, находящихся на различных стадиях созревания за исключением клеток популяции TEMRA (табл. 1). Большинство исследований указывают на тот факт, что при саркоидозе наблюдается снижение пула «наивных» Т-хелперов за счет прироста более высоко дифференцированных субпопуляций Th [11, 40], хотя эти данные подтверждаются не всеми работами [43]. При остром дебюте саркоидоза изменения в субпопуляционном составе Th не носят столь выраженный характер, хотя нами было отмечено снижение концентрации «наивных» клеток и клеток центральной памяти. Следует отметить, что в популяции «наивных» Th большинство клеток обладает уникальными Т-клеточными рецепторами, способными к распознаванию широчайшего спектра новых антигенов [32], тогда как их уменьшение в циркуляции может сопровождаться снижением эффективности иммунных реакций при первичном контакте с патогенами. С другой стороны, существенное ускорение ответа на уже «знакомые» клеткам памяти антигены реализуется благодаря высокой степени дифференцировки клеток памяти (вследствие осуществленного ранее распознавания ими антигена и способности к быстрой активации и пролиферации) при существенно более низком пороге антигенной нагрузки по сравнению с «наивными» и эффекторными Т-лимфоцитами [32]. Таким образом, наблюдаемые при саркоидозе нарушения могут сопровождаться анергией Т-клеточного ответа в целом. С другой стороны, благоприятное течение саркоидоза – острый дебют заболевания – было тесно связано с увеличением в периферической крови Th-эффекторной памяти и TEMRA, уровни которых превосходили значения, полученные для хронического дебюта, а в случае TEMRA – еще и значений контроля. Прирост в циркуляции этих клеток может указывать на интенсивные процессы выселения созревших в лимфоидной ткани Th, обладающих выраженными эффекторными свойствами, на периферию, и, по-видимому, тесно связан с завершением иммунного ответа на антигены, вызвавшие активацию всей системы защитных реакций организма. Таким образом, острое начало заболевания, обусловленное кли-

нико-генетическими особенностями ответа организма на антигенную нагрузку, а, возможно, еще и ответом на несколько иной спектр антигенов, протекает с реализацией несколько различающимися характеристиками иммунного ответа (по сравнению с хроническим течением).

Настоящее исследование посвящено анализу различных популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов на основании экспрессии ими рецепторов к хемокинам с целью выяснения ряда ключевых механизмов иммунопатогенеза саркоидоза. Анализ экспрессии хемокиновых рецепторов и содержание их лигандов в биологических жидкостях и тканях позволяет сделать достаточно достоверные выводы о процессах перераспределения клеток в процессе развития заболевания и внести существенный вклад в понимание механизмов иммунопатогенеза. Так, проведенный анализ субпопуляционного состава «поляризованных» Т-хелперов показал, что при неблагоприятном хроническом дебюте саркоидоза имеет место изменение баланса между Th1- и Th2-клетками в пределах CM Th (табл. 2). Следует отметить, что длительное время патогенез саркоидоза было связано с гиперактивацией Th1-клеток [29], несколько позднее в литературе стали обосновывать ключевую роль в развитии данного патологического состояния нарушением соотношения Th1 и Th17 в очагах формирования гранулем [14]. В настоящее время принято также обращать внимание на потенциальное участие Th2 в гранулемообразовании [42]. Данное предположение подтверждается не только результатами собственных исследований, но и клиническими наблюдениями, которые указывают на прирост уровня CCR4⁺CD4⁺ клеток в периферической крови больных саркоидозом, равно как и на увеличение концентрации хемокина лиганда для этого хемокинового рецептора CCL17 как в сыворотке крови больных [23], так и локально в очаге формирования гранулемы [31]. Более того, в классических экспериментальных работах на *in vivo* моделях фиброза легких была показана ключевая роль лигандов CCR4 (в первую очередь, CCL17, но и CCL22) в фиброзировании тканей, когда блокада эффектов CCL17 у мышей приводила к уменьшению очага поражения [6]. Избыточная активация Th2 у пациентов с саркоидозом также подтверждается данными об увеличении в мононуклеарной фракции клеток крови уровня экспрессии мРНК IL-13 – одного из ключевых цитокинов Th2 [18]. Более того, в экспериментах на лабораторных животных [24] и при анализе образцов тканей, полученных от больных саркоидозом [38], было показано, что гиперпродукция цитокинов Th2 сопровождается активацией и дифференцировкой тканевых макрофагов в сто-

рону M2, что способствует развитию и поддержанию очагов хронического воспаления в тканях, формированию гранулем и очагов фиброза.

