ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Тихонович Элла Леонидовна

Оценка роли полиморфизма генов *TNFa, FOXP3* и мРНК генов каспаз 3,6,9 в прогрессировании и рецидивировании саркоидоза.

14.01.25 – пульмонология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель: профессор, д.м.н. В.И. Трофимов

Санкт-Петербург - 2019

Содержание

Список сокращений……...4

Введение..……6

Актуальность проблемы ……8

Глава 1. Обзор литературы

1.Эпидемиология, этиология и иммунопатогенез саркоидоза……17

1.1.1. Врожденный и адаптивный иммунитет

1.1.1.1.Активация макрофагов. Рецепторы клеток врожденного иммунитета……21

1.1.1.2.Нейтрофильные гранулоциты……24

1.1.1.3.Альвеолярные макрофаги……...25

1.1.1.4.Антигенпрезентирующие клетки. Дендритные клетки……....27

1.1.1.5.Т-клетки (регуляторные Т клетки, Т-хелпер 17 клетки)……..28

1.1.2.Полиморфизм генов и саркоидоз……..…….....37

1.2.Классификация саркоидоза ……..51

1.3Клинико-фукциональные проявления саркоидоза…… …….53

Глава 2. Методы и материалы исследования

2.1Клиническое обследование пациентов ..……57

2.2Функциональные методы исследования…… ……...58

2.3.Рентгенологические методы исследования...……..59

2.4.Молекулярно-генетическое исследование……59

2.5Статистическая обработка результатов……64

Глава 3. Клинико-функциональная характеристика пациентов с различным течением саркоидоза

3.1 Эпидемиология саркоидоза в Карелии ……66

3.2.Клиническо-функциональная характеристика пациентов с саркоидозом……..66

3.3Анализ течения заболевания ……70

3.4Факторы, способствующие прогрессированию заболевания……..71

Глава 4.Результаты исследования.

4.1Анализ ассоциации полиморфных маркеров -308G>A и -238G>A гена *TNF*a с риском развития саркоидоза…….……..72
4.2.Анализ ассоциации полиморфного маркера -3279C>A гена FOXP3 с развитием саркоидоза легких...……...79
4.3.Анализ уровня транскриптов генов каспаз в лейкоцитах периферической крови здоровых людей и больных саркоидозом ….....84
4.4. Кросскорреляционная матрица парных коэффициентов корреляции, рассчитанных по Спирмену (непараметрическим методом)….……86
Обсуждение.……88
Заключение……...…….....95
Выводы…..…….....99
Практические рекомендации....……...100
Список литературы… ……...102

Список сокращений

БАЛ-бронхоальвеолярный лаваж

ВГЛУ-внутригрудные лимфоузлы

ВТС-видеоассистированная торакоскопическая биопсия

ГКС - глюкокортикостероиды

ГМК-гигантская многоядерная клетка

ГКГ-главный комплекс гистосовместимости

ЖЕЛ-жизненная емкость легких

ИЛ-интерлейкины

ЛПК-лейкоциты периферической крови

ЛУ-лимфотический узел

СКТ - спиральная компьютерная томография

МОС (75, 50, 25)- максимальные объемные скорости на уровне 25%, 50% и 75% объема ФЖЕЛ соответственно

ОФВ1-объем форсированного выдоха за 1 секунду

ПКС-программируемая клеточная смерть

С-саркоидоз

СОД - саркоидоз органов дыхания

ЭК- Эпителиоидные клетки

ACCESS(A Case control ethiologic study of sarcoidosis)- контрольное исследование этиологии саркоидоза

CASP- каспаза

DLCO/SB - диффузионная способность легких

INF – интерферон

FOXP3-forkhead box transcription factor p3

mKatG -catalase-peroxidase antigen

PRR-рецепторы опознования паттерна

ROR-retinoid-related orphan receptor

TNFα - фактор некроза опухоли альфа

Th - Т-хелперы

ВВЕДЕНИЕ.

Саркоидоз, согласно федеральным клиническим согласительным рекомендациям, «это системное воспалительное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся образованием в различных органах и тканях эпителиоидноклеточных неказеифицирующихся гранулём, активацией Т-клеток в месте гранулёматозного воспаления с высвобождением различных хемокинов и цитокинов, включая фактор некроза опухоли альфа» (Визель А.А.,2016).

В легочной ткани, как правило, выявляются двусторонняя внутригрудная лимфаденопатия и диссеминированные инфильтративные изменения, которые могут приводить к развитию пневмофиброза. Поражения сердца, нервной системы, глаз и других органов могут стать жизнеугрожающими, требующими активного лечения, и даже привести к смерти [4,13].

Более 50% пациентов с саркоидозом имеют ремиссию в течение 3 лет после диагностики заболевания, причем у 66% пациентов ремиссия наблюдается на протяжении десятилетий. Хотя определенные фенотипы и стадии болезни предопределяют хороший прогноз, все пациенты нуждаются в дополнительном высокоспециализированном обследовании и лечении. [4]

Развитие саркоидоза вероятно определяется нарушением иммунного ответа организма на воздействие экзогенных или эндогенных факторов (Hena et al., 2018). Существует ряд исследований, основанные на наблюдениях семейных случаев заболевания, что свидетельствует в пользу генетической природы саркоидоза. Вероятнее всего, в основе развития саркоидоза легких лежит взаимодействие генетических факторов и факторов окружающей среды. Для некоторых популяций в настоящее время проведена оценка эпидемиологических данных, влияния генетических факторов в случаях семейного саркоидоза, выполнены исследования на группах близнецов (Rybicki et al., 2001). Оказалось, что риск заболеть саркоидозом среди членов одной семьи от 4 до 6 раз (по разным оценкам) выше, чем в когорте неродственных людей (Rybicki et al., 2001). Является целесообразным поиск взаимосвязи и оценки генетиче-

ских маркеров с развитием саркоидоза. По литературным данным описано достаточно много генетических маркеров, причастных к развитию саркоидоза (Culver et al., 2007). Саркоидоз - системный воспалительный синдром, характеризующийся накоплением иммунных эффекторных клеток в пораженных органах и повышенным уровнем провоспалительных белков в плазме крови и бронхоальвеолярном лаваже (Hunninghake et al., 1999). Известно, что генетический фон может определять силу и направленность воспалительных реакций при саркоидозе. Среди локусов, ассоциированных с восприимчивостью к саркоидозу, отмечены области короткого плеча 6-й хромосомы, где располагаются гены, кодирующие белки основного комплекса гистосовместимости (например, HLADQB1, HLA-A1, B8-, DR5- и DR17) (Rybicki B.A. et al., 2003; Iannuzzi et al., 2007), а также расположенный близко к ним ген *TNF* (Seitzer et al., 2001). Следующая рассматриваемая группа относится к генам, регулирующим Т-клетки, одним из представителей которой является ген *FOXP3*. Мутации в промоторной части влияют на транскрипционную активность этого гена, как например, показано после стимулирования Т-клеточного рецептора.

Несмотря на накопленные данные, остается до конца не ясным роль генетических факторов в формировании различных фенотипов саркоидоза. На результаты влияют такие факторы, как размер выборки, этническая принадлежность людей, включенных в исследование (Culver et al., 2007). Поэтому зачастую в литературе имеются противоречивые данные о связи аллельных вариантов генов кандидатов с развитием саркоидоза (Seitzer et al., 1997; Yamaguchi et al., 2001; Mrazek et al., 2005; Malysheva et al., 2017). Тем не менее, такого рода сведения представляются весьма важными для оценки риска развития саркоидоза у населения, а также прогнозирования тяжести течения заболевания и эффективности терапии. Также малоизученными остаются вопросы о вкладе тех или иных полиморфных вариантов генов-кандидатов в этиологию и патогенетические механизмы данного заболевания, что могло бы в перспективе разработать мишени для таргетной терапии. В связи с

этим цель исследования – оценить роль полиморфизма генов *TNF* и *FOXP* , уровень мРНК генов каспаз 3,6,9, *TNF* и *FOXP* в формировании и прогрессировании саркоидоза.

Актуальность проблемы.

Распространенность саркоидоза Российской Федерации колеблется от 22 до 47 чел. на 100 тыс. населения. Распространенность в Республике Карелия , по нашим данным, составляет 73 чел на 100 тыс населения, больше, чем в среднем по стране. В последние десятилетия наблюдается неуклонный рост заболеваемости саркоидозом (Визель А.А., Визель И.Ю., 2017). Это вероятно связано, с одной стороны, с истинным возрастанием его частоты, с другой - усовершенствованием методов диагностики и активным выявлением. (WASOG 1999; Дмитриева Л.И, Степанян И.Э.1998). Саркоидозом страдают люди всех национальностей, это заболевание встречается в любом возрасте. По статистике, впервые выявленный саркоидоз чаще диагностируется в возрасте до 50 лет с пиком в 30-39 лет, женщины составляют 2/3 пациентов [3]. Превалирует поражение легких, между тем у 70 % больных диагностируются экстрапульмональные поражения, преимущественно при хроническом характере заболевания. Рецидивирующее течения саркоидоза отмечено в 15-68% случаев. Такое существенное различие показателей связано с рядом факторов: характером поражения, стадией и характером течения саркоидоза, коморбидным фоном и т.д. Важное значение имеет продолжительность наблюдения. Возможность дигностировать рецидивирующее течение гораздо выше при более длительном наблюдении [4,8].

Специфичные биомаркеры помогут точно фенотипировать пациентов с саркоидозом, обладают значимой ценностью, так как могут указать пациентов с повышенным риском осложненного саркоидоза и позволяют проводить

целенаправленную терапию для предотвращения прогрессирующего течения. По результатам двойного исследования, проведенного в датских и финских популяциях, наследуемость саркоидоза составляет 0,66, что подтверждает сильную генетическую природу этого заболевания [264]. Значимые расовые и гендерные различия в развитии саркоидоза были зарегистрированы в афро-американских, ирландских, скандинавских и испаноязычных группах населения.[268]

Изучение факторов риска саркоидоза и фенотипов у лиц различных национальностей подчеркивает генетическую гетерогенность саркоидоза. Проведенный анализ фенотипов подтвердил возможность прогнозирования течения заболевания и ответа на терапию на основе генотипа пациента. Основу патогенеза заболевания составляют изменения в содержании и соотношении про- и противовоспалительных цитокинов, а также дисбаланс Т-клеточного иммунитета. TNF-альфа является важнейшим цитокином, принимающим участие в формировании саркоидной гранулемы, активизации ядерного фактора kB.

Под воздействием *TNF*-альфа происходит активация проапоптотических белков, запуская высвобождение каспазы -9, 3и 6, тем самым присходит апоптоз клеток и формирование гранулемы. За счет снижения экспрессии гена *FOXP3* наблюдается уменьшение регуляторных Т-клеток. Именно ген *FOXP3* (forkhead box transcription factor p3) определяет стабильность регуляторных Т-клеток и держит иммунную систему в сбалансированном состоянии [253].

Баланс между экспрессией *ROR*γt (retinoid-related orphan receptor) и *FOXP3* определяет характер дифференцировки недетерминированных CD4+ T helper клеткок в Th17 клетки или Treg.

Исследования показывают, что *ROR*γ играет критическую роль в гомеостазе тимоцитов путем регуляции дифференцировки, пролиферации и

апоптоза тимоцитов [He, 2002; Jetten, 2004; Jetten and Joo, 2006; Jetten et al., 2001].

Нарушения генной транскрипции и количественное или функциональное изменение белка, как показывают исследования, могут быть обусловлены однонуклеотидными заменами в различных генах. Описаны, по крайней мере, 8 полиморфных вариантов гена *TNF*-альфа. Большинству из них дана характеристика на молекулярном и биохимическом уровнях. Однако их влияние на саркоидоз мало изучено.

Генетические исследования при саркоидозе в России малочисленны, а в Республике Карелия они отсутствуют.

Таким образом, представляется актуальным определение генетических маркеров для оценки риска развития саркоидоза, а также прогноза активности и характера течения заболевания.

Цель исследования

Целью исследования было оценить влияние полиморфизма генов *TNFa, FOXP3,* уровня мРНК генов каспаз, *TNFa, FOXP3* на развитие и прогрессирование саркоидоза и возможность использования генетических маркеров в прогнозировании течения заболевания.

Задачи исследования:

1. Выявить клинические и функциональные особенности пациентов саркоидозом в Республике Карелия, динамику заболевания. Оценить особенности различного течения саркоидоза (прогрессирующее, стационарное (стабильное) и рецидивирующее).
2. Определить частоты аллелей и генотипов полиморфных маркеров -308 G>A (rs1800629), -238 G>A (rs361525) гена *TNF* и -3279 C>A (rs3761548) гена *FOXP3* у больных саркоидозом. Выявить риск развития данного заболе-

вания у носителей разных генотипов по исследуемым полиморфным маркерам гена *TNF* и *FOXP3*

3. Выявить влияние вышеперечисленных генетических детерминант на особенности течения заболевания (прогрессирующее, стационарное (стабильное) и рецидивирующее).

4. Определить уровень транскриптов генов *TNF* и *FOXP3* у больных саркоидозом в зависимости от генотипов по исследуемым полиморфным маркерам гена *TNF* и *FOXP3.*

5. Оценить уровень мРНК генов *TNF ,FOXP3,* каспаз 3,6,9 в лейкоцитах периферической крови у больных с разным течением саркоидоза.

6. Оценить уровень транскриптов генов инициирующей (*CASP9*) и эффекторных каспаз (*CASP3, CASP6*) в лейкоцитах периферической крови здоровых людей в зависимости от носительства аллельных вариаций гена *TNF*.

Научная новизна

1. Создан регистр пациентов с саркоидозом в Республике Карелия. Проанализированы эпидемиологические и клинические данные, варианты течения и исходы заболевания за 14 -летний период наблюдения.

2. Впервые определен генетический профиль, включающий аллели и генотипы -308 G>A (rs1800629), -238 G>A (rs361525) гена *TNF* и -3279 C>A (rs3761548) гена *FOXP3* у пациентов с морфологически верифицированным саркоидозом.

3. Впервые изучен полиморфизм генов -308 G>A (rs1800629), -238 G>A (rs361525) гена *TNF* и -3279 C>A (rs3761548) гена *FOXP3,* уровень транскриптов генов каспаз 3,6,9, *TNF* , *FOXP3* и их влияние на развитие и течение заболевания у больных саркоидозом в Республике Карелия.

Теоретическая и практическая ценность работы.

1. Разработан регистр пациентов с саркоидозом, что позволило проводить многолетнее наблюдение за больными, собрать унифицированные данные об этих пациентах, оценить течение, эффективность терапии и исходы заболевания, усовершенствовать качество медицинских услуг.

2. Проведенная работа представляет практический интерес в области клеточной биологии и генетики. Полученные данные позволяют понять молекулярно-генетические механизмы этиологии и патогенеза данного заболевания.

3. Показана необходимость оценки полиморфизма -3279 C>A гена *FOXP3*, - 308G>A и -238 G>A гена *TNF* больных саркоидозом, что актуально для создания маркерного профиля, прогнозирования течения саркоидозного процесса и контроля лечения пациентов.

4. Выявленные генетические маркеры, ассоциированные с характером течения заболевания, открывают возможности использования новых мишеней для воздействия тергетной терапии, внедрения новых препаратов, основанных на регулировании экспрессии генов.

Методология и методы диссертации

В диссертационной работе решаются вопросы улучшение качества медицинской помощи больным с различным характером течения саркоидоза за счет использования генетических критериев диагностики.

Объектом исследования послужили пациенты с саркоидозом. Предметом исследования являлись клинико-функциональные, рентгенологические, и

иммуногенетические данные пациентов с прогрессирующим, стационарным (стабильным) и рецидивирующим течением заболевания.

Работа включала в себя четыре этапа. На первом этапе в Республике Карелия был сформирован регистр пациентов с саркоидозом, в который 14 лет проводились сбор и анализ данных больных, поступающих в отделение интенсивной респираторной терапии ГБУЗ Республиканская больница им. В.А. Баранова. Обработка полученных результатов позволила оценить информацию о распространенности саркоидоза,частоте верификации диагноза, динамике заболевания,терапии .

На втором этапе анализировались данные анамнеза, клинико- лабораторные данные, рентгенологические и функциональные показатели, длительность проводимой терапии и ее эффективность.

На третьем этапе проводилось генетическое исследование у пациентов с различным течением морфологически верифицированного саркоидоза по сравнению с группой контроля. Определялась частота аллелей и генотипов генов *TNF-a, FOXP3*, уровень транскриптов генов каспаз 3,6,9 , *TNF-a, FOXP3.*

На четвертом этапе работы сравнивались группы пациентов с рецидивирующим (прогрессирующим) и стабильным течением заболевания. Определялось влияние вышеуказанных генетических маркеров на течение заболевания.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Создание и ведение регистра пациентов с саркоидозом в течение длительного времени позволяет динамично оценивать уровень заболеваемости, мониторировать обострения и рецидивы, усовершенствовать качество медицинских услуг.

2. Саркоидоз является мультифакторным заболеванием, генетические черты которого имеют популяционные особенности. Однако генетические маркеры генов *TNFa, FOXP3*, каспаз 3,6,9 не позволяют определить предрасположенность к развитию саркоидоза.
3. Возможно использование генетических маркеров генов *TNFa, FOXP3* в прогнозировании рецидивирующего и прогрессирующего течения, мониторирования эффективности лечения саркоидоза.
4. Различные варианты течения саркоидоза (прогрессирующее, стабильное и рецидивирующее) отличаются друг от друга генетическими маркерами, клинико-функциональными особенностями.

Степень достоверности и апробация диссертационной работы

Тема диссертационного исследования утверждена на заседании проблемной комиссии № 7 ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», протокол № 29 от 26.04.2017 года.

Апробация диссертационной работы проведена на XXVII Национальном Конгрессе по болезням органов дыхания 17 – 20 октября 2017г. г.Санкт-Петербург, на XXVIII Национальном Конгрессе по болезням органов дыхания 16-19 октября 2018г., г.Москва, региональной научно-образовательной конференции «Актуальные вопросы внутренних болезней 2018 » 30-31 октября 2018 г.г. Петрозаводск.

Информированное согласие было получено от всех пациентов. Работа одобрена локальным этическим комитетом ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А.Баранова» и этическим комитетом ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует специальности «Пульмонология» 14.01.25- (Медицинские науки).

Внедрение в практику результатов исследования

1.Ведение регистра пациентов с саркоидозом, внедрено в работу отделения интенсивной респираторной терапии ГБУЗ Республиканская больница им В.А. Баранова с участием пульмонологов городских поликлиник.

2.Типирование генотипа для прогнозирования течения заболевания при впервые выявленном и морфологически верифицированном саркоидозе, прогрессирующем и рецидивирующем течении, неэффективности терапии применяется в работе пульмонологов отделения интенсивной респираторной терапии.

3.Результаты исследования используются в обучающих программах постдипломного образования врачей терапевтов, пульмонологов на кафедре госпитальной терапии медицинского института Петрозаводского государственного университета.