Помимо баланса между Th1 и Th2 в исследованиях, посвященных патогенезу саркоидоза, особое внимание уделяется роли Th17 и их отдельных субпопуляций. Данные о динамике Th17 в периферической крови весьма противоречивы, так как встречаются работы, указывающие на увеличение уровня CCR6⁺ эффекторных Т-хелперов (CD45RA-CD45R0⁺) у больных по сравнению с группой контроля [35], так и свидетельствующие о том, что, например, уровень IL-17A-продуцирующих клеток в периферической крови больных был существенно ниже значений контроля [43]. Собственные результаты указывают на отсутствие достоверных различий по уровню CCR6-экспрессирующих SM и EM Th-клеток не только между группами с больных с острым или хроническим дебютом саркоидоза, но и с группой сравнения. Вместе с тем большинством исследователей отмечается увеличение в сыворотке крови больных уровня таких цитокинов и хемокинов, как IL-6, IL-17, IL-22, IFN γ и CCL20, синтезируемых Th17 [11]. При этом в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) и также в гранулематозной ткани показано не только увеличение уровня этих цитокинов, но еще и клеток, участвующих в их продукции [28]. Более того, в лимфатических узлах, прилежащих к легким, уровень всех CCR6⁺Th, включая «классические» и, в первую очередь, Th17.1-клетки, был существенно повышен по сравнению с контролем [9]. Однако, помимо указанных субпопуляций Th17, в лимфатических узлах больных отмечалось увеличение доли DP Th17. Увеличение именно этой субпопуляции Th17-клеток было показано нами при анализе SM и EM Th периферической крови в рамках проведенного исследования (рис. 1 и 2). Следует отметить, что среди всех субпопуляций Th17 именно DP Th17 отличаются повышенной способностью мигрировать в периферические ткани различной локализации благодаря высокому уровню экспрессии адгезионных молекул и хемокиновых рецепторов, ответственные за проникновение в воспаленные ткани кишечника (β 7-интегрин и CXCR3), дерму кожи (CCR2 и CCR4) и слизистые оболочки мочеполовой системы (β 1-интегрин) [44]. Вместе с тем в условиях *in vitro* в ответ на стимуляцию DP Th17 практически не отвечали секрецией IL-17F, IL-22 и CCL20, а уровни продукции IFN γ , IL-17A, TNF α и IL-13 были самыми низкими при сравнении с остальными типами Th17-клеток. Однако под действием цитокинов IL-1 β , IL-6 и IL-23, необходимых для «поляризации» в сторо-

ну Th17, или IL-12, ответственного за дифференцировку Th0 в сторону Th1, большинство клеток популяции DP Th17, по крайней мере, в условиях *in vitro* приобретало фенотип и свойства «не классических» Th17 [44].

Как уже нами было отмечено выше, именно «не классические» Th17- или Th17.1-клетки, по-видимому, являются основными продуктами IFN γ при формировании гранулем [17, 30]. В ходе собственных исследований нами было отмечено снижение относительного содержания CXCR3⁺CCR6⁺Th17.1-клеток в периферической крови больных обеих групп при сравнении с контролем (рис. 1, 2). Следует отметить, что у больных саркоидозом в ЖБАЛ многими исследователями отмечалось увеличение уровней лигандов для хемокиновых рецепторов CXCR3 (например, CXCL10 [5]) и CCR6 (CCL20 [13]), представленных на поверхности Th17.1. Можно предполагать, что данная популяция клеток может более эффективно, по сравнению с остальными типами Th17, мигрировать по градиенту этих хемокинов и селективно накапливаться в очаге воспаления. Хотя до настоящего времени эти предположения основываются лишь на косвенных данных, связанных с преимущественным обнаружением в очагах гранулемообразования и ЖБАЛ клеток именно Th17.1-фенотипа [9, 35].