Публикации

На основании диссертационной работы опубликовано 9 научных работ, в том числе 5 работ в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации основных положений диссертаций на соискание ученых степеней.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 131 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 22 таблицами и 1 рисунком. Библиография содержит 277 источников, включая 45 отечественных и 232 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1.Эпидемиология, этиология и иммунопатогенез саркоидоза

«Саркоидоз—системное воспалительное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся образованием в различных органах и тканях эпителиоидноклеточных неказефицирующихся гранулём, активацией Т-клеток в месте гранулёматозного воспаления с высвобождением различных хемокинов и цитокинов, включая фактор некроза опухоли (ФНО-альфа)» [Hunninghake G. 1999].

Причина саркоидоза спорна и пока окончательно не известна. Обнаружение эпителиодноклеточной гранулёмы в биоптате не является патогномоничным признаком,так как подобная гистологическая картина возможна при туберкулёзе и саркоидных реакциях [Sotogomez N., 2016].

Распространенность саркоидозом неуклонно растет, в Татарстане она составляет 51,35 на 100 тыс. населения. По данным Визель И.Ю.,[2017] за последние 5 лет в Республике Татарстан ежегодно выявлялось до 110 новых случаев. Распространенность саркоидоза в Омске составила 24,6 на 100 тыс. населения [Петров Д.В. и др., 2013], в Москве -2,85 на 100 000 населения [Русаков Н.В. и др., 2012].

Подобная картина роста распространённости саркоидоза отмечается во многих странах[151,176]. В среднем распространенность саркоидоза в мире составляет от 10 до 40 на 100 000 населения[124]. При проведении широкомасштабных рентгенологических скрининговых исследований определены следующие показатели распространенности саркоидоза на 100000 жителей [2]: в Швеции – 64, в Англии – 19 (однако среди ирландских женщин, живущих в Лондоне – 200 на 100000). Заболеваемость в Дании, Норвегии, Финляндии – 8-17; Голландии, Бельгии, Польше, Англии, Швейцарии, Литве, Че-

хии и Словакии – 2-8; Италии, Испании, Португалии, Югославии – 1-2 [3]. Саркоидоз редко встречается в странах Юго-Восточной Азии, Новой Зеландии, Канаде[53].

В экономически и социально развитых странах ежегодно количество больных увеличивается на 1,9% (в то время как больных туберкулезом уменьшается на 5%)[104]. Отсутствие единого подхода к учёту больных саркоидозом затрудняет сопоставление данных по России и другим странам.

Течение саркоидозного процесса может быть различным: от латентно протекающего с обратным развитием до прогрессирующего, приводящего к развитию дыхательной недостаточности и смерти. У пациентов впервые выявленный саркоидоз может дебютировать как острым или подострым, так и хроническим течением заболевания.

Рецидивирующее течение и впервые выявленный саркоидоз могут отличаться по клинико-функциональным характеристикам, так как рецидив накладывается на уже имеющиеся изменения в легких.[14,29].

В течение прошедших 30 лет представление об этиологии саркоидоза оспаривалось. Рассматривалась его ассоциация с иммунодефицитом и инфекцией. В настоящее время этиопатогенез саркоидоза трактуется как генетически обусловленная гиперактивность иммунной системы, которая приводит к гранулематозному воспалению, вызванному неизвестным причинным фактором и опосредована реакцией гиперчувствительности замедленного типа. [32]

В последнее десятилетие изучение генетической предрасположенности считается одним из самых перспективных направлений в исследовании саркоидоза, что приближает нас к пониманию сущности заболевания [186]. Генетическая составляющая патогенеза подтверждается:

1.Семейной распространенностью. Первое сообщение о саркоидозе у 2 сестер из Германии было опубликовано в 1923 г. Родственники пациентов с саркоидозом подвержены большему риску заболеть саркоидозом, чем не-родственные люди из той же популяции.

2.Повышенной заболеваемостью у монозиготных близнецов, что обуславливает сходство клинических проявлений, рентгенологической картины, времени возникновения заболевания. В Японии был отмечен случай одновременного развития саркоидоза у 22–летних мужчин близнецов.

3.Специфическими чертами заболевания среди различных расовых и этнических групп. Более тяжелое течение саркоидоза отмечается у афроамериканцев по сравнению с европейцами [257]. Генетические особенности у японских пациентов, предрасполагающие к саркоидозу, обладали зашитными свойствами у скандинавских пациентов. Синдром Лефгрена имеет менее благоприятный прогноз у афроамериканцев и жителей Азии. Саркоидоз в странах Скандинавии встречается чаще, чем в Китае. Наличие расового компонента в патогенезе саркоидоза подтверждает тот факт, что чаще саркоидоз диагностировался у лиц со смешанной расой [4].

Опубликованные данных свидетельствует о том, что течение саркоидоза зависит от расовых и этнических факторов.

Однако имеются и противоположные данные (Rybicky и соавт.,1998), которые указывают на то, что несмотря на описания семейных случаев саркоидоза, недостаточно доказательств семейного характера заболевания ввиду неадекватного подбора пациентов, чтобы подтвердить модели наследования [294]. D.Harrington и соавт. в Детройте провели исследование по семейному саркоидозу (диагностировано 727 случаев из 91 семьи). Было выявлено, что семейный саркоидоз чаще встречался у афроамериканцев, чем у европейцев и его распространенность равнялась 18,5% среди семей афроамери-

канцев и 5,2% - среди европейцев [232]. В то же время другие авторы (E.Fite и соавт.), анализируя распространенность саркоидоза в Европе, сделали заключение о низкой распространенности семейного саркоидоза. В испанском исследовании с 1985 по 1990 г.г. было изучено 433 случая заболевания, обследовано 3757 семей. Только в 5 случаях саркоидоз имел семейный характер[222].

В исследовании ACCESS (2001г.), приняли участие 10862 родственника первой линии и более 17 тысяч человек второй линии родства по отношению к 706 пациентам. Между тем заключительных выводов о генетической природе заболевания в рамках исследования сделать не удалось [196].

Генетические исследования, главным образом, ставят своей задачей поиск генов-кандидатов, которые кодируют белки, играющие важную роль в патогенезе саркоидоза. Разнонаправленность ответа может влиять не столько на риск возникновения болезни, но и на течение заболевания[173]. Первые генетические исследования показали, что развитие саркоидозного процесса не обусловлено одним причинным геном [199]. Большинство исследований, в настоящее время, ставят своей задачей выяснить, какие гены предрасполагают, а какие защищают от развития саркоидоза и как генетические факторы определяют тяжесть течения, распространенность и прогноз заболевания. [38,178,188].

Вероятность развития саркоидоза и его тяжесть течения полностью ассоциированы с генами главного комплекса гистосовместимости HLA, генами, кодирующими синтез ангиотензинпревращающего фермента, TNFa, гена, ответственного за выработку рецепторов к витамину Д. Следовательно, имеющиеся литературные данные весьма противоречивы и дискутабельны, отсутствуют окончательные данные об участии генетических факторов в развитии саркоидоза.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) лежит в основе иммунопатогенеза саркоидоза. Как было описано ранее, саркоидоз это системный воспалительный синдром, проявляющийся скоплением иммунных эффекторных клеток в различных органах с формированием гранулемы. В этих событиях решающую роль играет активация альвеолярных макрофагов и Т-клеточного ответа на появление определенных антигенов.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа включает в себя активацию сосудистого эндотелия, миграцию моноцитов и лимфоцитов из кровеносного русла и тканей в очаг воспаления, активацию альвеолярных макрофагов, элиминацию причинного антигена и повреждение тканей цитокинами.

К настоящему времени этиология саркоидоза не определена. Однако имеются сведения о том, что в качестве антигенных детерминант могут выступать микобактериальные антигены, такие как mKatG (каталазо-пероксидазный антиген) или ESAT-6 (рекомбинантный антиген Mycobacterium tuberculosis.), антигены Propionibacterium или даже собственные антигены (Bianchi, 2007).

1.1.1. Врожденный и адаптивный иммунитет

1.1.1.1.Активация макрофагов. Рецепторы клеток врожденного иммунитета.

Макрофаги представляют собой клетки врожденного иммунитета. На их поверхности располагаются рецепторы опознавания паттерна (PRR), способные узнавать стандартные молекулярные структуры (паттерны), специфичные для больших групп патогенов. PRR представляют собой большую группу мембранных рецепторов, включая рецепторы поглотителей, Toll-подобный рецепторы (TLR) и рецепторы лектинов С-типа; внутриклеточные

рецепторы, такие как NOD-подобные рецепторы, некоторые RIG-I-подобные рецепторы; и растворимые рецепторы, такие как маннозосвязывающий лектин или sCD14. Эти рецепторы связываются со структурами, обнаруженными на больших группах микроорганизмов, называемых PAMP. Например, LPS на поверхности граммотрицательных бактерий может связываться с TLR4, обеспечивая активацию альвеолярных макрофагов. Существует множество доказательств, свидетельствующих о фундаментальной роли легочных макрофагов в патогенезе саркоидоза. Их роль может быть двойной. С одной стороны, они выступают как фагоцитарные клетки, устраняя частицы и микроорганизмы без инициирования воспалительного ответа. В то же время, после активации через PRR с помощью PAMPS или ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов (DAMPs), альвеолярные макрофаги инициируют сильный воспалительный ответ и могут опосредовать передачу сигнала о воспалении компонентам адаптивного иммунитета. Важная роль альвеолярных макрофагов в формировании гранулем очевидна. Так, многоядерные гигантские клетки, происходящие из макрофагов, образуют центр саркоидной гранулемы. Кроме того, у пациентов с саркоидозом наблюдается увеличение альвеолярных макрофагов. У этих клеток имеются признаки активации. Важно и то, что альвеолярные макрофаги у пациентов с саркоидозом спонтанно продуцируют TNFα и другие цитокины. В частности, TNFα считается фактором, способствующим формированию гранулемы. TLR также распознают эндогенные лиганды, так называемые ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны (DAMP). DAMP быстро высвобождаются поврежденными, но не апоптозными клетками. Рецепторы, участвующие в распознавании DAMPS - TLR (в основном TLR2 и TLR4). DAMP, после взаимодействия с рецепторами, вызывает воспаление, сходное с воспалением, вызванным PAMP, в результате которого также происходит активация ядер-

ного фактора kappa B (NF-κB) и продукция цитокинов (Bianchi, 2007). У больных саркоидозом уровень кальций-связывающих белков группы S100 (S100A8 и S100A9), секретируемых нейтрофилами в плазме крови повышен по сравнению со здоровыми донорами (Pechkovsky et al., 2000; Bargagli et al., 2008; Korthagen et al., 2010). Это позволило предположить, что клетки, которые секретируют эти белки, участвуют в ранних стадиях индукции гранулемы. Обе молекулы связываются с TLR4 и RAGE и способны индуцировать иммунный ответ, включая активацию NF-κB и индукцию выделения цитокинов(Yonekawa et. al., 2011; Riva et al., 2012). Содержание дефензинов также увеличивается при саркоидозе (Biragyn et al., 2002). Вероятно, они участвуют в активации клеток врожденного иммунитета через TLR4. Среди пептидов, выделяемых нейтрофильными гранулоцитами очень много дефензинов, которые индуцируют высвобождение TNFα из альвеолярных макрофагов пациентов с активным саркоидозом (Paone et al., 2009). Было продемонстрировано, что сывороточный амилоид А обнаружен в саркоидозных гранулемах и активирует NF-κB в фагоцитах через TLR2 (Chen et al., 2010). Более того, повышение уровня сывороточного амилоида А способствует индукции гранулемы, например, при наличии микобактериального антигена mKatG. Таким образом, DAMPs, такие как сывороточный амилоид А, могут участвовать в инициации иммунных реакций при саркоидозе. Интересно, что TLR2 также влияет на адаптивный иммунитет. Об этом свидетельствует тот факт, что блокада TLR2 с помощью специфических антител подавляет распознавание Т клетками микобактериальных антигенов ESAT-6 и mKatG (Oswald-Richter et al., 2009). Распознавание ESAT-6 с помощью TLR2 способствует ингибированию активности MyD88 (цитозольный адаптерный белок, один из пяти белков, содержащих домен TIR), участвующих в передаче сигнала от Толл-подобных рецепторов и последующую секрецию IL-12. (Pathak et al., 2007).

1.1.1.2 Нейтрофильные гранулоциты

Важными компонентами врожденной иммунной системы являются нейтрофильные гранулоциты (НГ). НГ привлекаются хемокинами, такими как CXCL8 (интерлейкин-8), CXCL5 (эпителиальный нейтрофил-активирующий пептид - 78) и другими. Эти молекулы секретируются в основном моноцитами и макрофагами, но также после адекватной стимуляции и другими клетками, например, альвеолярными эпителиальными клетками II типа. (Pechkovsky et al., 2000). На поверхности нейтрофилов имеется множество PRR и, следовательно, они эффективно уничтожают патогенные микроорганизмы. Однако, они также секретируют некоторые протеазы и генерируют продукцию активных форм кислорода (АФК), которые способствуют повреждении тканей легких. Следовательно, чрезмерная активация нейтрофилов может быть вредной для тканей этого органа.

Хотя количество нейтрофилов, индуцирующих хемокины, такие как ИЛ-8, увеличивается при саркоидозе, особенно у пациентов с прогрессирующим заболеванием или II рентгенологической стадией, [141,144] процент нейтрофилов в бронхоальвеолярном лаваже у них остается низким (Sugiyama et al., 2006; Vasakova et al., 2009; Cui et al., 2010). Интересно, что в нескольких исследованиях была обнаружена положительная корреляция содержания CXCL8 или CXCL5 с количеством нейтрофилов в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) при идиопатическом легочном фиброзе (ИЛФ), но не при саркоидозе (Vasakova et al., 2009; Cui et al., 2010). Обнаружено, что увеличение процента нейтрофилов в БАЛ связано с прогрессированием ИЛФ и повышенной необходимостью стероидной терапии. (Ziegenhagen et al., 2003; Tutor-Ureta et al., 2006). Супероксиддисмутаза (SOD), секретируемая нейтро-

филами катализирует генерацию АФК, что, вероятно, способствует повреждению тканей в интерстиции легкого. Действительно, доля карбонилированных белков в легких значительно выше при саркоидозе по сравнению с легкими здоровых людей (Rottoli et al., 2005). В присутствии свободных радикалов жирные кислоты (в основном арахидоновая кислота) превращаются в изопростаны, которые являются маркерами окислительного стресса в выдыхаемом конденсате и проявляют провоспалительную активность (Piotrowski et al., 2010).

1.1.1.3. Альвеолярные макрофаги.

Основной шаг в генерации специфических Т-клеточных ответов - активация Т-клеток путем распознавания антигена, процесса, который зависит от антигенпрезентирующих клеток. Взаимодействие между Т-лимфоцитами и макрофагами в процессе иммунного ответа обеспечивается с помощью антигенов главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса II. Т-хелперы способны идентифицировать чужеродный антиген только после его переработки макрофагами, ассоциированными с антигенами ГКГ класса II и презентации данного комплекса на поверхности макрофага. Тропность Т-лимфоцитов обнаруживать чужеродные антигены только в комплексе с антигенами ГКГ называют лимитированием по ГКС.

У пациентов с саркоидозом наблюдается повышенная экспрессия ко-стимулирующих и адгезионных молекул на альвеолярных макрофагах.(Zissel et al., 2007). Этот измененный фенотип позволяет этим клеткам действовать как высокоэффективные антигенпрезентирующие клетки, вызывающие пролиферацию Т-клеток. Альвеолярные макрофаги здоровых доноров подавляют пролиферацию Т-клеток. Повышенная экспрессия ко-стимулирующих и ад-

гезионных молекул отражает провоспалительное активационное состояние альвеолярных макрофагов при саркоидозе. Макрофаги можно активировать по-разному. Активация макрофагов, которая происходит с помощью LPS и IFNγ называется классической (M1). В результате этой активации макрофаги высвобождают провоспалительные цитокины, стимулируют экспрессию CD16, CD32, CD64 и костимулирующих молекул. Вследствие этого формируются воспалительные реакции.

Активация макрофагов посредством IL-4, IL-10, IL-13 или иммунными комплексами называется альтернативной или M2, в результате повышается синтез CCL17, CCL18, CCL22, IL-1Ra и других медиаторов.

Активация M1, по-видимому, стимулируется отсутствием экспрессии или функции рецептора активации пролиферации пероксисом (PPARg), который первоначально описан для регулирования метаболизма жирных кислот и глюкозы. Однако, известно, что PPARg также отрицательно регулирует функцию нескольких иммунных клеток, особенно альвеолярных макрофагов и ДК. При саркоидозе экспрессия PPARg снижена. Отмечено нарушение функций этих белков при данном заболевании (Culver et al., 2004; Barna et al., 2006). Это может быть причиной повышения реактивности макрофагов в ответ на гранулогенные стимулы, например, как углеродные наночастицы, поскольку они индуцируют образование больше гранулем и повышенную выработку цитокинов M1-макрофагами у мышей, лишенных PPARg по сравнению с контрольными мышами (Barna et al., 2013; Huizar et al., 2013). Снижение экспрессии PPARg и нарушение их функций приводит к тому, что макрофаги перестают отвечать на ингибирующие сигналы. Таким образом, потеря функций или снижение экспрессии PPARg может быть фактором предрасположенности к индукции гранулемы.

1.1.1.4.Антигенпрезентирующие клетки

Дендритные клетки

Имеется немного данных о роли дендритных клеток (ДК) в иммунопатогенезе саркоидоза. Основываясь на их фенотипе, ДК разделены на 2 подтипа, плазмоцитоидные и миелоидные дендритные клетки. ДК первого типа относятся к врожденной иммунной системе. Они презентуют на поверхности различные TLR, играют важную роль в иммунитете и секретируют большое количество интерферона α (IFNα) после стимуляции TLR. Однако при саркоидозе не было обнаружено различий в количестве плазмоцитоидных ДК в жидкости БАЛ по сравнению с контрольными субъектами (Lommatzsch et al., 2007). Лимфоидная ткань является предпочтительным местом, где зрелые миелоидные ДК активируют наивные Т-клетки. Таким образом, лимфаденопатия, связаная с саркоидозом, может отражать продолжающееся накопление антигенпрезентирующих клеток в грудных лимфатических узлах. Однако при саркоидозе, вероятно, лимфатический узел не является основным местом распознавания антигена. Показано, что ДК в локальном лимфатическом узле менее активированы, чем в альвеолах (Munro et al., 1987). Интересно, что доля незрелых ДК была выше при саркоидозе, о чем свидетельствовало уменьшение экспрессии CD1a (Lommatzsch et al., 2007). Снижение экспрессии CD1a представляет интерес, поскольку $CD1a^-$ клетки являются «плохими» антигенпрезентирующими клетками (van Haarst et al., 1996). В периферической крови наблюдалась только тенденция к уменьшению числа ДК (Mathew et al., 2008). Эти клетки у пациентов с саркоидозом обладают сниженной стимулирующей способностью по сравнению с ДК здоровых людей. Роль ДК в развитии саркоидоза остается открытой.

1.1.1.5. Т клетки.

Активация Т-клеток является обязательной для развития любого гранулематозного ответа. Подтверждением этому являются данные о том, что у мышей, у которых экспериментально было снижено количество Т-клеток, гранулемы в ответ на различные стимулы не образовывались (Ha¨nsch et al., 1996). В результате активации Т-клеток продуцируются разнообразные субпопуляции Т-клеток: Т-хелпер (Th 1 и Th2). Из Th2 важное значение имеет Th17 (Sallusto, Lanzavecchia, 2009).

Макрофаги и ДК выделяют IL-12, необходимый для развития Th1 клеток. Их ведущим продуктом является IFNγ, но они также секретируют лимфотоксин, TNF и другие медиаторы. Клетки Th1 ассоциируются с усилением экспрессии транскрипционного фактора T-box (T-bet). Важным цитокином Th2 клеток является IL-4, который требуется для развития и активации В-клеток. IL-4 способствует снижению синтеза провоспалительных цитокинов макрофагами, тем самым стимулируя альтернативную активацию этих клеток (Pechkovsky et al., 2010). Ключевым фактором транскрипции Th2 является GATA-3 (GATA-binding protein 3). Th17 экспрессируют транскрипционный фактор *RORgt* (retinoid –like orhan receptor gt). Их основными продуктами являются цитокины семейства IL-17, в основном IL-17A и IL-17F. Th17 дифференцируются под влиянием IL-1, IL-6, трансформирующего фактора роста b (TGFBb) и IL-23 (Bi et al., 2012).

Т-клетки, активированные в периферических лимфатических узлах, дифференцируются в две субпопуляции клеток, либо в клетки Th1, либо в Th2. Эти клетки экспрессируют разные наборы хемокиновых рецепторов; поэтому их аккумуляция регулируется различными хемокинами. Первоначально Th1 клетки были определены за развитие клеточного иммунитета, а Th2-клетки, определяющие гуморальный иммунный ответ. CXCR3, CCR5 и

CXCR6 рецепторы преимущественно секретируются Th1 клетками, а синтез рецепторов CCR3, CCR4 и CCR8 производится клетками Th2 (Zhu, Paul, 2008). После активирования, Т-клетки продуцируют INFγ и IL-2 и рецепторы хемокинов CXCR3 и CXCR6 (Agostini et al., 2005), [249]; поэтому эти клетки могут быть охарактеризованы, как клетки Th1. Эта классификация подкрепляется демонстрацией повышенной экспрессии фактора транскрипции T-bet, подчеркивая Th1 характеристики Т-клеток при саркоидозе легких (Kriegova et al., 2011).

Хемокины, привлекающие клетки Th1, такие как CXCL9, CXCL10 и CXCL16, высвобождаются альвеолярными макрофагами и альвеолярными эпителиальными клетками II типа(Agostini et al., 2005; Morgan et al., 2005; Sugiyama et al., 2006; Takeuchi et al., 2006). Кроме того, концентрация хемокинов, обнаруженных в жидкостях БАЛ или супернатантах клеток БАЛ, значительно связана со степенью альвеолита. Таким образом, помимо локальной активации, можно предположить, что клетки, активированные в участках вне легких, попадают в кровоток и притягиваются в легкие хемокинами, которые в них синтезируются. Важная роль Th1 клеток в индукции гранулемы показана с использованием непептидного ингибитора CXCR3 и CCR5. Этот ингибитор не только уменьшает накопление клеток Th1, но также облегчает образование гранулемы в модели легочного гранулематоза у мышей (Kishi et al., 2011). Напротив, в Т-клетках, выделенных из тканей больных саркоидозом, не обнаружено повышение содержания маркерных цитокинов Th2, IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13.Нативные Th0 клетки, способные выделять цитокины, дифференцируются в клетки Th1 или Th2 после стимуляции антигена в зависимости от его концентрации, сродства к молекулам ГКГ класса II и его природы (Bäumer et al., 1997). Однако, хотя клетки Th2 присутствуют в БАЛ, они не активируются или не подавляются, что может

способствовать иммунопатогенезу, поддерживая дисбаланс цитокинов в легких.

Регуляторные Т-клетки

В большинстве случаев саркоидоз приходит к спонтанному разрешению, что указывает на то, что элиминирующий антиген устраняется и воспалительный ответ прекращается. При этом иммунный ответ должен быть ослаблен, а Т-клетки с регуляторной способностью, такие как Tregs, являются средством для достижения этой цели. Treg клетки идентифицируются по их экспрессии IL-2R и транскрипционного фактора FOXP3 (Forkhead-Box-Protein 3). Имеются противоречивые результаты о присутствии и функции Treg при саркоидозе. Большое количество Treg наблюдается в кровеносных сосудах, легких и лимфатических узлах пациентов с синдромом Лефгрена (Miyara et al., 2006). Напротив, у пациентов с хроническим активным заболеванием количество Treg клеток в легком уменьшается (Idali et al., 2008). Однако одна и та же группа исследователей сообщила позже об увеличении числа Treg в локальных лимфатических узлах по сравнению с БАЛ и периферической кровью в смешанной группе пациентов с синдромом Лефгрена и без него. В другой статье сообщается о чрезвычайно высоком уровне $FOXP3^-$ Tregs (75%) в БАЛ пациентов с саркоидозом и значительно более низким их уровнем в контроле (Rappl et al., 2011). Описано уменьшение процентов Treg клеток при хроническом саркоидозе, нормальное значение у пациентов с неактивным саркоидозом и со спонтанной ремиссией (Prasse et al., 2010). Уменьшение пула Treg в БАЛ свидетельствует об уменьшении иммунного контроля со стороны Т-эффекторных клеток при саркоидозе. Treg клетки уменьшают распространение и выделение цитокинов эффекторными Т-клетками, что облегчает ремиссию заболевания. Исследования показывают,

что при саркоидозе Treg клетки дисфункциональны. Однако эти данные противоречивы. Одни исследования показывают, что выработка IFNγ и TNF-α не подавляется Treg клетками , выделенными из периферической крови, тогда как другие авторы обнаружили изменения функций Tregs только в легких (Rappl et. al., 2011). Таким образом, уменьшенная регуляторная способность Tregs при саркоидозе легких приводит к тому, что Tregs не подавляют формирование гранулемы (Taflin et al., 2009). Снижение эффективности Treg клеток при саркоидозе может быть связано с повышением концентрации TNFα у пациентов. Было показано, что TNFα снижает ингибирующую способность Treg клеток, что сопровождается пониженной регуляцией экспрессии *FOXP3* (Valencia et al., 2006). Действительно, было продемонстрировано, что применение пациентами, страдающими саркоидозом, вазоактивного кишечного пептида, увеличивает пул Treg клеток в БАЛ и восстанавливает их супрессорную функцию (Prasse et al., 2010). Было показано, что как IL-2, так и TGFβ требуются для эффективной индукции Tregs (Davidson et al., 2007). У пациентов с активным заболеванием наблюдается высокий уровень этих медиаторов, особенно у пациентов со спонтанной ремиссией (Mu¨ller-Quernheim et al., 1992; Zissel et al., 1996; Mollers et al., 2001). Таким образом, повышенные уровни TGFβ и IL-2 могут противодействовать увеличению уровня TNF (Prasse et al., 2010).

Т-хелпер 17 клетки при саркоидозе

Клетки Th17 опосредуют рекрутирование нейтрофилов и макрофагов в инфицированную ткань внеклеточными бактериями и грибами, усиливая, таким образом, гибель бактериальных клеток. Супрессия клеток IL-17 или

Th17 снижает иммунитет против внеклеточных бактерий и способствует пролонгированию инфекционного заболевания. Существует важная взаимосвязь клеток Th1, Treg и Th17. Клетки Th17 индуцируются триггером TCR(Т клеточный рецептор) в присутствии TGFβ, IL-6 и IL-23. Каждый из этих медиаторов играет определенную роль в развитии Th17. IL-6 и IL-23, по всей вероятности, не заменимы в дифференцировке Th17. В то же время другие цитокины, IL-1 и IL-21, также участвуют в этом процессе. IL-23 представляет собой цитокин, пренадлежащий к семейству IL-12, у этого белка общая со всеми другими цитокинами этого семейства субъединица p40. IL-23 является гетеродимером, состоящим из субъединиц p40 и p19. Цитокин IL-12, регулирующий дифференцировку Th1, состоит из субъединиц p40 и p35.

Таким образом, сходство в строении этих белков демонстрирует тесную связь между Th1 и Th17 (Ringkowski et al., 2014). Роль TGFβ в дифференцировке Th17 менее ясна. У мышей, TGFβ, вероятно, является фактором, определяющих этот процесс для Th17. У человека, по-видимому, требуется низкая доза TGFβ для подавления процессов, мешающих генерации Th17. Однако играет ли он непосредственную роль в генерации пула Th17, пока не ясно. Высокие концентрации TGFβ способствуют индукции Treg клеток, ослабляя, таким образом, иммунный ответ. Напротив, активация клеток Th17 подавляет активацию Th1. В свою очередь, продукт Th1 IFNg ингибирует активность Th17 и высвобождение IL-17 (McAleer, Kolls, 2014; Song et al., 2014; Schmitt, Ueno, 2015). По современным данным, основная роль клеток Th17 заключается в координации иммунной защиты от внеклеточных бактерий. Имеются также свидетельства того, что IL-17 участвует в иммунной защите от внутриклеточных бактерий, таких как *Listeria monocytogenes* или *Francisella tularensis*. При микобактериальной инфекции низкая доза антигена может индуцировать продукцию IL-17 с помощью γβ Т-клеток. Что самое интерес-

ное, это происходит независимо от активации TCR этих клеток, однако требует секреции IL-23 дендритными клетками. IL-17 играет также роль в образовании гранулемы, поскольку блокада IL-17 ингибирует образование гранулемы (Chen et al., 2013). В настоящее время появляется все больше публикаций о роли Th17 и IL-17 в развитии саркоидоза. В большинстве публикаций анализируются Т-клетки из периферической крови. Только в некоторых статьях приведены данные о количестве и составе популяций Т-клеток, в том числе Th17 и продукции ими IL-17 в БАЛ. Обнаружено увеличение пула клеток Th17 в мононуклеарных клетках периферической крови, а также в БАЛ (Facco et al., 2011; Ten Berge et. al., 2012; Huang et al., 2013). В этих исследованиях для обнаружения IL-17^{+}CD4^{+} Т-клеток использовали проточную цитометрию. Показано, что стимулирование Т-клеток жизнеспособной *Propionibacterium acnes* и *Bacillus Calmette-Gue'rin* (BCG), а также ESAT-6 вызывало неодинаковый эффект в отношении продукции IL-17. В первом случае наблюдали значительное усиление экспрессии мРНК гена IL17 у здоровых доноров, но не у пациентов с саркоидозом (Furusawa et al., 2012). Во втором случае (при стимуляции BCG) различий в уровне транскриптов этого гена в двух группах сравнения не обнаружили (Furusawa et al., 2012). Эти противоречивые результаты можно объяснить сложной активацией Th17. Высокий уровень IFNγ, который наблюдается у больных саркоидозом, может регулировать активацию антигенпрезентирующих клеток и способствовать увеличению пула Th17. Однако с другой стороны, он же одновременно и ингибирует активацию Th17 клеток и уменьшает продукцию IL-17. Тем не менее, другие авторы обнаружили повышенный процент Th17 при саркоидозе по сравнению с контрольной группой после стимуляции с использованием микобактериального антигена, такого как ESAT-6 или mKatG (Richmond et al., 2013; Ostadkarampour et al., 2014). Эти данные действительно указывают

на участие клеток Th17 в патогенезе саркоидоза. Потенциальной ролью этих клеток может быть образование или поддержание образования гранулемы. Так, Facco и ее коллеги не только обнаружили повышение количества Th17у пациентов, страдающих активным заболеванием, но также выявили, что альвеолярные макрофаги пациентов с активным заболеванием продуцируют IL-17 (Facco et al., 2011). Однако макрофаги, выделенные из БАЛ больных с неактивной формой саркоидоза, а также здоровых доноров, не продуцировали этот цитокин. Они также обнаружили существенную экспрессию IL-17 в макрофагах и Т-клетках внутри гранулемы (Facco et al., 2011).

Таким образом, клетки врожденного и адаптивного иммунитета играют основополагающую роль в развитии саркоидоза и формировании гранулемы.

Отправной точкой является обнаружение антигена Т-клетками и активация макрофагов с помощью PAMPS или DAMPS. Активированные Т-клетки пролиферируют и высвобождают цитокины, рекрутируя клетки иммунной системы в очаг воспаления. Кроме того, агент, индуцирующий образование гранулемы, активирует альвеолярные макрофаги для секреции хемокинов, которые привлекают Т-клетки и нейтрофилы. Возможно, что активация Т-клеток не зависит от активации альвеолярных макрофагов. Например, в состоянии, при котором Т-клетки активируются собственными сигналами, альвеолярные макрофаги могут быть активированы белками острой фазы воспаления, а именно сывороточным амилоидом А (Alessandrini et al., 2009; Wahlstrom et al., 2009). Активированные Т-клетки, окружающие внешнюю границу гранулемы, а также активированные клетки в гранулеме, возможно, продуцируют IL-17, который необходим для сохранения гранулемы. Уровень активации Т-клеток различается при остром и хроническом саркоидозе. Большое количество Т-клеток при остром заболевании высвобождает большее количество медиаторов, таких как IFNγ. Пул активированных Т-клеток ниже

или даже отсутствует при хроническом саркоидозе. Секреция альвеолярными макрофагами ряда факторов, например, TNF, IL-17, макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), необходима для индукции и поддержания функционально интактной гранулемы (Shigehara et al., 2001). Под влиянием M-CSF и GM-CSF макрофаги сливаются с многоядерными гигантскими клетками. Эпителиальные клетки охватывают внутренний круг гранулемы, чтобы локализовать, возможно, вредный и не деградированный агент. По крайней мере, на коже гранулема окружена дендритными клетками (Ota et al., 2004), которые следят за тем, чтобы повреждающий агент не вышел из гранулемы и участвуют в последующей активации Т-клеток. Иммунные реакции приводят либо к полному удалению повреждающего агента с последующим восстановлением в первоначальное состояние, либо к снижению интенсивности иммунного ответа посредством активирования через TGFβ Treg клеток или альвеолярных макрофагов (Zissel et al., 1996). Этот эффект характерен при остром саркоидозе со спонтанной ремиссией. Напротив, неполное удаление повреждающего агента приводит к поддержанию гранулемы или даже постоянному образованию гранулемы, чтобы локализовать возбудитель.

Прогрессирующее течение саркоидоза характеризуется высоким уровнием хемокинов в клетках жидкости БАЛ, которые отвечают за миграцию эффекторных клеток в очаг воспаления. При прогрессирующем течении значимо повышаются уровни, CCR5, INF-a, IL-2 ,CXCR3,IL-12R, IL18R CD4+-лимфоцитами жидкости БАЛ. Наибольшей значимостью обладает уровень синтеза TNF-a альвеолярными макрофагами [32].

В настоящее время не получено ответа, почему течение саркоидоза приобретает персистирующий характер и как прогрессирующая болезнь

приводит к пневмофиброзу.В результате длительной активации макрофаги локально выделяют медиаторы воспаления, что способствует в месте развития воспаления скоплению Th1-клеток и формированию гранулёмы, которая образуется в ответ на мало деградирующий и персистирующий антигенный стимул.

Саркоидоз можно описать как " иммунный парадокс". Периферическая анергия наблюдается несмотря на преувеличенное воспаление в очагах болезни [4,7]. Об этом свидетельствует снижение гиперчувствительности замедленного типа к туберкулину и общих антигенов [7,8]. Известно, что в основе этой парадоксальной ситуации лежит дисбаланс между эффекторными Т лимфоцитами и регуляторными лимфоцитами (клетками Treg), последние концентрируются по периферии гранулемы и в периферической крови больных с активным саркоидозом, осуществляя антипролиферативное действие на Т-клетки. Они лишь слабо подавляют продукцию TNFa [61], что позволяет образовывать гранулемы. Другие утверждают, что интенсивный иммунный ответ в местах заболевания приводит к тому, что активированные Т-клетки собираются в этих местах заболевания с последующей лимфопенией периферической крови [71]. При хронизации заболевания, иммуносупрессивные и CD8+ Т-клетки становятся более обильными на периферии. Циркулирующие Treg клетки являются жизненно важными для подавления клеточного иммунного ответа. Однако, клетки Treg в саркоидных гранулемах (в отличие от периферических клеток, циркулирующих Treg) прошли тщательную амплификацию и, следовательно, обесценивается их способность подавлять иммунные реакции. Клетки Treg , выделяя ИЛ-4, способствуют образованию гранулемы через активацию тучных клеток и усиление фибробластов.

1.1.2 Полиморфизм генов и саркоидоз

В настоящее время принято считать, что в этиологии и патогенезе саркоидоза значительную роль играет генетический фон, т.е. носительство аллельных вариаций определенных генов. Среди генов-кандидатов, чьи продукты могут быть вовлечены в восприимчивость людей к формированию гранулемы (характерного признака саркоидоза) – гены, кодирующие Toll-подобные рецепторы (TLR), гены основного комплекса гистосовместимости (ГКГ) гены, кодирующие белки регуляторы активности иммунных клеток, в частности цитокины, транскрипционные факторы и др.

Толл-подобные рецепторы играют ключевую роль во врожденном иммунитете. Они распознают консервативные структуры микроорганизмов и активируют клеточный иммунитет. Известно, что связывание лиганда с его специфическим рецептором может быть модулировано модификациями генов. Известны однонуклеотидные замены в генах *TLR9, TLR4* и *TLR2,* которые способствуют либо снижению, либо усилению рецепторных функций и соответственно изменению силы сигнала об обнаружении инфекционного агента (Seitzer et al., 1997; Feng et al., 2013, Figueroa et al., 2012; Kubarenko et al., 2012). В результате, у носителей определенных аллельных вариаций этих генов можно наблюдать либо увеличение, либо уменьшение продукции провоспалительных факторов в ответ на инфекцию. (Somoskövi et al., 1999). Таким образом, полиморфизм генов *TLR* может определять отсутствие реакции на патоген, который обычно распознается врожденной иммунной системой. В этом случае микроорганизм избегает иммунного надзора и сохраняется у хозяина. Напротив, мутации, приводящие к чрезмерной стимуляции иммунной системы за счет усиления функций *TLR,* могут приводить к неадекватно сильной иммунной реакции в ответ на проникновение в организм непатогенных бактерий или грибов. Таким образом, полиморфизм генов *TLR* может быть связан с началом и прогрессированием заболевания (Zissel e al., 1996;

Muraközy et al., 2001; Krein, Winston, 2002; Gaede et al., 2005; Veltkamp et al., 2006; Veltkamp et al., 2007; Prud'homme, 2007; Schürmann et al., 2008; Wick, 2008; Asukata et al., 2009; Veltkamp et al., 2010; Veltkamp et al., 2012; Pabst et al., 2013). Различия в экспрессии рецепторов могут объяснять разные реакции со стороны врожденного и адаптивного иммунитета в отношении стимуляции *TLR*, наблюдаемой при саркоидозе (Kruit et al., 2006).