Детальный анализ субпопуляционного состава Th17 позволил обнаружить, что больные с острым и хроническим дебютами саркоидоза различаются по уровню «классических» CCR4⁺CXCR3⁺Th17 в рамках общего пула Th эффекторной памяти (рис. 2). «Классические» Th17 могут быть представлены двумя основными фенотипами клеток, несущими на своей поверхностной мембране только CCR6 или же коэкспрессирующие CCR6 и CCR4 [37]. Эти клетки способны к синтезу большого количества IL-17A в ответ на стимуляцию, тогда как продукция остальных цитокинов, в первую очередь IL-22 и GM-CSF, у них менее выражена. Отдельного внимания заслуживает популяция клеток с фенотипом CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺, в рамках которой, помимо «классических» Th17, присутствуют еще и Th22. Основными лигандами для CCR4 являются хемокины CCL17 или TARC (от англ. thymus and activation-regulated chemokine) и CCL22 или MDC (от англ. macrophage-derived chemokine), уровни которых были повышены в периферической крови больных саркоидозом [23]. Для Th22 характерна не только экспрессия CCR6 и CCR4 на поверхностной мембране, но и наличие CCR10, отвечающего за направленную миграцию клеток в дерму кожи [12]. Th22 продуцируют такие цитокины, как IL-22, IL-26 и IL-13, причем именно

IL-22 является наиболее важным с точки зрения реализации функций этих клеток в очаге воспаления [22]. С использованием нескольких независимых *in vivo* моделей фиброза легких у экспериментальных животных было показано, что нейтрализация IL-22 сопровождалась увеличением инфильтрации ткани легкого нейтрофилами периферической крови и увеличением очага поражения [10], а также вызывала усиление отложения коллагена в тканях воспаленного легкого [40]. Полученные нами результаты, указывающие на снижение в крови Th22, ответственных за продукцию IL-22, у пациентов с благоприятным прогнозом течения саркоидоза, также косвенно указывают на важность этого цитокина и клеток, способных к его синтезу и секреции, в процессах гранулемообразования.

Вместе с тем следует подчеркнуть, что основные данные о функциях и «пластичности» Th17, Th17.1 и Th22 получены в условиях *in vitro* при создании различного цитокинового микроокружения, влияющего на дифференцировку лимфоцитов. При анализе механизмов развития

саркоидоза и формирования гранулем остаются неразрешенными некоторые ключевые вопросы, к числу которых относятся: каким образом феномен пластичности Th17 коррелирует с типами течения саркоидоза и его прогнозом; каковы закономерности превращения одних популяций клеток в популяции с совершенно иными свойствами; какова роль разных субпопуляций в очаге воспаления и в чем заключается их влияние на клиническое течение заболевания; и, наконец, какие новые точки приложения могут быть намечены для планирования успешной таргетной терапии. Для более полной характеристики патологических процессов и ролей разных субпопуляций Т-лимфоцитов в иммунопатогенезе саркоидоза необходимы дальнейшие клинико-иммунологические сопоставления данных, полученных в динамике при сравнительном анализе исследуемых параметров в периферической крови, ЖБАЛ и материалах биопсии легочной ткани, что позволит выполнить интегральную оценку процессов, протекающих на уровне всего организма.