Как было указано ранее, отправной точкой в формировании гранулемы является обнаружение антигена Т-клетками и активация макрофагов с помощью PAMPS или DAMPS. Напомним, что на поверхности Т лимфоцитов располагается белковый комплекс (ТКР) ответственный за распознавание процессированных антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Взаимодействие ТКР с молекулами ГКГ и связанным с ними антигеном, ведёт к активации Т-лимфоцитов и является ключевой точкой в запуске иммунного ответа. Поэтому важными генами, представляющими интерес для исследования вопросов этиологии и патогенеза саркоидоза, являются гены, кодирующие белки ГКГ класса II. Эти гены чрезвычайно полиморфны. Как известно, важнейшая функция антигенов ГКГ класса II — обеспечение взаимодействия между Т-лимфоцитами и макрофагами в процессе иммунного ответа. Т-хелперы распознают чужеродный антиген лишь после его переработки макрофагами, соединения с антигенами ГКС класса II и появления этого комплекса на поверхности макрофага. Оказалось, что аллельные вариации этих генов определяют восприимчивость или резистентность к саркоидозу. Важно отметить, что наблюдается значительный полиморфизм этих генов в зависимости от этнической принадлежности людей. Для некоторых этнических групп существуют только «свои» гены ГКГ (Iannuzzi et al., 2003; Rybicki et al., 2003). Молекулы ГКГ на антигенпрезентирующих клетках представляет собой антиген к рецептору Т-клеток. Таким образом, существует тесное взаимодействие между некоторыми ГКГ генами и специфическими подтипами

ТКР. Действительно, как было показано, имеется ограничение ТКР у пациентов с саркоидозом, носителей подтипа ГКГ. Более того, согласно последним данным, некоторые антигены вызывают иммунную реакцию только при наличии определенного аллеля DR6 (Ikeda et al., 1992).

Генотипирование по генам ГКГ имеет потенциал для прогноза клинических фенотипов саркоидоза. Тяжесть и определенные клинические характеристики течения заболевания связаны с носительством конкретных аллелей генов ГКГ. Например, вариация в локусе *DRB1* связана с течением заболевания и с тем, какой орган будет поражен гранулемами (Grunewald et al., 2010; Wennerstrom et al., 2012). В исследованиях Grunewald с соавторами показано, что наличие *DRB1*14 и DRB1*15* аллелей как правило, повышало риск нерегулируемого заболевания (Grunewald et al., 2010). Носительство аллеля *DRB1*14* способствовало более выраженному эффекту у пациентов без синдрома Лефгрена, тогда как присутствие в генотипе аллеля *DRB1*15* оказывает большее влияние на пациентов с синдромом Лёфгрена, имеющих одновременно аллель *DRB1*03.* Причем у европейского населения связь аллеля *DRB1*03* с острым заболеванием может быть более тесной, чем у представителей других рас, например, у китайцев.

Как уже отмечено ранее, Т-регуляторные клетки могут играть значительную роль в формировании иммунного ответа при саркоидозе. Для эффективной элиминации антигена и выздоровления пациентов необходимо увеличение количества Treg клеток, что обуславливает ослабление воспалительных реакций при саркоидозе. Регуляторные Т-клетки определяются экспрессией гена *FOXP3* (forkhead box P3), который служит важным транскрипционным фактором, определяющим регуляцию, активацию и дифференцировку Treg клеток [130]. Показано, что однонуклеотидные замены и микросателлитные повторы в разных областях гена *FOXP3* участвуют в патогенезе различных заболеваний, таких как аутоиммунная патология, острый коронарный синдром [133]. Однако вопрос о связи полиморфизма этого гена с

формированием и тяжестью саркоидоза остается открытым. В работах Takano K. и Yamamoto M. не выявлено различий в группе пациентов с саркоидозом по сравнению с контрольной группой при сравнении частот аллелей и генотипов по полиморфному варианту гена *FOXP3* (Takano et al., 2007). Не обнаружено различий ассоциации полиморфизма rs3761548 гена *FOXP3* с риском развития саркоидоза и в других работах (Malysheva et al., 2017).

Оказалось, что клинические фенотипы саркоидоза могут быть связаны с количеством Treg клеток в БАЛ и зависеть от вариаций по генам ГКГ. Так, отмечено уменьшение *FOXP3+* Treg клеток в БАЛ пациентов с саркоидозом, имеющих *DRB1*0301*. Что важно, для этих больных был хороший прогноз в отношении эффективности терапии. Напротив, у пациентов, у которых отсутствовал этот аллель, наблюдали более высокие показатели пула *FOXP3+* Treg клеток (Wikén et al., 2012). Следует отметить, что такого рода различия не были обнаружены при исследовании пула этих клеток в периферической крови больных людей. Авторы делают вывод, о большей эффективности элиминации антигена у пациентов, носителей *DRB1*0301*.

После активации через ТКР Т-клетки должны получать костимулирующие сигналы для активации или ингибирующие сигналы для прекращения иммунного ответа. Ген бутирофилин-подобного фактора 2 (*BTNL2*) кодирует синтез белка, который стимулирует активацию Т-клеток и регуляторных клеток (Treg)(Nguyen et al., 2006). В исследовании ассоциации геномных вариаций с саркоидозом, была идентифицирована однонуклеотидная замена, приводящая к формированию стоп-кодона для синтеза полипептидной цепи (Valentonyte et al., 2005). Наличие этого стоп-кодона приводит к синтезу усеченной формы белка, в которой отсутствует трансмембранная область. У носителей этого варианта гена не генерируется интактный белок, который должен быть встроен в цитоплазматическую мембрану, что влечет за собой снижение регуляции активности Т-клеток (Zissel et al., 1997). Показана ассоциация этого полиморфного варианта гена *BTNL2* с семейным и спорадическим

саркоидозом у белокожих европейцев и в меньшей степени у афроамериканцев (Rybicki et al., 2005; Valentonyte et al., 2005; Li et al., 2006).

В качестве гена, вовлеченного в генетическую предрасположенность людей к саркоидозу, может выступать и ген, кодирующий трансформирующий фактор роста β (*TGFβ*). Этот фактор является мощным противовоспалительным медиатором, связанным со спонтанной ремиссей саркоидоза и с фиброзным ремоделированием легкого (Zissel et al., 1996; Krein et al., 2002). TGFβ существует в разных изоформах (TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3), которые обладают похожими функциями (Prud'homme, 2007; Sgonc, Wick, 2008). Интересно, что анализ влияния полиморфизма rs1800471 (25-й кодон) гена *TGFβ1* на развитие саркоидоза и хронической бериллиевой болезни показал отсутствие достоверной разницы в частотах аллелей и генотипов по данному полиморфному варианту гена *TGFβ1* между группой пациентов с саркоидозом по сравнению с контрольной группой (Muraközy et al., 2001). В то же время при изучении связи этого же полиморфного варианта с хронической бериллиевой болезнью было обнаружено значительное повышение частоты аллеля (у носителей которого наблюдается снижение продукции TGF-β) в когорте пациентов с данным заболеванием (Gaede et al., 2005). Оказалось, что наличие в генотипе определенных аллелей этого гена влияет на тяжесть протекания заболеваний. Частота некоторых аллелей генов *TGFβ2* и *TGFβ3* значительно увеличена в группе пациентов с фибромой по сравнению с пациентами со спонтанной ремиссией или хроническим заболеванием (Kruit et al., 2006). Таким образом, полиморфизм генов *TGFβ* может также влиять на формирование саркоидоза.

Интерферон гамма (IFNγ), также известный как интерферон II типа, представляет собой цитокин, который является неотъемлемым и важнейшим компонентом иммунной системы, с множеством функций, в основном связанных с ответом Т-хелперов 1 типа (Th1) на инфекцию (Smith, Denning, 2014). В ряде исследований показано, что интерферон-гамма вовлечен в па-

тогенез саркоидоза (Christophi et al., 2014; Smith, Denning, 2014; Gharib et al., 2016). Неказеифицирующаяся саркоидная гранулема включает Th1 CD4+лимфоциты, которые способствуют развитию иммунного ответа через высвобождение IL2 и IFNγ с последующей активацией и дифференцировкой макрофагов (Hunninghake, Crystal, 1981; Saltini et al., 1986). Активирующее действие гамма-интерферона на макрофаги опосредовано индукцией секреции этими клетками TNFa (Broose et al., 2013). Функциональная значимость IFNγ для дифференцировки Т-клеток в Th1 при саркоидозе показана в экспериментальной модели гиперчувствительного пульмонита. Было установлено, что у мышей с нокаутом гена *IFNγ,* после соответствующей антигенной стимуляции, не наблюдалось образование гранулем при развитии гиперчувствительного пульмонита (Gudmuunndsson, Hunninghake et al., 1997). В работе Moller и соавт. было отмечено, что у больных саркоидозом легких в биоптатах бронхоальвеолярного лаважа регистрировалось повышенное количество IFNγ (Moller, 1996). Мутации в гене, особенно в регуляторных областях, могут оказывать влияние на уровень его транскрипции. Так, однонуклеотидная замена в позиции -179 G на T промоторной области гена *INFG* (rs2069709) приводит к изменению уровня транскрипционной активности указанного гена. Было показано, что клетки трансфицированные репортерным комплексом, содержащим тимин в позиции -179 продуцировали в 13 раз больше IFNγ, чем те, что содержали гуанин (Bream et al., 2002). На изменение транскрипционной активности гена *INFG* также оказывают влияние однонуклеотидные замены в 3 интроне данного гена: +2109A>G и +3810G>A. В связи с этим, можно предположить, что мутации в гене *INFG* могут влиять на формирование и поддержание гранулемы. Кроме того, в ряде исследований было обнаружено, что на уровень продукции IFNγ оказывают влияние наличие тандемных повторов в интронных областях гена *INFG*. Было установлено, что число коротких тандемных повторов (STR) CA микросателитного маркера в первом интроне гена *INFG*, влияет на уровень продукции *IFNγ* in vitro

(Pravica et al., 1999; Pravica et al., 2000). Так, у индивидуумов гомозиготных по аллелю 2 (12 тандемных CA повторов) в первом интроне гена *INFG* уровень продукции интерферона гамма был выше в сравнении с носителями аллеля 3 (13 CA повторов) гена *INFG*. В ряде исследований был изучено совместное действие STR и SNP в гене *INFG* у больных саркоидозом. Показано, у людей, имеющих в генотипе комбинацию аллеля *DRB1*03* генов главного комплекса гистосовместимости с гомозиготами по аллелю 3 (13 тандемных повторов CA) первого интрона гена *INFG* повышает риск развития синдрома Лефгрена при саркоидозе (Wysoczanska et al., 2003).

Гены *TNFA* и *TNFB* локализованы в хромосомной зоне 6p21.3. *Ге*н *TNFA* расположен в локусе вместе с молекулами HLA первого и второго классов. TNF-α синтезируется в основном макрофагами, однако Т и В-лимфоциты также могут его секретировать. На уровне транскрипции и посттранскрипции осуществляется контроль синтеза TNF-α, который после соединения с рецепторами мембраны, индуцирует факторы транскрипции, регулирующие гены других цитокинов: факторов роста (TGF-β), интерлейкинов 1 и 6 (IL-1, IL-6), простагландинов и др [8,14]. Поэтому степень выраженности патологического процесса, важную роль в котором играет *TNF*-α, может быть обусловлена как уровнем экспрессии самого гена, так и его рецепторов.

Для *TNF*-α выделяют два типа рецепторов, которые существуют в двух формах-растворимой и мембранно-связанной. Это рецептор *TNF1* типа (*TNFR1*, p55 или p60) и рецептор *TNF 2* типа (*TNFR2* ,p75 или p80). Рецептор *TNF1* типа экспрессируется практически на всех клетках, а рецептор *TNF2* типа –большей частью на клетках иммунной системы. Характерной особенностью *TNFR1* является наличие на С-конце так называемого домена смерти (death domain – DD), вовлеченного в TNF -опосредованный апоптоз [71]. Известно, что в запуске и развитии каскада апоптотических реакций ключевую роль играет протеолитическая система белков- каспаз [26].

Рецептор 2 типа (*TNFR2*) с молекулярной массой 75 кДа экспрессируется главным образом лимфоидными и эпителиальными клетками, а также клетками крови, принимает участие в процессах пролиферации [73]. Кроме того, *TNF*-α индуцирует клеточный апоптоз посредством каспаза-зависимых механизмов [73]. В работах Tehmina M. и соавт. (2008) на биоптатах лимфоузлов больных туберкулёзом была изучена экспрессия генов белка M. tuberculosis MPT 64, маркёров апоптоза и генов цитокинов TGFβ , *TNF*-α ,ИЛ-10, и *IFNγ* в ЭК и ГМК. Было доказано, что микобактериальный ген MPT64, гены каспазы 3 и FasL, как маркеры апоптозных клеток, и ген TGFβ ассоциируются с меньшим количеством ЭК по сравнению с ГМК . Эти клетки не различались по уровню экспрессии генов *TNF*-α , ИЛ-10 и *IFNγ*. При изучении зависимости между экспрессией MPT64 и каспазы 3 было продемонстрировано, что в ЭК она отсутствует, а в ГМК она есть. Была выявлена зависимость-чем меньше экспрессия каспазы 3 , тем больше - MPT64. Авторами было предположено, что ЭК, содержащие микобактериальные продукты, меньше подвержены апоптозу и способны сливаться в ГМК. Процесс слияния ЭК в ГМК достаточно хорошо изучен с помощью метода электронной микроскопии. ЭК экспрессируют трансформирующий ростовой фактор, тем самым эта субпопуляция макрофагов отличается от ГМК , имея более слабую подавляющую способностью на Т-клетки и выработку *TNF*α и *IFNγ*. Клеточные протеазы – каспазы являются пусковыми ферментами апоптоза. Считают, что нарушение процессов апоптоза обусловлено изменением синтеза и функциональной активности различных каспаз, таких как каспазы 8, 3, 6 и 9 [Ярилин, 2010]. В настоящее время сведения о роли протеаз в патогенезе саркоидоза весьма малочисленны и противоречивы. Было установлено, что определенные стимулы, запуская апоптоз, повышают активность данных каспаз. По некоторым данным, высокий уровень активности каспазы 3 в активированных Т-клетках может не сопровождаться их апоптотической гибелью (Wilhelm et al., 1998; Alam et al., 1999; Stridh et al., 2001). Более того, оказывается, что лимфоциты

БАЛ пациентов с саркоидозом устойчивы к апоптотическим стимулам, что может быть причиной накопления воспалительных клеток в гранулеме, ее устойчивого состояния (Stridh et al., 2002). Cree с соавторами (Cree et al., 1987) наблюдали увеличение количества апоптотических клеток внутри гранулемы у пациентов с саркоидозом. Также была зарегистрирована значительная вариабельность интенсивности этих процессов в зависимости от степени повреждения. Важно и то, что интенсивность апоптоза в гранулеме коррелировала с количеством случаев спонтанного разрешения данного заболевания. По другим данным, у нелеченных пациентов с активным легочным саркоидозом наблюдали снижение выживаемости Treg клеток и повышение их восприимчивости к CD95L апоптотическому стимулу (Broos et al., 2015). Увеличение апоптоза, вероятно, способствует недостаточной иммуносупрессивной функции Treg клеток при саркоидозе. Дальнейшие исследования в этой области помогут определить, является ли улучшение выживаемости Treg перспективным новым терапевтическим подходом для пациентов с хроническим саркоидозом. Весьма вероятно, что процессы программируемой смерти иммуннокомпетентных клеток у больных будут зависеть от содержания TNFα, которое в основном регулируется на транскрипционом уровне.

Ранее было отмечено, что различные цитокины могут как стимулировать, так и тормозить процессы программируемой смерти клеток (ПКС). Необходимо отметить, что сведения о влиянии провоспалительных цитокинов на апоптоз противоречивы и это касается даже данных, полученных для одного и того же типа клеток, например, синовиоцитов (Wakisaka et al., 1998; Kobayachi et al., 1999; Ohshima et al., 2000). Рядом авторов показано, что в кардиомиоцитах TNFα индуцирует апоптоз через активацию p-38 MAPK-сигнального пути (Packer et al., 1995; Krown et al., 1996; Haudek et al., 2002; Kauer et el., 2009), тогда как в работах других исследователей наоборот, была продемонстрирована устойчивость этих клеток к TNFα-индуцированной ПКС (Bergmann et al., 2001, Douglas et al., 1999). В условиях ишемической

болезни сердца in vivo TNFα так же способен индуцировать апоптоз кардиомиоцитов (Krown et al., 1996). Более того, существуют данные, что TNFα повышает чувствительность клеток к Fas-индуцированной ПКС. Так, на культуре гепатоцитов было показано, что при введении в среду культивирования рекомбинантного TNFα повышается чувствительность клеток к Fas-индуцированному апоптозу, при этом активируется JNK-сигнальный путь, увеличиваются экспрессия Bid. Bim, Bax и активность каспаз-3, 7 (Enari et al., 1996; Nagata, 1997; Zheng et al., 1998; Schmich et al., 2010). Считается, что в норме гепатоциты обладают устойчивостью к TNFα в отношении ПКС, так как происходит активация NF-kB-сигнального пути, увеличивающего экспрессию ингибиторов IAP1 и IAP2, блокирующих функцию каспаз-3, 6, 9. Однако, присутствие в среде культивирования ингибитора транскрипции ActD или LPS активирует TNFα-индуцированный апоптоз клеток, ассоциированный с повышением активности эффекторных каспаз (Essid et al., 2012; Jun-Hua et al., 2014). С другой стороны, совсем противоположные результаты были получены на синовиоцитах, которые, как считается, достаточно чувствительны к Fas/FasL-индуцированному апоптозу (Firestein et al., 1995; Nakajima et al., 1995). Fas-опосредованная клеточная гибель этих клеток может быть уменьшена локальным повышением уровня TNFα или введением в среду культивирования синовиоцитов рекомбинантного IL-1β, который ингибирует экспрессию Fas-антигена на поверхности клеток (Tsuboi M. et al., 1996; Ohshima et al., 2000; Kobayashi et al., 2000). В противоположность синовиоцитам, в кардиомиоцитах IL-1β активирует ПКС, ассоциированную с экспрессией проапоптотических белков Bcl-2, эффекторных каспаз, а также эндонуклеазы G/HtrA2 (Ing et al., 1999; Shen et al., 2015). В гепатоцитах IL-1β повышает Fas-индуцированную активность каспаз-3, 7, но при этом гибели клеток не происходит (Lutz et al., 2014).

Также до конца не понятна роль изменения уровня продукции TNFα в модуляции экспрессии и активности каспаз. Для лечения заболеваний, свя-

занных с воспалением, часто используют противовоспалительные препараты, способствующие снижению уровня TNFα. Не исключение – саркоидоз. Как показано в некоторых работах, в лимфоцитарной фракции периферической крови пациентов с ревматоидным артритом, находящихся на терапии ритуксимабом (антитела к CD20-антигену В-клеток, способствующие снижение уровня TNFα в плазме крови), количество лимфоцитов периферической крови, с признаками деградации и уровень экспрессии каспазы 3,6 достоверно выше, чем у пациентов, которые не принимали ритуксимаб (Szodoray et al., 2004). Между тем, имеются данные, которые повествуют о том, что противовоспалительные факторы стимулируют апоптоз в некоторых типах клеток, повышая активность эффекторных каспаз 3 и 6 (Li et al., 2010; Lo et al., 2011). Вероятнее всего, на чувствительность клеток к апоптотическим стимулам влияет и их гистогенетическое происхождение. Так, В-клетки, выделенные из крови больных РА, резистентны к Fas-опосредованному апоптозу, тогда как В-клетки здоровых доноров, напротив, чувствительны к апоптотическим стимулам (Rapetti et al., 2015). В исследованиях, проведенных на кардиомиоцитах, выделенных из травмированного сердца было четко показано, что введение в среду культивирования TNFα приводит к активации ERK1/2- и p38MAPK-сигнальных путей, увеличению уровня экспрессии и повышению активности каспаз-3,6,8,9, снижению экспрессии проапоптотического белка Bcl-2 и как следствие апоптозу клеток (Wu et al., 2015). Тогда как интактные кардиомиоциты, возможно, устойчивы к TNFα-индуцированной ПКС (Bergmann et al., 2001, Douglas et al., 1999). Как уже было отмечено ранее, состав лимфоцитов в БАЛ регулируется через их способность к инфильтрации в очаг повреждения, пролиферацию и апоптоз (Pabst, Tschering, 1997). Все эти процессы зависят от баланса провоспалительных факторов и вероятнее всего, определяются носительством тех или иных вариаций генов, кодирующих провоспалительные цитокины, в том числе, и TNFα.

Ген *TNFα* в своей промоторной зоне содержит восемь полиморфных участков с однонуклеотидными заменами: -244G > A, -238G > A,-1031T > C, -863C > > A, - 857C > T, - 575G > A, - 376G > A, -308G > A. Наиболее изученными считаются однонуклеотидные замены гуанина на аденин в позициях – 238 и – 308, которые способны влиять на уровень продукции *TNF*-α. Было установлено, что у носителей генотипа AA -308G > A гена *TNFα* , синтезируется в 3 раза больше TNF-α , чем у носителей генотипа GG [22].

В случае другого полиморфного участка гена *TNF*-α – 238G > A противоположная ситуация. Было показано, что клетки с генотипом GG продуцируют в 1,5 раза больше TNF-α, чем при генотипе GA. В этом случае замена гуанина на аденин ведет не к повышению, а к понижению продукции цитокина. Поэтому можно сделать вывод, что измение уровня данного цитокина обусловлено однонуклеотидными заменами в положениях – 308G > A и 238G > A гена *TNF*-α. Уровень мРНК гена *TNFB* также зависит от полиморфизма – 308G > A гена *TNF-α* вследствие расположения в одном кластере.

Можно предположить, что сосуществование этих генетический маркеров в генотипе человека должно нивелировать действие друг друга и, в целом, не влиять на продукцию TNF-α, между тем они достаточно редко встречаются вместе. [215].

Участие полиморфных вариантов – 308G > A и – 238G > A гена *TNF-α* изучается при различных патологиях, между тем имеющиеся литературные данные значительно отличаются, а иногда и противоречат друг другу, что можно, в том числе, объяснить малой выборкой наблюдения. Согласно данным L.Newman, M.Lucetti данные однонуклеотидные замены не были ассоциированы с развитием саркоидоза [257,270]. Между тем дальнейшее изучение выявило сильную корреляционную связь между узловатой эритемой и измененной аллелью *TNFα* .Пациенты с узловатой эритемой без саркоидоза и при саркоидозе с узловатой эритемой имели ту же частоту этой аллели. Был сделан вывод, что узловатая эритема ассоциирована с изменением син-

теза TNFa[37]. У больных с синдромом Лефгрена, острой формой доброкачественного течения саркоидоза , чаще отмечается носительство аллели А -308G > А гена *TNF-α* [303].

Ввиду частой встречаемости и доказанного влияния на продукцию *TNF*-а делают упомянутые генетические маркеры информативными для изучения. При саркоидозе в жидкости БАЛ отмечается большое количество *TNF*а, , который продуцируется клетками как спонтанно, так и после стимуляции in vitro. В связи с этим был сделан вывод, что саркоидоз можно расценивать как модель изучения in vivo влияния полиморфизма генов *TNF* [38].

Уровнь продукции TNF-а зависит от биаллельного полиморфизма генов *TNF*а и *TNF* B. Как ранее упоминалось, провоспалительный цитокин TNFα играет значительную роль в патогенезе саркоидоза. Более того, уровень TNFα, синтезируемого альвеолярными макрофагами может служить дополнительным диагностическим критерием, который помогает выделить группу пациентов с прогностически неблагоприятным течением саркоидоза, склонным с прогрессированию и рецидивированию.[124]. Поэтому предпринимаются попытки обнаружить ассоциацию полиморфных вариантов генов *TNFB* и *TNF*-α с формированием и тяжестью этого заболевания (Ishihara et al., 1995; Seitzer et al., 1997). Некоторые аллельные вариации гена *TNF* можно рассматривать, как факторы риска развития саркоидоза легких (Feng et al., 2013). Однако имеются весьма противоречивые данные о вовлечение полиморфных вариантов гена *TNF* в генетическую предрасположенность населения к саркоидозу. Оказалось, что аллель А по -308 G>A полиморфному маркеру гена *TNF* встречается чаще у пациентов с синдромом Лёфгрена, чем при других формах саркоидоза (Kieszko et al., 2010). Согласно данным другого исследования, с повышенным риском развития этой патологии ассоциированы AG/GG генотипы по указанному полиморфному маркеру (Xie et al., 2014). По данным M.Lucetti, L.Newman, ни один из изученных ими полиморфных вариантов не был значимо связан с саркоидозом [257,270]. Особенное внимание

при анализе ассоциации аллельных вариаций гена *TNF* с предрасположенностью к саркоидозу уделяется заменам одного из нуклеотидов в промоторной части гена, что может обуславливать изменение его уровня транскрипции, а значит и количество синтезируемого белка. По данным метаанализа, проведенного Feng с соавторами, отсутствует взаимосвязь между риском развития саркоидоза и носительством полиморфных вариантов гена *TNF* -307G>A, -1031T>C, -238G>A и -857C>T и (Feng et al., 2013). Сходные результаты были получены Xie с соавторами (Xie et al., 2014).Было продемонстрировано, что полиморфный вариант 252A>G гена *TNFB* может быть потенциальным фактором риска предрасположенности к саркоидозу (Feng et al., 2013).

Пока не удалось связать носительство определенных аллельных вариаций гена *TNF* с уровнем кодируемого им цитокина в бронхоальвеолярном лаваже (Somoskövi et al., 1999; Vasakova et al., 2009). Поэтому вопрос о связи полиморфизма этого гена с развитием саркоидоза легких остается открытым.

Нельзя не упомянуть, что имеется еще ряд генов-кандидатов, которые могут быть вовлечены в этиологию и патогенез саркоидоза. Среди них ген аннексина A11 (*ANXA11*), гены матриксных металлопротеиназ (*MMP2, 7, 9*), ген рецептора к IL-23, ген рецептора витамина D (*VNDR*), ангиотензин-превращающего фермента (*ACE*) и другие.

В ряде исследований показано, что в патогенез различных заболеваний, в том числе аутоиммунных вовлечены однонуклеотидные замены (SNP) в гене *FOXP3* [20]. Согласно данным литературы, достаточное число исследований посвящены изучению мутаций в промоторной части гена *FOXP3*. В частности, в некоторых исследованиях показана взаимосвязь носительства полиморфного маркера −3279 C>A гена *FOXP3* (rs3761548) с предрасположенностью к развитию ряда заболеваний (острый коронарный синдром, апластическая анемия и др.)[137,139].Было определено, что данная мутация влияет на уровень мРНК гена *FOXP3*. Между тем, следует отметить, что данные работы по изучению роли данного генетического маркера в патоге-

незе различных заболеваний достаточно малочисленны. Что же касается влияния −3279 C>A полиморфного маркера гена *FOXP3* на развитие саркоидоза легких, то такого рода данные в литературе отсутствуют.

В заключении можно сказать, что генетический фон может определять не только восприимчивость людей к возникновению саркоидоза легких, но и определять клинические характеристики протекания данного заболевания. В связи с этим, предпринимаются попытки найти аллельные вариации, которые могли бы выступать в качестве прогностических маркеров предрасположенности населения к данному заболеванию и характеризовали бы особенности его протекания у пациентов.

1.2. **Классификация саркоидоза**

В настоящее время, в России и за рубежом, саркоидоз легких, учитывая рентгенологические данные, подразделяют на 5 стадий (от 0 до IV), которые следует называть также типами. Эта классификация утверждена международным консенсусом в 1999 году [8]

Стадия 0 –отсутствуют изменения органов грудной клетки при рентгенографии (5%).

Стадия I –Выявляется увеличение внутригрудных лимфотических узлов. Паренхима легких интактна.

Стадия II – увеличение внутригрудных лимфотических узлов сочетается с изменениями паремхимы легких.

Стадия III –присутствуют изменения легочной ткани без гиперплазии внутригрудных лимфотических узлов

Стадия IV – развитие необратимого фиброза легких.

С учетом того, что стадии крайне редко переходят одна в другую делает деление на стадии достаточно условным.

При нулевой стадии отсутствуют рентгенологические изменения органов грудной клетки (внутригрудных лимфатических узлов и легочной ткани), но в данной стадии возможны достаточно тяжелые внелегочные поражения. Согласно национальным клиническим рекомендациям (2017), целесообразно использовать следующие клинико-рентгенологические стадии саркоидоза:

1. Саркоидоз внутригрудных лимфатических узлов,
1. Саркоидоз внутригрудных лимфатических узлов и лёгких,
2. Саркоидоз лёгких,
3. Саркоидоз органов дыхания, комбинированный с единичным поражением других органов,
4. Генерализованный и экстраторакальный саркоидоз.

Национальные клинические рекомендации (2017) выделяют следующие фенотипы саркоидоза:

Фенотипы (особенные варианты течения) саркоидоза

1. По локализации

a. Классический, с преобладанием внутригрудных (лёгочных) поражений

b. С преобладанием внелёгочных поражений

c. Генерализованный

2. По особенностям течения

a. С острым началом (синдромы Лёфгрена, Хеерфордта-Вальденстрёма и др.)

b. С изначально хроническим течением.

c. Рецидив.

d. Саркоидоз детей в возрасте до 6 лет.

e. Саркоидоз, рефрактерный к лечению системными стероидами[4]

Для описания течения заболевания используют понятия активной фазы (прогрессирования), фазы регрессии (спонтанной или под влиянием лечения) и фазы стабилизации (стационарной фазы). Для характеристики течения за-

болевания применяют понятие о прогрессирующем, стационарном (стабильном) и рецидивирующем саркоидозе. При своем естественном течении саркоидоз может регрессировать, сохраняться стационарным, прогрессировать в пределах исходной стадии (формы) или с переходом в следующую стадию или с генерализацией, протекать волнообразно.[4]

1.3. Клинико-функциональные проявления саркоидоза

Гистологическое исследование морфологической структуры периферического лимфатического узла (ЛУ) при саркоидозе впервые было проведено Теребинским В.И. в 1906 году.

У 23,7% больных саркоидозом, по данным отечественных исследователей, отмечается поражение периферических лимфатических узлов [25].

Кожные поражения при саркоидозе отмечается в 25-50% случаев [12]. В Республике Татарстан, по данным Визель И.Ю. (2016), саркоидоз кожи встречался в 0,8%случаев.

Поражения глаз при саркоидозе наблюдается от 10 до 50 %, в Японии более часто - в 64-89% случаев, диагностируют поражение глаз по типу саркоидного увеита в зависимости от состава больных и регулярности офтальмологических обследований. В нашей стране саркоидоз глаз диагностируется у 18% пациентов [5,6].

Саркоидоз сердца диагностируется при наличии генерализованного саркоидоза, гистологического доказательства саркоидных гранулем в биоптате других тканей и при исключении других причин кардиомиопатии. При саркоидозе сердца гранулематозный процесс чаще выявляются в межжелудочковой перегородке. Поражение сердечно-сосудистой системы при саркоидозе, по данным разных авторов, колеблется от 5% до 78,8%. Локализация гранулем в тканях сердца приводит, прежде всего, к различным видам

аритмий, в дальнейшем, к развитию сердечной недостаточности или внезапной коронарной смерти [63].

Поражение почек при саркоидозе обусловлено нарушением обмена кальция, реже диагностируют инфильтрацию почечной ткани саркоидными гранулемами (до 20% случаев). Характерным поражением почек при саркоидозе является интерстициальный гранулематозный нефрит, степень функциональных нарушений может быть от латентной до тяжёлой, проявляющейся нефротически синдромом и развитием почечной недостаточности. [26].

У большей части больных саркоидозом, особенно при 1-2 стадии процесса, нарушений функции внешнего дыхания не выявляется. Диагностируемые функциональные нарушения часто не соответствуют степени органических повреждений, весьма разнообразны по выраженности и характеру. Обструкция, снижение диффузионной способности легких могут диагностироваться при первой стадии саркоидного процесса, между тем при выраженных изменениях в паренхиме легких – весьма незначительные нарушения функции внешнего дыхания[4]. При впервые выявленном саркоидозе органов дыхания у 44% больных выявляются различной степени обструктивные нарушения [4,11]. Таким образом, можно заметить несоответствие степени выраженности рентгенологической картины и относительно небольшой степени функциональных изменений [42].

При II рентгенологической стадии выявлялись умеренные рестриктивными и обструктивными нарушения, преимущественно за счет поражения мелких бронхов [10]. Поэтому саркоидоз некоторые авторы относят к группе заболеваний , поражающие малые дыхательные пути [12].

При рецидивирующем и прогрессирующем течении саркоидозного процесса чаще встречались рестриктивные и смешанные нарушения функции внешнего дыхания. По мнению отечественных исследователей было отмечено, что появление обструкции мелких бронхов может свидетельствовать о риске обострений и прогрессирующего течения саркоидоза [8]. При

рецидивирующем течении саркоидоза периферическая обструкция отмечалась в 69% случаев, причем жалобы на одышку часто не соответствовали степени функциональных нарушений: При легких обструктивных нарушениях одышка могла быть выраженной [28].

Обструктивные нарушения при саркоидозе обусловлены сужением бронхов из-за отека в результате эндобронхиального расположения гранулём и развития фиброза, а также сдавлением бронхов гиперплазированными лимфатическими узлами. При впервые выявленном саркоидозе развитие периферической обструкции обусловлено перибронхиальным расположением гранулем и последующей фибротической деформацией, что характерно для бронхообструктивного синдрома.

Согласно национальным клиническим рекомендациям (2017) динамический контроль бодиплетизмографии рекомендуется с дебюта заболевания, поскольку нарушения при этом исследовании регистрируются даже при отсутствии рентгенологических изменений.[4]. В качестве неблагоприятного прогностического признака в плане развития пневмофиброза, можно считать прогрессирующее снижение диффузионной способности легких. На уровень внешнего дыхания значительно влияют рецидивы саркоидоза. Было установлено, что при прогнозировании рецидива заболевания можно использовать в качестве значимых маркеров снижение легочных объемов и нарушений бронхиальной проходимости.

Основную роль при саркоидозе легких в развитии дыхательной недостаточности играют нарушения вентиляционно – перфузионных отношений [10,12]. Основные международные и российские Федеральные согласительные документы по диагностике и лечению саркоидоза (Чучалин А.Г. с соавт., 2016; Hunninghake G.W. et al., 1999; Antoniou K., 2015) рекомендуют использовать показатели спирометрии и диффузионной способности легких, как для первичных больных, так и для оценки течения заболевания.

Лабораторные биохимические методы исследования в сочетании с физикальной и рентгенологической картиной включены в стандарт обследования и динамического наблюдения больных саркоидозом [4].

При анализе данных отечественных и зарубежных исследований, направленных на изучение этиопатогенеза саркоидоза, следует отметить, что среди ряда работ, изучение генетического профиля при рецидивирующем и прогрессирующем течении заболевания привносит немногочисленные и часто противоречивые данные.

Наше исследование направлено на изучение данной проблемы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Клиническое обследование пациентов.

За период наблюдения с 2004-2018 г.г саркоидоз был диагностирован у 524 человек. Материалом нашей научной работы послужили результаты клинического, рентгенологического, лабораторного обследований и показателей функции внешнего дыхания пациентов, наблюдаемых пульмонологами отделения интенсивной респираторной терапии ГБУЗ« Республиканская больница им. В.А. Баранова »по поводу саркоидоза.

Саркоидоз диагностировался в соответствии с критериями на основе клинико- рентгенологических и лабораторных изменений, соответствал консенсусу Всемирной ассоциации саркоидоза и других гранулематозных заболеваний 1999г. [Bickett A,Lower E., Judson M.2011].

У 74% пациентов диагноз был верифицирован морфологически. Стадия заболевания оценивалась по данным рентгенографии органов грудной клетки в двух проекциях.

Данные получены на основании ретроспективного анализа клинической базы данных пациентов, состоящих в регистре на протяжении 14-летнего наблюдения. Проведен анализ медицинских карт (форма № 025\у) 524 пациентов.

Все включенные в исследование люди были русской национальности, проживающие на территории Республики Карелия. Для проведения исследований была сформирована выборка из 216 человек, которые были разделены на 2 группы: 100 больных с морфологически подтвержденным диагнозом саркоидоза (ср. возраст – 45,41±1,31 года) и 116 человек, которые вошли в контрольную группу (здоровые доноры) (ср. возраст - 42,06±1,30 года).

Критерии исключения из исследования: наличие сахарного диабета, аллергологического анамнеза, выраженные нарушения функции внутренних органов, а также перенесенные в последний месяц инфекционно-

воспалительные заболевания, курение, беременность и лактация, алкогольная зависимость, индекс массы тела ≥28 кг/м.

В дальнейшем исследовании (4 этап)100 пациентов были разделены на 2 группы : первая группа со стационарным (стабильным) течением, без ухудшений и рецидивов в анамнезе, которые никогда не получали иммуносупрессивную терапию. Вторая группа включала себя пациентов с рецидивирующим и прогрессирующим саркоидозом, получающими глюкокортикостероидную терапию.

При опросе пациентов уточнялись сопутствующие заболевания, анамнез курения, профессиональные вредности.

2.2 Функциональные методы обследования

Всем пациентам выполнялось функциональное исследование, включающее спирометрию, бодиплетизмографию с исследованием диффузионной способности легких для оксида углерода методом единичного вдоха.

Измерение воздушных потоков и объемов оценивалось критериями:

1. жизненной емкости легких (ЖЕЛ),
2. форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ),
3. объемом форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ1),
4. максимальными скоростями форсированного выдоха при выдохе 25%, 50% и 75% ФЖЕЛ (МОС 25, МОС 50 и МОС 75),
5. диффузионная способность легких для окиси углерода методом единичного вдоха (DLCO – SB) и коэффициент диффузии (DLCO-VA).

Оценка показателей функции внешнего дыхания проводилась с помощью следующих методик:

1. Спирометрия и регистрация кривой поток – объем форсированного выдоха с бронхолитическими пробами. Оценивался прирост показателей форсированного выдоха после ингаляции бронхолитика

2. Изучение легочных объемов методом бодиплетизмографии

3. Исследование диффузионной способности легких (DLCO) методом одиночного вдоха.

При анализе результатов мы руководствовались отечественными должными величинами (Клемент Р. Ф. и др., 1986).

2.3 Рентгенологические методы исследования

В стандарт обследования обязательно были включены рентгенологические методы, такие как цифровая рентгенография и спиральная компьютерная томография органов грудной клетки.

Рентгенологическая стадия саркоидоза (от 0 до IV) первоначально оценивалась по данным рентгенологических исследований. Степень поражения легочной ткани уточнялась по данным МСКТ, которая была сделана большей части пациентов. Исследования выполнялись на компьютерном томографе GE Optima CT660.