Список литературы / References

1. Визель А.А., Визель И.Ю., Амиров Н.Б. Эпидемиология саркоидоза в Российской Федерации // Вестник современной клинической медицины, 2017. Т. 10, № 5. С. 66-73. [Vizel A.A., Vizel I.Yu., Amirov N.B. Epidemiology of sarcoidosis in the Russian Federation. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny = Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*, 2017, Vol. 10, no. 5, pp. 66-73. (In Russ.)]
2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: Уральское отделение РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in biomedical research]. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018. 720 p.
3. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинцев И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян А.А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 3. С. 239-250. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinets I.I., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Totolian A.A. Chemokine receptors at distinct differentiation stages of T-helpers from peripheral blood. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 239-250. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250.
4. Лазарева Н.М., Кудрявцев И.В., Баранова О.П., Серебрякова М.К., Бажанов А.А., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян А.А. Анализ субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови больных саркоидозом при разной степени активности заболевания // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1081-1098. [Lazareva N.M., Kudryavtsev I.V., Baranova O.P., Serebriakova M.K., Bazhanov A.A., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. Peripheral blood B cell subsets from patients with various activity of chronic sarcoidosis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1081-1098. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1081-1098.
5. Agostini C., Cassatella M., Zambello R., Trentin L., Gasperini S., Perin A., Piazza F., Siviero M., Facco M., Dziejman M., Chilosio M., Qin S., Luster A.D., Semenzato G. Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 161, no. 11, pp. 6413-6420.
6. Belperio J.A., Dy M., Murray L., Burdick M.D., Xue Y.Y., Strieter R.M., Keane M.P. The role of the Th2 CC chemokine ligand CCL17 in pulmonary fibrosis. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 7, pp. 4692-4698.
7. Bennett D., Bargagli E., Refini R.M., Rottoli P. New concepts in the pathogenesis of sarcoidosis. *Expert Rev. Respir. Med.*, 2019, Vol. 13, no. 10, pp. 981-991.
8. Broos C.E., Hendriks R.W., Kool M. T-cell immunology in sarcoidosis: Disruption of a delicate balance between helper and regulatory T-cells. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2016, Vol. 22, no. 5, pp. 476-483.
9. Broos C.E., Koth L.L., van Nimwegen M., In 'tVeen J.C.C.M., Paulissen S.M.J., van Hamburg J.P., Annema J.T., Heller-Baan R., Kleinjan A., Hoogsteden H.C., Wijsenbeek M.S., Hendriks R.W., van den Blink B., Kool M. Increased T-helper 17.1 cells in sarcoidosis mediastinal lymph nodes. *Eur Respir J.*, 2018, Vol. 51, no. 3, 1701124. doi: 10.1183/13993003.01124-2017.