Описание рентгенологических данных проводилось по Л.Д. Линденбратену(1971). Положительная рентгенологическая динамика диагностировалась при уменьшении размеров внетригрудных лимфатических узлов на 5 мм и более и/или уменьшении выраженности изменений в паренхиме легких на 10% и более. Отрицательная рентгенологическая динамика трактовалась при увеличении размерова внутригрудных лимфатических узлов на 5 мм и более и/или увеличении выраженности изменений в лёгочной ткани на 10% и более, либо формирование «сотового легкого» или пневмофиброза.

2.4 Молекулярно-генетическое исследование.

Лабораторные исследования были проведены на научном оборудовании Центра коллективного пользования института биологии Карельского науч-

ного центра Российской академии наук «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера» (руководитель к.б.н. Топчиева Л. В.) при содействии научных сотрудников к.б.н. Малышевой И.Е., к.б.н. Балан О.В.

Материалом служили пробы периферической крови. Забор венозной крови осуществлялся утром натощак из кубитальной вены.

Генотипирование.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови (ЛПК) с помощью набора «Analytik jena» (Германия) следуя протоколу фирмы производителя. Генотипирование полиморфных вариантов -308G>A (rs1800629), -238G>A (rs361525) гена *TNF*, а также -3279 C>A гена *FOXP3* (rs3761548) осуществляли с помощью метода ПЦР-ПДРФ (с оценкой полиморфизма длин рестрикционных фрагментов). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на приборе iQ5 (Биорад, США). Для амплификации использовали наборы «HS-Screen mix» и праймеры производства фирмы «Евроген» (Россия). Специфичные праймеры для проведения ПЦР и соответствующие эндонуклеазы рестрикции для каждого полиморфного маркера приведены в таблице 1 .

Таблица 1.Нуклеотидная последовательность праймеров и эндонуклеазы рестрикции, использованные для проведения ПЦР-ПДРФ анализа

Ген	Полиморфный маркер; локализация	Нуклеотидная последовательность праймеров	Температура отжига праймеров (Tm), C	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.	Эндонуклеаза реестрикции	Аллели и размер фрагментов рестрикции
TNF	**-308G>A** (rs1800629); промотор	F: 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' R: 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'	60	107	NcoI	G – 87+20 A – 107
	-238G>A (rs361525); промотор	F: 5'-AGAAGACCCCCCTCGGAACC-3' R: 5'-ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG-3'	60	152	MspI	G – 133+19 A – 152
FOXP3	**-3279C>A** (rs3761548); промотор	F: 5'-GCCCTTGTCTACTCCACGCCTCT-3' R: 5'-CAGCCTTCGCCAATACAGAGCC-3'	61	487	PstI	C – 329+158 A – 487

Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе iQ5 (Биорад, США). Для амплификации использовали наборы «HS-Screen mix» (Евроген, Россия). Условия ПЦР: денатурация - 95ºС 5 мин – 1 цикл, повторяющиеся циклы (35): денатурация – 30 с при 95ºС, отжиг – 30 с при 60ºС (61ºС для гена *FOXP3*), элонгация – 30 с при 72ºС; достраивание фрагментов – 10 мин при 72ºС. Последовательность праймеров (Евроген, Россия) для проведения ПЦР указана в таблице 1.

Рестрикционный анализ.

Гидролиз продуктов амплификации проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции: NcoI (Thermo Scientific, Германия) для rs1800629, MspI (Сибэнзим, Россия) для rs361525 и PstI (Thermo Scientific, Германия) для rs3761548. Рестрикционный анализ проводили в соответствие с инструкцией фирмы изготовителя. К 20 мкл реакционной смеси, содержащей 8 мкл продукта ПЦР, добавляли 2 мкл соответствующего буфера, 10 мкл ddH2O и 1 мкл (1 ед. а) соответствующей эндонуклеазы рестрикции. Реакционную смесь инкубировали в течение 3 часов при температуре 37°С. Фрагменты ДНК, полученные после обработки соответствующими эндонуклеазами рестрикции (таблица 1), разделяли в 8% полиакриламидном или 2% агарозном геле, используя трис-ацетатный буфер. Гели окрашивали водным раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Фрагменты ДНК и визуализировали в проходящем УФ-свете и анализировали с помощью программы Kodak 1D.

Определение уровня транскриптов генов.

Тотальную РНК выделяли из лейкоцитов периферической крови (ЛПК) с помощью набора «Axyprep Multisource Total RNA Miniprep Kit» («Axygen», США). Концентрацию и качество тРНК определяли на спектрофотометре «SmartSpect Plus» («Био-Рад», США). Первую цепь кДНК синтезировали используя набор «MMLV RT kit» («Евроген», Россия). Уровень экспрессии мРНК генов оценивался с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе iCycler iQ5 («Био-Рад», США).

Нуклеотидная последовательность праймеров для ПЦР представлена в таблице 2

Таблица 2.Нуклеотидная последовательность праймеров для проведения ПЦР

Ген	Нуклеотидная последовательность праймеров	Температура отжига праймеров (Tm), °C	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.	Литература
TNF	F: 5'-TCAGCCTCTTCTCCTTCCTG-3' R: 5'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA-3'	58	124 .	Pinto et al., 2010
FOXP3	F: 5′-GGCACTCCTCCAGGACAG-3′ R: 5′-GCTGATCATGGCTGGGCTCT-3′	60	112 .	Genre et al., 2009
CASP3	F: 5'-ATGGAAGCGAATCAATGGAC-3' R: 5'-ATCACGCATCAATTCCACAA-3'	58	242	Bozec et al., 2005
CASP6	F: 5'-ACTGGCTTGTTCAAAGG-3' R: 5'-CAGCGTGTAAACGGAG-3'	58	183	Bozec et al., 2005
CASP9	F: 5'-AACAGGCAAGCAGCAAAGTT-3' R:5'-CACGGCAGAAGTTCACATTG-3'	58	247	Bozec et al., 2005
18sRNA	F: 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3' R: 5'-TTGGCAAATGCTTTCGCTC-3'	58	62	Pinto et al., 2010
GAPDH	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' R: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	58	226	Kolomeichuk et al., 2008

В качестве референсных генов были использованы гены *GAPDH* и *18sRNA*

Относительный уровень экспрессии (ОУЭ) оценивался по формуле: ОУЭ=$2^{-\Delta C_T}$, где ΔC_T-разность между значениями пороговых циклов референсного и таргетного генов (Livak, Schmittgen, 2001).Специфичность ПЦР продуктов определяли по кривым плавления. ПЦР-РВ ставили не менее трех раз для каждого изучаемого образца.

2.5. Статистическая обработка результатов.

Тестирование выборочных распределений переменных на статистически значимое различие с нормальным законом распределения вероятностей проводилось с помощью критерия Шапиро-Уилка. В случае отклонения гипотезы о статистически значимом различии данные соответствующей переменной были представлены в виде среднего значения ± среднеквадратического отклонения (M ± StD), сравнение средних между двумя группами проводили с помощью t-критерия Стьюдента, сравнение средних между 3 и более группами проводили с помощью дисперсионного анализа ANOVA. Данные переменных, выборочные распределения которых статистически значимо отклонялись от нормального закона, представлены в виде медианы с интерквартильным размахом [Me (Q_{25}; Q_{75})]. Для сравнения выборок таких переменных между группами использовались методы непараметрической статистики. В частности, статистическую достоверность различия распределения частот аллелей и генотипов между группами оценивали с помощью критерия $\chi 2$ и точного критерия Фишера. Статистическую достоверность различия уровня транскриптов гена между группами исследования и контроля оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Для оценки влияния генотипов на уровень транскриптов генов использовали непараметрический дисперсионный анализ Краскелла-Уоллиса. Восстановления зависимости переменных на переменную отклика использовали метод линейной регрессии. Для анализа и оценки ассоциативной взаимосвязи между мутантным аллелем и риском развития заболевания рассчитывали отношение шансов (ОШ) по четырехпольной таблице сопряженности признаков (мутантный/немутантный аллель – наличие/отсутствие признака).

Уровень статистической значимости для принятия гипотезы о различии выборочных средних и распределений частот, а также статистической значимости всех рассчитываемых параметров и оценок, был принят равным

0,05.Статистическую обработку данных проводили в программной среде пакета «StatGraphics 2.1».

ГЛАВА 3. Клиническая характеристика пациентов с различным течением саркоидоза

3.1 Эпидемиология саркоидоза в Карелии

За 2004-2018 г.г. наблюдения саркоидоз диагностирован у 524 человек. По нашим данным, распространенность саркоидоза в Карелии составила 73 чел на 100 тыс. населения. Наибольшая распространенность отмечалась в северных районах Карелии (Беломорский, Кемский, Сегежский). Ежегодно диагностировались новые случаи саркоидоза у 15-20 чел.

При первом обследовании возраст больных колебался от 18 до 75 лет (средний возраст 45.8 ±3.2 лет). Среди них 189 (35%) мужчин и 335 (65 %) женщин. Было выявлено 4 случая семейного саркоидоза (брат- сестра, мать-сын).

3.2 Клиническая характеристика пациентов с саркоидозом

При первичном обращении 0 стадия была констатирована у 2 (1 %) больных, I стадия – у 138 (26 %) , II стадия – у 323чел (62 %) , III стадия – у 49 (9 %) , IV стадия – у 12 (2 %) больных. У 41 пациента (7.9 %) было отмечено острое и подострое течение заболевания с развернутой картиной синдрома Лефгрена (лихорадка, узловатая эритема, артралгии, увеличение внутригрудных лимфатических узлов).

У 104 пациентов (19.9 %) были отмечены экстраторакальные проявления саркоидоза, из них у 46 чел (9%) поражения кожи (васкулит, подкожные узелки), у 100 чел (19%) поражения лимфатических узлов различной локализации, у 6 чел (1.2%) поражение нервной системы (нейросаркоидоз с бульбарными нарушениями, периферическая нейропатия), поражения печени – у 5 чел (1 %), поражения глаз у 5 чел (1 %) , поражения суставов различной локализации – у 6 чел (1.2 %), поражения селезенки – у 5 чел (1 %), пораже-

ния почек у 3 чел (0.5 %), поражения сердца у 3 чел(0.5 %) (констриктивный перикардит, миокардит).

У 74 % больных саркоидоз был верифицирован гистологически на основании исследования биоптата. В остальных случаях диагноз устанавливался на основании клинико–рентгенологических данных и исключении других заболеваний.

Для морфологической верификации диагноза саркоидоза использовались следующие методы диагностики: видеоторакоскопия – 50 % случаев, трансбронхиальная биопсия – 43 %, открытая биопсия легких – 3 %, биопсия другого органа (кожа, периферический лимфатический узел) – 4%.

При анализе сопутствующей патологии у 41 пациентов (7.9 %) выявлена гипертоническая болезнь, у 146 пациентов (28 %) диагностирована различная патология ЖКТ, у 9 (1.7 %) человек - хроническая обструктивная болезнь легких, у 6 (1.2 %) пациентов - бронхиальная астма, у 42 (8 %) пациентов- патология щитовидной железы.

120 человек (23 %) были курильщиками или курили в прошлом. У 5 человек выявлены профессиональные вредности (работа в противопожарной службе, типографии, сварщик, щебеночное производство).

Клинико- функциональная характеристика сравниваемых групп пациентов с благоприятным и прогрессирующим (рецидивирующим) течением представлена в таблице 3

Таблица 3 Клинико- функциональная характеристика групп пациентов с благоприятным и прогрессирующим (рецидивирующим) течением

	Стабильное течение, n=50	Прогрессирующее течение , n=50	p
Возраст	35.3±1.13	48.44±3.37	
Пол муж	21\0.42	14\0.28	p>0.05
жен	29\0.58	36\0.72	
Стадии первая	21\0.42	8\0.16	p<0.01
вторая	25\0.5	25\0.5	
третья	4\0.08	16\0.32	
четвертая	0\0	1\0.02	
Количество больных с обструктивными нарушениями	0\0	5\0.1	p<0.05
Количество больных с рестриктивными нарушениями	1\0.02	2\0.04	p=0,56
Количество больных с нарушением диффузионной способности легких	3\0.06	9\0.18	p=0,066

В группе пациентов со стабильным течением чаще встречается первая и вторая стадии заболевания. В группе пациентов с прогрессирующим и рецидивирующим течением превалируют вторая и третья стадии саркоидоза, отмечена тенденция к более частому нарушению функции внешнего дыхания.

Экстраторакальные проявления при сравнении групп пациентов с благоприятным и прогрессирующим (рецидивирующим) течением показаны в таблице 4.

Таблица 4 Экстраторакальные проявления при сравнении групп пациентов с благоприятным и прогрессирующим (рецидивирующим) течением

Внелегочные проявления	Стабильное течение , n=50	Прогрессирующее течение, n=50	p
Лимфаденопатия	7\0.14	15\0.3	p>0,05
Поражение кожи	12\0.24	4\0.08	p<0.05
Поражение печени	0\0	5\0.1	p<0.05
Поражение глаз	0\0	5\0.1	p<0.05
Поражение сердца	0\0	2\0.04	p>0,05
Поражение нервной системы	0\0	6\0.12	p<0.05
Поражение почек	0\0	3\0.06	p>0,05
Поражение слюнных желез	0\0	2\0.04	p>0,05
Поражение селезенки	0\0	5\0.1	p<0.05
Поражение суставов	1\0.02	2\0.04	p>0,05

В группе пациентов с прогрессирующим и рецидивирующим течением достоверно чаще отмечалось поражение кожи по типу узлов и бляшек , lupus pernio. В данной группе чаще регистрировалось поражение печени (гепатомегалия, очаговые поражения), глаз (передний и задний увеит) , нервной системы (нейросаркоидоз с бульбарными нарушениями, периферическая нейропатия), селезенки (спленомегалия, гиперспленизм).

Сравнительная характеристика коморбидной патологии сравниваемых групп пациентов с благоприятным и прогрессирующим (рецидивирующим) течением показана в таблице 5. Достоверно значимых различий коморбидной патологии в сравниваемых группах не выявлено.

Таблица 5 Сравнительная характеристика коморбидной патологии пациентов с благоприятным и прогрессирующим (рецидивирующим) течением саркоидоза.

Анамнестический признак	Стабильное течение, n=50	Прогрессирующее течение,n=50	p
Ишемическая болезнь сердца	2\0.04	1\0.02	p>0,05
Гипертоническая болезнь	2\0.04	9\0.18	p<0.05
ХОБЛ	0\0	3\0.06	p>0,05
Бронхиальная астма	0\0	1\0.02	p>0,05
Патология щитовидной железы	1\0.02	2\0.04	p>0,05
Язвенная болезнь	1\0.02	1\0.02	p>0,05
Миома матки	1\0.02	2\0.04	p>0,05
Вирусный гепатит	0\0	1\0.02	p>0,05

Данные функционального исследования легких

Были оценены результаты функциональных тестов у 352 пациентов. У 15 человек (4.3%) выявлены рестриктивные, а у 8 человек (2.3%) – обструктивные нарушения. Данные изменения были зарегистрированы у пациентов с II-IV стадией заболевания. Снижение диффузионной способности легких выявлено у 13 человек (3.7 %) (снижение DLco и низкое DLco\Va, что характерно для паренхиматозных нарушений).

Сравнительная характеристика функциональных нарушений сравниваемых групп пациентов с благоприятным и прогрессирующим (рецидивирующим) течением представлена в таблице 3

3.3 Анализ течения заболевания

В нашем центре терапию по поводу гистологически подтвержденного саркоидоза получали 172 пациента (42.8 %). В 63.4 % (109 человек) препара-

том выбора являлся преднизолон, который назначался в начальной дозе 40-45 мг в сутки со снижением дозы по схеме до полной отмены, курсом 10-18 месяцев, в 2.3 % (4 пациента)– метотрексат. Длительность терапии преднизолоном составила 12.3±4.6 мес.У 3 пациентов проводилась пульс-терапия (1000 мг в сут метилпреднизолона в течение 3 суток) по поводу нейросаркоидоза с бульбарными нарушениями, нефротического синдрома, экссудативного перикардита. 12 % пациентов (63 человека) получали НПВС по поводу синдрома Лефгрена. В анамнезе у 1.5% пациентов (6 человек) отмечалась туберкулостатическая терапия.

При наблюдении положительная клинико-лабораторная и рентгенологическая динамика (спонтанная регрессия и регрессия в процессе лечения) была отмечена у 312 (59%) пациентов. Прогрессирующее течение отмечалось у 8 % (40 пациентов). Стабилизация состояния (спонтанная, в процессе или после терапии) была достигнута у 30% (158 больных). Рецидивы заболевания через 1 год после окончания основного курса лечения или после спонтанной регрессии отмечались у 14 пациентов (12.4 % всех пациентов, получавших иммуносупрессивную терапию).

3.4. Факторы, способствующие прогрессированию заболевания.

Наиболее часто рецидивирующее течение саркоидоза отмечалось:

- у пациентов старше 45 лет (средний возраст 49.5 ±3.2 лет),
- с отягощенным коморбидным фоном (42.6%, 23 человека из 54 пациентов с рецидивирующим и прогрессирующим течением)
- женщины составили 71 % (38 чел),
- у 80% (40 пациентов) наблюдались внелегочные проявления саркоидоза.

Глава 4. Результаты исследования.

4.1. Анализ ассоциации полиморфных маркеров -308G>A и -238G>A гена *TNF* с риском развития саркоидоза.

В проведенном нами исследовании мы изучили распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов -308G>A и -238G>A гена *TNF*а в группе больных саркоидозом и в контрольной группе.

Данные по распределению частот аллелей и генотипов полиморфного маркера -308G>A гена *TNF* в контрольной группе и у больных саркоидозом представлены в таблице 6.

Таблица 6. Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта -308G>A гена *TNF* в группе больных саркоидозом и в контрольной группе

Аллели	Больные саркоидозом, n =116	Контроль, n =99	Точный критерий Фишера	ОШ (95%ДИ)
G	174 (0,87)	199 (0,92)	p = 0,71 (**Критерий χ^2** p=0,60)	1,22 (0,59; 2,54)
A	16 (0,08)	15 (0,08)		

Генотипы	Больные саркоидозом, n =116	Контроль, n =99	Точный критерий Фишера
GG	83(0,84)	95 (0,82)	p=0,39
GA	16(0,16)	18 (0,16)	
AA	0 (0,0)	3 (0,02)	

Примечание: здесь и далее n- число обследованных лиц

Тест на соответствие распределения равновесию Харди-Вайнберга показал, что генотипы исследуемого полиморфного маркера гена *TNF*а находились в соответствии с этим распределением в контрольной группе ($\chi2$ = 2,96 (df=2, p<0,05)) и группе больных с саркоидозом ($\chi2$ = 0,64 (df=2, p<0,05))

По результатам исследования, нами не установлены достоверные различия в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного маркера -308G>A гена *TNF*a в контрольной группе и в группе больных саркоидозом (таблица 6).

В проведенном исследовании мы изучили распределение генотипов и аллелей по -308G>A полиморфному варианту гена *TNF*a в группах больных с благоприятным и рецидивирующим течением саркоидоза легких (таблица 7). Было отмечено,что частоты аллелей по данному полиморфному варианту гена *TNFa* значимо отличаются в группах больных саркоидозом с благоприятным и рецидивирующим течением .Установлено, что аллель А исследуемого полиморфного варианта гена *TNF*- 308G>A встречается только в группе больных без рецивирующего течения заболевания (таблица 7).

Таблица 7. Встречаемость аллелей по -308 G>A полиморфному варианту гена *TNF* в группах больных саркоидозом с благоприятным и рецидивирующим течением

Аллели	**Больные с саркоидозом без рецидивов, n=50**	**Больные с рецидивирующим саркоидозом, n=50**	**Контроль, n=50**	**Точный критерий Фишера, p**
G	90 (0,9)	100 (1,0)	92 (0,92)	0,002
A	10 (0,1)	0 (0,0)	8 (0,08)	

ОШ (95%ДИ) 0.116 (0.015;0.922).

Нами также был проведен сравнительный анализ распределений аллелей и генотипов по -238G>A полиморфного варианту гена *TNF* в исследуемых группах (таблица 8). Распределение генотипов исследуемого полиморфизма гена *TNF* находилось в соответствии с распределением по уравнению Харди-Вайнберга в группе больных саркоидозом легких ($\chi2$ = 0,15 (df=2, p>0,05)) и не соответствовало в контрольной группе ($\chi2$ = 19,91 (df=2, p<0,05)).

Таблица 8. Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта -238G>A гена *TNF* в группе больных саркоидозом и в контрольной группе

Аллели	Больные с саркоидозом, n=50	Контроль, n=50	Точный критерий Фишера	ОШ (95%ДИ)
G	157 (0,958)	182 (0,958)	p=0,78 (Критерий χ^2 p=0,80)	1,35 (0,44; 4,11)
A	7 (0,042)	6 (0,032)		

Генотипы	Больные с саркоидозом, n=50	Контроль, n=50	Точный критерий Фишера
GG	77 (0,917)	90 (0,938)	p= 0,23
GA	7 (0,083)	4 (0,042)	
AA	0 (0,0)	2 (0,020)	

Установлено, что распределение аллелей и генотипов по полиморфному варианту rs361525 гена *TNF-a* в группе больных саркоидозом легких по сравнению с контрольной группой достоверно не различалось (p>0,05) (таблица 8). В обеих группах гомозиготный GG генотип представлен наиболее часто, доля которого составила 93,75% в контрольной группе и 91,67% у больных саркоидозом. Тогда как редкий AA генотип исследуемого полиморфного маркера гена *TNF*-238G>A был обнаружен только вгруппе контроля.

Ввиду того, что не было выявлено взаимосвязи исследуемого гена *TNF-a* в развитием саркоидоза, можно предположить, что данный полиморфный вариант может быть связан не с предрасположенностью к заболеванию, а с характером течения процесса. Так в работах Sharma и соавторов продемонстрировано, что у пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности, носительство генотипа AA по -238G>A полиморфному варианту гена *TNF-a* повышает риск смертельного исхода в 2,5 раза (Sharma et al., 2013). В связи с этим, мы изучили распределение

аллелей по -238G>A полиморфному варианту гена *TNF-a* в группах больных с благоприятным и рецидивирующим течением саркоидоза легких (таблица 9).

Таблица 9.Встречаемость аллелей по -238G>A варианту гена *TNFa* в группах больных саркоидозом с благоприятным и рецидивирующим течением.

Аллели	Больные с саркоидозом без рецидивов, n=50	Больные с рецидивирующим саркоидозом, n=50	Контроль, n=50	Точный Критерий Фишера
G	98 (0,98)	88(0,88)	96 (0,96)	p= 0,01
A	2 (0,2)	12 (0,12)	4 (0,04)	

ОШ (95%ДИ) 8.227 (2.26; 29.05).

Показано, что частоты аллелей по -238 G>A полиморфному варианту гена *TNFa* значимо отличаются в группах больных саркоидозом с благоприятным и рецидивирующим течением (таблица 9) У носителей аллеля А по указанному маркеру ассоциирован риск возникновения рецидивирующего течения саркоидоза.

Подводя итог, в нашем исследовании не была выявлена ассоциация полиморфных вариантов -308G>A и -238G>A гена *TNFa* с предрасположенностью к саркоидозу у русского населения Республики Карелия в общей выборке. Однако, данные полиморфные маркеры ассоциированы с клинической формой указанной патологии (саркоидоз со стабильным и рецидивирующим течением).

Зная о том, что однонуклеотидные замены влияют на мРНК гена, можно прогнозировать, что у носителей разных аллелей и генотипов по указанным полиморфным вариантам гена *TNFa,* вероятно, будут наблюдаться и различия в уровне его транскриптов. В связи с этим мы изучили уровень мРНК гена *TNFa* в лейкоцитах периферической крови у людей контрольной

группы и в группе пациентов с саркоидозом.

По результатам исследования было выявлено достоверно значимое повышение количества транскриптов гена *TNF* в лейкоцитах крови пациентов с саркоидозом по сравнению с контрольной группой (рисунок 1).

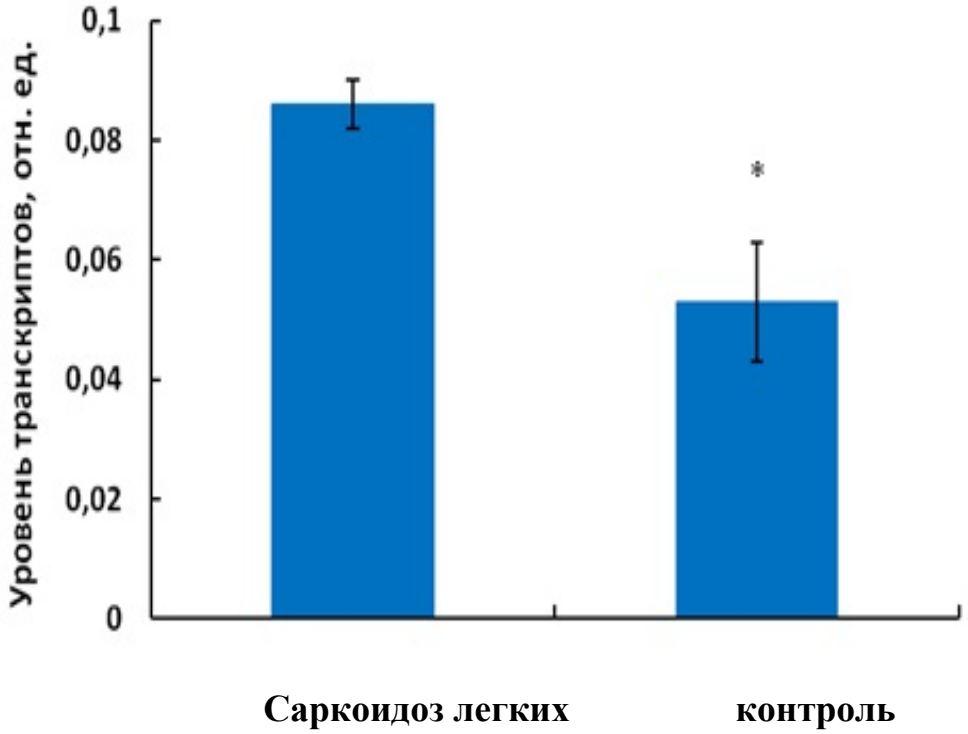

Рисунок 1-Относительный уровень мРНК гена *TNF* в лейкоцитах периферической крови здоровых доноров (контроль) и больных саркоидозом

***** Различия достоверны по сравнению с контролем ($p<0,05$).

Мы изучили уровень мРНК (отн. ед.) гена *TNF-a* в ЛПК здоровых людей и больных саркоидозом с разным течением заболевания (таблица 10).

Таблица 10.Уровень мРНК (отн. ед.) гена *TNF* в ЛПК здоровых людей и больных саркоидозом

Группы	Средние значения, отн. ед.	Me (Q1;Q3)
Контрольная группа (n=23)	0.062±0.007	0.048(0.042;0.078)
Больные с саркоидозом без рецидивов (n=30)	0.086±0.04*	0,066 (0,047; 0,098)
Больные саркоидозом с рецидивами (на терапии) (n=14)	0.050±0.005**	0,055 (0,038; 0,067)

Примечание: *Достоверно значимые различия при сравнении с контрольной группой (p=0.032) **Достоверно значимые различия при сравнении с группой больных на терапии (p=0.019)

Отмечается значимое увеличение уровня транскриптов гена *TNF-a* у пациентов со стабильным саркоидозом в сравнении с группой контроля и снижение у пациентов, получающих глюкокортикостероидную терапию.

В связи с полученными данными, мы решили определить уровень мРНК гена *TNFa* в контрольной группы и в группе больных саркоидозом с разными генотипами по исследуемым полиморфным маркерам гена *TNFa* (таблица 11,12).

Таблица 11.Уровень мРНК гена TNF в ЛПК у носителей разных генотипов по полиморфному варианту -308G>A в контрольной группе и группе больных саркоидозом.

	Группы			
	Контрольная группа		Больные с саркоидозом	
генотипы	GG (n=13)	GA+AA (n=10)	GG (n=12)	GA (n=10)
Среднее значение	0.0531± 0.0151	0.0638± 0.0267	0.072±0.027	0.093±0.046
Минимум	0.220	0.035	0.021	0.042
Максимум	0.072	0.107	0.158	0.159
Медиана	0.05	0.072	0.065	0.098

Отмечалась тенденция к повышению уровеня транскриптов гена *TNFa* в контрольной группе у лиц, имеющих GA и AA генотипы по -308G>A полиморфному варианту по сравнению с носителями GG генотипа (таблица11). Однако эти различия были статистически недостоверны (p=0.489). В группе больных саркоидозом, имеющих GG генотип по -308G>A полиморфному варианту, отмечалась тенденция к снижению экспрессии гена *TNF-a* по сравнению с пациентами, имеющими GA генотип. Однако эти различия были статистически недостоверны (p=0.429).

При сравнении группы больных саркоидозом и контрольной группы не было обнаружено статистически значимых различий в уровне мРНК гена *TNFa* у носителей разных генотипов по полиморфному маркеру -308G>A (rs1800629) гена *TNF*.

Таблица12.Уровень транскриптов гена *TNF* в ЛПК носителей разных генотипов по полиморфному варианту -238C>A в контрольной группе и группе больных саркоидозом

	Группы			
	Контроль		Пациенты с саркоидозом	
генотипы	GG (n=10)	GA+AA (n=12)	GG (n=16)	GA+AA (n=12)
Среднее значение	0.024±0.005	0.053±0.028*	0.058±0.022	0.053±0.028
Минимум	0.019	0.018	0.016	0.018
Максимум	0.029	0.088	0.098	0.088
Медиана	0.024	0.056	0.062	0.056

Примечание: *Различия достоверны по сравнению с генотипом GG (p=0.0487).

Показано, что количество транскриптов гена *TNF* было значимо выше (p=0.0487) в группе контроля, у лиц, имеющих GA и AA генотипы по -238G>A полиморфному варианту (таблица 12). Отмечено достоверно более высокое содержание мРНК у носителей аллеля A, по сравнению с генотипом

GG. Таким образом подтверждается ассоциация генотипа по -238G>A полиморфному варианту гена *TNFa* и содержанием его мРНК (H=7,88; p=0,005). В группе больных саркоидозом количество транскриптов гена *TNFa* у носителей аллеля G и аллеля A достоверно не различалось (p=0,727).

Таким образом, результаты проведенных нами исследований позволяют предположить, что изучаемые полиморфизмы гена *TNFa* не вовлечены в генетическую предрасположенность к развитию саркоидоза, но могут влиять на тяжесть протекания патологического процесса у больных данным заболеванием. -238G>A полиморфный вариант гена *TNFa* может быть вовлечен в формировании разных клинических форм саркоидоза (без рецидива и с рецидивом) посредством влияния на его транскрипционную активность.

В нашей работе не выявлена взаимосвязь полиморфного маркера -238 G>A (rs361525) гена TNF*a* с предрасположенностью к развитию саркоидоза. Ввиду того, что не выявлено разницы в содержании мРНКгена TNF*a* у носителей указанных генотипов позволяет предположить, что обнаруженный нами повышенный мРНК -238 G>A гена TNF-*a* у больных саркоидозом связан с характером воспалительной реакции при данном заболевании.

4.2. Анализ ассоциации полиморфного маркера -3279C>A гена *FOXP3* с развитием саркоидоза легких

По результатам проведенного исследования не было выявлено различий в частотах аллелей и генотипов по полиморфному маркеру -3279C>A гена *FOXP3* в группе больных саркоидозом по сравнению с контрольной группой (p>0,05) (таблица 13).

Таблица 13.Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера -3279 C>A гена *FOXP3* в контрольной группе и в группе больных саркоидозом

Аллели	Больные с саркоидозом, n=50	Контроль, n=50	Точный критерий Фишера, p	ОШ (95%ДИ)
C	95 (0,596)	110 (0,59)	p=0,91 (**Критерий** χ^2 p=0,99)	0,97 (0,62; 1,52)
A	57 (0,357)	68 (0,36)		

Генотипы	Больные с саркоидозом, n=50	Контроль, n=50	Точный критерий Фишера, p
CC	36 (0,364)	42 (0,362)	p=0,99 (**Критерий** χ^2 p=0,99)
CA	46 (0,465)	53 (0,457)	
AA	17 (0,171)	21 (0,181)	

Примечание: здесь и далее n - число обследованных лиц

Таким образом, нами не выявлена связь носительства полиморфного варианта -3279C>A гена *FOXP3* с предрасположенностью к развитию саркоидоза. Тем не менее, известно, что полиморфизм генов может не влиять на формирование заболевания, но может при этом влиять на особенности протекания данного процесса у больных людей. В связи с этим, нами проанализирована встречаемость генотипов по указанному полиморфному маркеру в группе больных с саркоидозом без рецидивов и в группе больных с рецидивирующим саркоидозом (таблица 14).

Таблица 14.Распределение генотипов полиморфного маркера -3279C>A гена FOXP3 в группах больных саркоидозом с благоприятным и рецидивирующим течением.

Аллели и генотипы	Больные с саркоидозом без рецидивов, n=50		Больные с рецидивирующим саркоидозом, n=50		Критерий Фишера
C	45	0.62	44	0.56	p>0.05 (Критерий χ^2 0.664 (df=1;
A	26	0.38	34	0.44	
CC	15	0.296	17	0.24	p>0.05 (Критерий χ^2 4,218 (df=2;)
CA	29	0.58	21	0.33	
AA	6	0.124	12	0.43	

Примечание: n- число обследованных лиц.

Как видно из таблицы, частоты аллелей и генотипов по -3279C>A (rs3761548) *FOXP3* не различаются в двух группах сравнения. На данный момент нельзя утверждать о связи указанного полиморфного варианта гена *FOXP3* с рецидивирующей (прогрессирующей) формой саркоидоза.

Тем не менее, по данным литературы этот полиморфный вариант может быть связан с наследственной предрасположенностью к ряду воспалительных заболеваний. Возникает вопрос, посредством каких механизмов указанная мутация влияет на функцию *FOXP3* и активность Т-регуляторных клеток. Как уже упоминалось, rs3761548 представляет собой замену цитозина на аденин в позиции -3279, относящейся к промоторной части гена *FOXP3*. Мутации в 5' регуляторных областях могут влиять на транскрипционную активность генов.

В связи с этим мы проанализировали уровень мРНК гена *FOXP3* в лейкоцитах периферической крови пациентов с саркоидозом и здоровых

доноров, имеющих в генотипе разные аллельные вариации по rs3761548 (таблица 15)

Таблица 15.Уровень мРНК гена *FOXP3* в ЛПК носителей разных генотипов по полиморфному варианту -3279C>A в контрольной группе и группе больных саркоидозом

	Контрольная группа			Пациенты с саркоидозом	
генотипы	AA (n=17)	CA (n=15)	CC (n=12)	AA+AC (n=12)	CC (n=13)
Среднее значение	0.355± 0.023	0.293±0.067	0.226±0.032*	0.155± 0.027	0.249±0.046
Минимум	0.270	0.038	0.110	0.032	0.092
Максимум	0.438	0.702	0.448	0.302	0.55
Медиана	0.358	0.218	0.195	0.147	0.151

Примечание: *Различия достоверны по сравнению с генотипом AA (p=0.0077).

Показано, что содержание мРНК гена *FOXP3* значимо различалось в контрольной группе у лиц, имеющих AA и CC генотипы по -3279C>A полиморфному варианту. У носителей AA генотипа, уровень транскриптов этого гена был выше, чем у гомозигот по аллелю C. В группе больных саркоидозом у носителей AA+AC генотипов содержание мРНК гена *FOXP3*, напротив, имело тенденцию к снижению по сравнению с пациентами, имеющими CC генотип. Однако эти различия были статистически недостоверны (p=0.13). По данным дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса, влияние замены -3279C>A в гене *FOXP3* на уровень его транскриптов в контрольной группе статистически не достоверно (H=0.839; p=0658). Это наводит на мысль, что у больных носительство аллеля A по rs3761548 может быть связано с понижением транскрипционной активности гена *FOXP3* и повышением риска рецидивирующего течения данного заболевания.

Чтобы проверить данное предположение, мы оценили содержание мРНК указанного гена у пациентов с саркоидозом рецидивирующего и не рецидивирующего характера.

Таблица 16.Уровень мРНК гена *FOXP3* в ЛПК здоровых людей и больных саркоидозом

Группы	Средние значения, отн. ед.	Me (Q1;Q3)
Контрольная группа (n=17)	0.239±0.036	0.178(0.134;0.343)
Больные с саркоидозом без рецидивов (n=15)	0.215±0.032*	0,172 (0,131; 0,323)
Больные с рецидивирующим саркоидозом, на терапии (n=12)	0.107±0.032**	0,121 (0,067; 0,206)

Примечание:*Различия не достоверны по сравнению с контрольной группой (p>0,05).**Различия достоверны по сравнению с группой больных без рецидивов (p<0.05).

Количество транскриптов гена *FOXP3* в лейкоцитах периферической крови больных саркоидозом, не получающих противовоспалительных препаратов, и в контрольной группе значимо не различалось (таблица 16). Однако в ЛПК больных, находящихся на терапии, содержание мРНК указанного гена было достоверно ниже, чем у пациентов без терапии. Следовательно, можно предположить, что глюкокортикостероидная терапия способствовала уменьшению количества Treg клеток.

Важно, что в ЛПК больных с рецидивирующим саркоидозом наблюдается более низкий уровень транскриптов гена *FOXP3*. Это наводит на мысль, что у пациентов снижение пула Treg клеток может обуславливать рецидив данного заболевания.

4.3.Анализ уровня транскриптов генов каспаз 3,6,9 здоровых людей и больных саркоидозом.