10. Broquet A., Jacqueline C., Davieau M., Besbes A., Roquilly A., Martin J., Caillon J., Dumoutier L., Renaud J.C., Heslan M., Josien R., Asehnoune K. Interleukin-22 level is negatively correlated with neutrophil recruitment in the lungs in a *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia model. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 11010. doi: 10.1038/s41598-017-11518-0.
11. Ding J., Dai J., Cai H., Gao Q., Wen Y. Extensively disturbance of regulatory T cells – Th17 cells balance in stage II pulmonary sarcoidosis. *Int. J. Med. Sci.*, 2017, Vol. 14, no. 11, pp. 1136-1142.
12. Duhon T., Geiger R., Jarrossay D., Lanzavecchia A., Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, no. 8, pp. 857-863.
13. Facco M., Baesso I., Miorin M., Bortoli M., Cabrelle A., Boscaro E., Gurrieri C., Trentin L., Zambello R., Calabrese F., Cassatella M.A., Semenzato G., Agostini C. Expression and role of CCR6/CCL20 chemokine axis in pulmonary sarcoidosis. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 82, no. 4, pp. 946-955.
14. Facco M., Cabrelle A., Teramo A., Olivieri V., Gnoato M., Teolato S., Ave E., Gattazzo C., Fadini G.P., Calabrese F., Semenzato G., Agostini C. Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder. *Thorax*, 2011, Vol. 66, no. 2, pp. 144-150.
15. Georas S.N., Chapman T.J., Crouser E.D. Sarcoidosis and T-helper cells. Th1, Th17, or Th17.1? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2016, Vol. 193, no 11, pp. 1198-1200.
16. Golovkin A., Kalinina O., Bezrukikh V., Aquino A., Zaikova E., Karonova T., Melnik O., Vasilieva E., Kudryavtsev I. Imbalanced immune response of T-Cell and B-Cell subsets in patients with moderate and severe COVID-19. *Viruses*, 2021, Vol. 13, no. 10, 1966. doi: 10.3390/v13101966.
17. Greaves S.A., Atif S.M., Fontenot A.P. Adaptive immunity in pulmonary sarcoidosis and chronic beryllium disease. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 474. doi: 10.3389/fimmu.2020.00474.
18. Hauber H.P., Gholami D., Meyer A., Pforte A. Increased interleukin-13 expression in patients with sarcoidosis. *Thorax*, 2003, Vol. 58, no. 6, pp. 519-524.
19. Huang H., Lu Z., Jiang C., Liu J., Wang Y., Xu Z. Imbalance between Th17 and regulatory T-Cells in sarcoidosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, Vol. 14, no. 11, pp. 21463-21473.
20. Kudryavtsev I., Serebriakova M., Starshinova A., Zinchenko Y., Basantsova N., Malkova A., Soprun L., Churilov L.P., Toubi E., Yablonskiy P., Shoenfeld Y. Imbalance in B cell and T follicular helper cell subsets in pulmonary sarcoidosis. *Sci Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 1059. doi: 10.1038/s41598-020-57741-0.
21. Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Baranova O.P., Golovkin A.S., Isakov D.V., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. CD39⁺ expression by regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis and Löfgren's syndrome. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 3. pp. 467-478. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-467-478.
22. Kumar P., Rajasekaran K., Palmer J.M., Thakar M.S., Malarkannan S. IL-22: An evolutionary missing-link authenticating the role of the immune system in tissue regeneration. *J. Cancer.*, 2013, Vol. 4, no. 1, pp. 57-65.
23. Lazareva N.M., Baranova O.P., Kudryavtsev I.V., Isakov D.V., Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. chemokines CCL17 and CCL22 in sarcoidosis. *Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 4, pp. 791-798. doi: 10.15789/1563-0625-CCA-2340.
24. Locke L.W., Crouser E.D., White P., Julian M.W., Caceres E.G., Papp A.C., Le V.T., Sadee W., Schlesinger L.S. IL-13-regulated macrophage polarization during granuloma formation in an *in vitro* human sarcoidosis model. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2019, Vol. 60, no. 1, pp. 84-95.
25. Loke W.S., Herbert C., Thomas P.S. Sarcoidosis: immunopathogenesis and immunological markers. *Int. J. Chronic Dis.*, 2013, Vol. 2013, 928601. doi: 10.1155/2013/928601.
26. Ly N.T.M., Ueda-Hayakawa I., Nguyen C.T.H., Okamoto H. Exploring the imbalance of circulating follicular helper CD4⁺ T cells in sarcoidosis patients. *J. Dermatol. Sci.*, 2020, Vol. 97, no. 3, pp. 216-224.
27. Malkova A., Starshinova A., Zinchenko Y., Gavrilova N., Kudryavtsev I., Lapin S., Mazing A., Surkova E., Pavlova M., Belaeva E., Stepanenko T., Yablonskiy P., Shoenfeld Y. New laboratory criteria of the autoimmune inflammation in pulmonary sarcoidosis and tuberculosis. *Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 227, 108724. doi: 10.1016/j.clim.2021.108724.
28. Miedema J.R., Kaiser Y., Broos C.E., Wijsenbeek M.S., Grunewald J., Kool M. Th17-lineage cells in pulmonary sarcoidosis and Löfgren's syndrome: Friend or foe? *J. Autoimmun.*, 2018, Vol. 87, pp. 82-96.
29. Moller D.R. Cells and cytokines involved in the pathogenesis of sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.*, 1999, Vol. 16, no. 1, pp. 24-31.
30. Mortaz E., Rezayat F., Amani D., Kiani A., Garssen J., Adcock I.M., Velayati A. The Roles of T Helper 1, T Helper 17 and regulatory T Cells in the pathogenesis of sarcoidosis. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 2016, Vol. 15, no. 4, pp. 334-339.
31. Nguyen C.T.H., Kambe N., Ueda-Hayakawa I., Kishimoto I., Ly N.T.M., Mizuno K., Okamoto H. TARC expression in the circulation and cutaneous granulomas correlates with disease severity and indicates Th2-mediated progression in patients with sarcoidosis. *Allergol. Int.*, 2018, Vol. 67, no. 4, pp. 487-495.
32. Nguyen Q.P., Deng T.Z., Witherden D.A., Goldrath A.W. Origins of CD4⁺ circulating and tissue-resident memory T-cells. *Immunology*, 2019, Vol. 157, no. 1, pp. 3-12.
33. Palchevskiy V., Hashemi N., Weigt S.S., Xue Y.Y., Derhovanessian A., Keane M.P., Strieter R.M., Fishbein M.C., Deng J.C., Lynch J.P., Elashoff R., Belperio J.A. Immune response CC chemokines CCL2 and CCL5 are associated with pulmonary sarcoidosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2011, Vol. 4, 10. doi: 10.1186/1755-1536-4-10.

34. Paulissen S.M., van Hamburg J.P., Dankers W., Lubberts E. The role and modulation of CCR6⁺ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 2015, Vol. 74, no. 1, pp. 43-53.
35. Ramstein J., Broos C.E., Simpson L.J., Ansel K.M., Sun S.A., Ho M.E., Woodruff P.G., Bhakta N.R., Christian L., Nguyen C.P., Antalek B.J., Benn B.S., Hendriks R.W., van den Blink B., Kool M., Koth L.L. IFN- γ -producing T-Helper 17.1 Cells are increased in sarcoidosis and are more prevalent than T-Helper type 1 Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2016, Vol. 193, no. 11, pp. 1281-1291.
36. Sakthivel P., Bruder D. Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2017, Vol. 24, no. 1, pp. 59-65.
37. Sallusto F., Zielinski C.E., Lanzavecchia A. Human Th17 subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 9, pp. 2215-2220.
38. Shamaei M., Mortaz E., Pourabdollah M., Garssen J., Tabarsi P., Velayati A., Adcock I.M. Evidence for M2 macrophages in granulomas from pulmonary sarcoidosis: A new aspect of macrophage heterogeneity. *Hum. Immunol.*, 2018, Vol. 79, no. 1, pp. 63-69.
39. Shigehara K., Shijubo N., Ohmichi M., Takahashi R., Kon S., Okamura H., Kurimoto M., Hiraga Y., Tatsuno T., Abe S., Sato N. IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN-gamma production in sarcoid lungs. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 166, no. 1, pp. 642-649.
40. Simonian P.L., Wehrmann F., Roark C.L., Born W.K., O'Brien R.L., Fontenot A.P. $\gamma\delta$ T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *J. Exp. Med.*, 2010, Vol. 207, no. 10, pp. 2239-2253.
41. Starshinova A.A., Malkova A.M., Basantsova N.Y., Zinchenko Y.S., Kudryavtsev I.V., Ershov G.A., Soprun L.A., Mayevskaya V.A., Churilov L.P., Yablonskiy P.K. Sarcoidosis as an Autoimmune Disease. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 10, 2933. doi: 10.3389/fimmu.2019.02933.
42. Tarasidis A., Arce S. Immune response biomarkers as indicators of sarcoidosis presence, prognosis, and possible treatment: An immunopathogenic perspective. *Autoimmun Rev.*, 2020, Vol. 19, no. 3, 102462. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102462.
43. Ten Berge B., Paats M.S., Bergen I.M., van den Blink B., Hoogsteden H.C., Lambrecht B.N., Hendriks R.W., Kleinjan A. Increased IL-17A expression in granulomas and in circulating memory T cells in sarcoidosis. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, Vol. 51, no. 1, pp. 37-46.
44. Wacleche V.S., Goulet J.P., Gosselin A., Monteiro P., Soudeyns H., Fromentin R., Jenabian M.A., Vartanian S., Deeks S.G., Chomont N., Routy J.P., Ancuta P. New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy. *Retrovirology*, 2016, Vol. 13, no. 1, 59. doi: 10.1186/s12977-016-0293-6.
45. Zhang H., Costabel U., Dai H. The role of diverse immune cells in sarcoidosis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 788502. doi: 10.3389/fimmu.2021.788502.

Авторы:

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лазарева Н.М. — к.м.н., старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Баранова О.П. — к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательского института интерстициальных и орфанных заболеваний легких, доцент кафедры пульмонологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lazareva N.M., PhD (Medicine), Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Baranova O.P., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Interstitial and Orphan Lung Diseases, Associate Professor, Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Серебрякова М.К. — научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Сесь Т.П. — д.б.н., профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Илькович М.М. — д.м.н., профессор, директор научно-исследовательского института интерстициальных и орфанных заболеваний легких, заведующий кафедрой пульмонологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Serebriakova M.K., Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Ses' T.P., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Ilkovich M.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Interstitial and Orphan Lung Diseases, Head, Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 06.01.2022
Принята к печати 22.01.2022

Received 06.01.2022
Accepted 22.01.2022