Изучение особенности экспрессии и активности каспаз у пациентов с саркоидозом могло бы помочь в поиске геномных и биохимических маркеров, ассоциированных с развитием этого заболевания и его клиническими формами. В связи с этим, было изучено содержание мРНК эффекторных (каспаза 3, 6) и инициирующей (каспаза 9) каспаз в ЛПК здоровых доноров и больных саркоидозом (таблица 17)

Таблица 17 Содержание мРНК генов каспаз (отн. ед.) в ЛПК доноров контрольной группы и больных саркоидозом

	Исследуемые группы				
	Контрольная, n=15	Больные с саркоидозом без рецидивов, n=18	Больные с рецидивирующим саркоидозом, без терапии n=16	Больные с саркоидозом на терапии, n=15	p
CASP3	0.0070±0.0027	0.0030±0.0001	0.0040±0.0010	0.0030±0.0004	p>0.05
CASP6	0.0060±0.0019	0.0030±0.0005	0.0030±0.0003	0.0310±0.0003	p>0.05
CASP9	0.0220±0.0060	0.0180±0.0019	0.0220±0.0025	0.0230±0.0024	p>0.05

Как видно из таблицы уровень транскриптов исследуемых генов каспаз пациентов с саркоидозом значимо не различался в ЛПК во всех группах исследования. Однако необходимо отметить тенденцию снижения содержания мРНК указанных генов в группе больных по сравнению с контрольной группой. В связи с этим пока сложно сказать, насколько правомерно использование уровня мРНК каспаз, в частности 3,6,9 в прогнозировании течения саркоидоза и оценке эффективности проводимой терапии. С другой стороны, отмеченная тенденция к понижению уровня транскриптов этих генов в ЛПК больных людей может свидетельствовать о

замедлении у них процессов апоптоза иммунокомпетентных клеток, что возможно играет определенную роль в патогенезе данного заболевания.

Как уже было отмечено, на содержание мРНК генов каспаз может влиять уровень *TNFα* (Малышева и др., 2016). В связи с этим, мы проанализировали содержание мРНК генов *CASP3, CASP6, CASP9* в ЛПК здоровых доноров, носителей разных аллелей и генотипов по -238G>A и -308G>A полиморфных вариантов гена *TNFα*.

В таблице 18 показано, что в контрольной группе уровень транскриптов гена каспазы 3 и гена каспазы 6 в ЛПК достоверно выше у носителей аллеля А по -308 G>A полиморфному маркеру гена *TNFα* в сравнении со здоровыми донорами, имеющими генотип GG. При этом, согласно данным дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса, замена -308G>A гена *TNFα* влияет на уровень транскриптов генов *CASP3* и *CASP6* (H=6,49; p=0,011; H=7,88; p=0,005, соответственно).

Уровни мРНК генов каспаз в ЛПК у носителей разных генотипов по маркеру -238G>A гена *TNFα* в контрольной группе не различались (таблица 18).

Таблица 18.Уровень мРНК генов каспаз в ЛПК носителей разных генотипов по полиморфным маркерам -308G>A и -238G>A гена *TNF* в контрольной группе.

ген	-308G>A		-238G>A	
	GG (n=20)	GA+AA (n=20)	GG (n=22)	GA+AA (n=17)
CASP3	0.0055±0.0019	0.0100±0.0028 *	0.0630±0.0110	0.0660±0.0180
CASP6	0.0020±0.0016	0.0084±0.0016 *	0.0230±0.0050	0.0140±0.0030
CASP9	0.0220±0.0050	0.0276±0.0053	0.0350±0.0040	0.0360±0.0080

Примечание: *Различия достоверны по сравнению с GG генотипом по -308G>A полиморфному маркеру гена *TNF*, p<0.05.

Следовательно, полиморфизм гена *TNFα* может влиять на транскрипционную активность генов каспаз и таким образом определять генетическую предрасположенность людей к развитию саркоидоза.

4.4. Кросскорреляционная матрица парных коэффициентов корреляции, рассчитанных по Спирмену (непараметрическим методом).

В сложном патогенезе саркоидоза мы попытались выявить взаимное влияние генетических факторов на возникновение и течение заболевания (таблица 19).

Таблица 19. Кросскорреляционный анализ парных коэффициентов корреляции, рассчитанных по Спирмену

Общ.группа	***Возраст***	***FOXP3***	***TNFa***	***CASP3***	***CASP6***	***CASP9***
Возраст	1.000	0.111	-0.306	-0.398	-0.288	-0.010
FOXP3	0.111	1.000	0.160	0.013	-0.395	-0.363
TNFa	-0.306	0.160	1.000	-0.109	-0.029	0.054
CASP3	-0.398	0.013	-0.109	1.000	0.255	-0.099
CASP6	-0.288	-0.395	-0.029	0.255	1.000	0.144
CASP9	-0.010	-0.363	0.054	-0.099	0.144	1.000
Без лечения	**Возраст**	***FOXP3***	***TNFa***	***CASP3***	***CASP6***	***CASP9***
Возраст	1.000	0.327	-0.094	-0.540	-0.076	0.029
FOXP3	0.327	1.000	0.304	-0.048	-0.440	-0.208
TNFa	-0.094	0.304	1.000	0.134	-0.177	-0.191
CASP3	-0.540	-0.048	0.134	1.000	0.213	-0.035
CASP6	-0.076	-0.440	-0.177	0.213	1.000	0.173
CASP9	0.029	-0.208	-0.191	-0.035	0.173	1.000

На лечении	**Воз-раст**	***FOXP3***	***TNFa***	***CASP3***	***CASP6***	***CASP9***
Возраст	1.000	0.319	-0.252	-0.519	-0.834	-0.036
FOXP3	0.319	1.000	0.086	-0.091	-0.029	-0.486
TNFa	-0.252	0.086	1.000	-0.442	0.317	0.452
CASP3	-0.519	-0.091	-0.442	1.000	0.365	-0.295
CASP6	-0.834	-0.029	0.317	0.365	1.000	0.073
CASP9	-0.036	-0.486	0.452	-0.295	0.073	1.000

На основании проведенного анализа не удалось выявить зависимости изучаемых генетических факторов, коэффициент ранговой корреляции Спирмена менее 0.05**.**

Таблица 20 Сравнительный анализ FOXP3, TNF(отн. ед.) и стадиями саркоидоза

Стадии	**N**	**Возраст**	**FOXP3** отн. ед.	**TNFα** отн. ед.
Стадия 1	3	38,0(29,0; 8,0)	0,354 (0,233;0,514)	0,092 (0,064; 0,158)
Стадия 2	21	42,0(35,0;56,0)	0,149 (0,102;0,302)	0,063 (0,041; 0,076)
Стадия 3-4	4	45,0(28,5; 9,5)	0,092(0,086; 0,151)	0,052 (0,044; 0,186)
p*		0,55	0,04	0,35

Примечание: здесь и далее результаты представлены в виде Me (Q1;Q3);

* - применялся метод Краскала-Уоллиса.

Таблица 21 Сравнение распределений показателей между группами с наличием и без экстраторакальных проявлений.

Экстраторные проявления	**N**	**Возраст** ,лет	**FOXP3** отн. ед.	**TNFα** отн. ед.
Нет	16	38,0(33,5; 6,0)	0,150 (0,109;0,280)	0,065 (0,064; 0,158)
Есть	12	47,3(36,0; 0,5)	0,187(0,086;0,307)	0,084 (0,040; 0,078)
p*		0,46	0,50	0,73

Примечание: * - применялся метод Манна-Уитни для сравнения 2-х групп.

В проведенном анализе выявлена статистически значимая ассоциация уровня мРНК -3279C>A гена *FOXP3* со стадиями заболевания (таблица 20), более высокий уровень отмечается при первой стадии, наименьший - при стадии III-IV.В остальных группах все различия статистически не значимы, что может быть обусловлено малым объемом выборки, особенно со стадиями I и III-IV.

Обсуждение.

Необходимость разработки специфичных биомаркеров в диагностике и прогнозе течения заболевания давно признана, поскольку саркоидоз является диагнозом исключения и способен имитировать другие заболевания. Мониторинг риска развития, субклинической активности болезни и возможность прогрессирования или ремиссии является весьма актуальным.

Вклад в развитие такого полиэтиологичного заболевания, как саркоидоз, вносят как генетические факторы, так и факторы внешней среды. Исследование, которое использует как генетические маркеры, так и факторы окружающей среды, было бы способно выявить и изучить различные механизмы саркоидоза.

Наследственная восприимчивость к саркоидозу подтверждается этнической предрасположенностью и семейными случаями в различных поколениях. Поэтому, генетические методы для изучения саркоидоза не могут применяться для небольших групп пациентов. Необходимо крупное исследование с идентификацией различий в генотипе.

Многие болезни человека обусловлены не дефектами в самих генах, а нарушениями их согласованных действий, системы их регуляции. Важно выяснить характер связей между ними, который определяет, как гены будут работать в конкретных условиях – внутренних и внешних. Эта область в отношении саркоидоза практически не исследована.

В развитии хронического гранулематозного воспаления и образовании гранулемы при саркоидозе важную роль играют провоспалительные цитокины. При этом фактор некроза опухоли альфа (TNFa) считается ключевым цитокином, участвующим в формировании гранулемы при данном заболевании (Iannuzzi et al., 2007). Так, в эксперименте с использованием модельных животных было показано, что у мышей, дефицитных по TNFa формировались гранулемы с участками обширного некроза. Все это в последующем приводило к диссеминации M.tuberculosis и последующей гибели животных (Sharma et al., 2010). Показано, что при формировании гранулемы TNFa принимает участие в аккумуляции макрофагов и их дифференцировке в эпителиоидные клетки (Agostini., Semenzato, 1998; Goetz et al., 2004). Повышенное количество данного цитокина наблюдается в местах локализации саркоидных гранулем (Zheng et al., 1995; Prasse et al., 2000; Baughman et al., 2003).

Уровень продукции TNFa в организме определяется не только развитием процесса воспаления, но регулируется и генетическими факторами. Изменению уровня транскрипции гена способствуют мутации, которые затрагивают промоторную зону гена *TNFa*. Достаточно хорошо исследованы однонуклеотидные мутации в -308 и -238 гена *TNF* (Song et al., 2014; Feng et al., 2013). По данным литературы, однонуклеотидная замена в указанных позициях гена *TNFa* влияет на содержание мРНК гена и, в конечном итоге, на продукцию соответствующего белка (Schulz et al., 2004; Wilson et al., 1997). Это, в свою очередь, может вносить определенный вклад в патогенез саркоидоза легких (Seitzer et al., 1997).

В то же время, данные литературы, о влиянии исследуемых нами полиморфных маркерах гена *TNFa* на риск развития саркоидоза легких, достаточно малочисленны и противоречивы (Seitzer et al., 2007; Yamaguchi et al., 2001; Sharma et al., 2008; Makrythanias et al., 2010).

Ранее была отмечена важная роль TNFa в регуляции множества биологических процессов в организме, а также в развитии патологических состояний. Отмечено, что развитие воспалительных неинфекционных заболеваний

сопровождается повышением содержания фактора некроза опухоли альфа в плазме крови. Этот процесс в основном регулируется на транскрипционном уровне. Об этом свидетельствуют данные, которые указывают о повышении содержания транскриптов этого генетического маркера в различных клетках организма при развитии воспалительной реакции. В исследованиях было выявлено увеличение мРНК гена *TNF* у пациентов с ревматоидным артритом в ЛПК и клетках синовии по сравнению со здоровыми донорами (Takahashi et al., 2001; Pachot et al., 2007).

Как уже отмечалось, *TNFα* играет значительную роль в патогенезе саркоидоза. Он участвует в активации макрофагов, стимулирует миграцию клеток в места воспаления и регулирует процесс адгезии лейкоцитов. В связи с этим преспективными методами лечения больных саркоидоза является терапия препаратами на основе антител к *TNFα*, например, инфликсимабом или адалимумабом.

По результатам исследования, нами не установлены достоверные различия в распределении частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров -308G>A и-238 G>A гена *TNFα* в контрольной группе и в группе больных саркоидозом легких (таблица 6,8).Распределение генотипов полиморфного маркера -308G>A гена *TNFα* в других популяциях представлено в таблице 22

Таблица№22 Характеристика исследований, включающих метаанализ полиморфизма TNFa-308 A/G(Gwan G., Jae H., 2014)

Автор	страна	раса	случай	контроль	AA	GG	GA	p
Kieszko et al.	Польша	Европейцы	128	84	4	75	29	0.211
Mrazek et al.	Греция	Европейцы	114	232	5	64	67	0.054
Pandey et al.	США	Европейцы	278	278	10	182	78	0.349
Pandey et al.	США	Ароамери-канцы	219	219	1	161	52	0.921
Labunski et al.	Германия	Европейцы	10	12	8	1	3	0.001
Yamaguchi et al.	Япония	Азиаты	110	161	0	108	2	0.702
Somoskovi et al.	Германия	Европейцы	43	216	1	26	63	0.714

Takashige et al.	Япония	Азиаты	26	125	0	21	2	0.002
Seitzer et al.	Германия	Европейцы	101	216	8	62	63	0.239

Отсутствие ассоциации указанного полиморфного маркера гена *TNFα* с риском развития данной патологии показано также в работе C. Swider и соавт. (Swider et al., 1999). При этом авторами отмечена более высокая частота А аллеля гена *TNFα* в группе больных с синдромом Лефгрена, по сравнению с группой пациентов с латентной формой легочного саркоидоза. Изученные нами генетические факторы, вероятно, влияют не на возникновение, а на характер течения процесса. По данным литературы у больных саркоидозом в плазме крови наблюдается повышенный уровень TNFα (Li et al., 1999). Увеличение содержания провоспалительных цитокинов у пациентов с этим диагнозом может быть обусловлено не только генетическими факторами, а скорее всего, определяться патологическим процессом и регуляцией иммунного ответа при саркоидозе.

Развитие саркоидоза сопровождается активацией Т-хелперов 1 типа (Th1), которые участвуют в поддержании воспаления и формировании гранулемы. У пациентов, находящихся на стадии обратного развития заболевания, напротив, наблюдается супрессия иммунного ответа (Idali et al., 2006). В этом процессе играют значительную роль регуляторные Т-клетки, для развития и функционирования которых важен ген *FOXP3*. Он принадлежит к транскрипционным факторам семейства forkhead/winged-helix. Можно предположить, что полиморфные варианты это гена, как гена-кандидата, ассоциированы с развитием и прогрессированием саркоидоза. Этот ген значительно полиморфен (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?LinkName=nuccore_snp&from_uid=167736390). Обнаружены однонуклеотидные замены и изменения в длине микросателлитных повторов как в кодирующей, так и некодирующей его областях. В настоящей работе мы сосредоточились на анализе связи полиморфного варианта -3279C>A гена *FOXP3* (rs3761548) с развитием

саркоидоза. rs3761548 представляет собой однонуклеотидную замену в промоторе гена, вероятно, которая может влиять на его транскрипционную активность и, соответственно, на функции Treg клеток. Указанный полиморфный вариант по данным литературы ассоциирован с некоторыми аутоиммунными заболеваниями. Однако сведения о влиянии носительства аллельных вариаций по rs3761548 на восприимчивость людей к саркоидозу и особенность протекания патологического процесса при данном заболевании очень малочисленны. В связи с этим, нами проведен анализ ассоциации -3279C>A полиморфного варианта гена *FOXP3* с формированием саркоидоза.

Распределение частот и аллелей гена *FOXP3* (rs3761548) у пациенток со спонтанными выкидышами по сравнению с группой контроля в Китае (Zaigui W.,Zeshay Y., 2012) представлено в таблице 23.

Таблица 23 Распределение частот и аллелей гена *FOXP3* (rs3761548) у пациенток со спонтанными выкидышами по сравнению с группой контроля в Китае.

генотип	Пациенты %	Контроль%	Критерий χ^2	p	OR (95%ДИ)
CC	15(10.27)	25(22.32)	8.28	0.016	1
AC	56(38.36)	45(40.18)	1.690	0.193	1.44(0.83;2.47)
AA	75(51.37)	42(37.5)	8.620	0.003	2.98(1.42;6.26)
CC+AA	90(61.64)	67(59.82)	0.088	0.076	
CC+AC	71(48.63)	70 (62.50)	4.920	0.027	0.57(0.34;0.94)
CC	15(10.27)	25(22.32)			
AC+AA	131(89.73)	87(77.68)	7.020	0.008	2.51(1.25;5.03)

У китайских женщин, имеющих в генотипе A аллель по rs3761548 риск спонтанных выкидышей выше практически в 2 раза по сравнению с носителями аллеля C (Zaigui, Zeshay, 2012).

Известно, что Т-регуляторные клетки играют важную роль в поддержании периферической иммунологической толерантности, оказывая супрессорное действие на аутореактивные клоны Т-лимфоцитов той же специфичности (Shevach et al., 2002). Их роль в формировании и элиминации гранулемы при саркоидозе до конца не ясна. Так, повышенные уровни регуляторных Т-

клеток (Treg) были зарегистрированы у пациентов с саркоидозом (Planck et al., 2003; Miyara et al., 2006). Большое количество Tregs наблюдается в кровеносных сосудах, легких и лимфатических узлах пациентов с острой формой данного заболевания[66]. У пациентов с хроническим активным заболеванием количество Treg клеток в легком может быть меньше, чем у больных с синдромом Лефгрена. Противоречивость результатов может быть связана с методами определения пула Treg клеток. На поверхности этих клеток имеются разнообразные белковые маркеры, например, цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген-4, глюкокортикоид-индуцированный рецептор фактора некроза опухоли (TNF) и рецептор интерлейкина IL-2. CD25 также экспрессируются на активированных Т-клетках (Shevach et al., 2002). Т.е. эти антигены характерны и для других Т-лимфоцитов. Недавно был идентифицирован существенный фактор развития тимуса и функций Treg клеток - белок FOXP3 (Fontenot et al., 2003). Внутриклеточная локализация этого белка делает его удобным для маркирования пула Т-регуляторных клеток. О количестве клеток этого типа можно судить по содержанию транскриптов гена *FOXP3*.

Уменьшение содержания провоспалительных цитокинов, в том числе и TNFα, может снизить уровень воспалительных реакций у больных саркоидозом и способствовать их излечению. Немаловажную роль в этом процессе, вероятно, играет изменение интенсивности апоптоза иммунокомпетентных клеток внутри гранулемы, которая может зависеть от уровня провоспалительных цитокинов (Jullien et al.,1997). Одна из функций цитокинов - поддержание численности иммунных клеток посредством регуляции программируемой клеточной смерти (ПКС), основного биологического феномена, необходимого для тканевого гомеостаза. Дисбаланс в процессах апоптоза , в частности, в каспазо-зависимом ,имеют важное значение в развитии многих заболеваний (Ярилин, 2000; Favaloro et al., 2012). Каспазо-зависимый апоптоз обусловлен активностью протеолитических ферментов каспаз, вслед за которой происходит упорядоченная деструкция клеток без секреции их компо-

нентов и индукции воспаления. Цитокины способны как стимулировать, так и тормозить процессы апоптоза. Эффект от их влияния ассоциирован с концентрацией, стадией дифференцировки клеток и типа ткани (Чечина и др., 2009). Фактор некроза опухоли, как правило, стимулирует процессы апоптоза. Между тем известно, что возможно торможение опоптоза за счет TNFa, который активирует ядерный фактор NF-kB и гены, коротые он индуцирует, также являющиеся супрессорами апоптоза (Papa et al., 2009). Исходя из данных литературы о влиянии замены гуанина на аденин в положении -308 гена *TNFa* на уровень его транскрипции (Wilson et al., 1997), уровень кодируемого им белка, как правило, выше у лиц, имеющих в генотипе аллель А. В работах Fernandes с соавторами было продемонстрировано, что у носителей генотипа АА синтез TNFa повышен в 3 раза, чем у носителей генотипа GG (Fernandes et al., 2002). В связи с этим, можно предположить, что более высокий уровень этого белка у носителей аллеля по данному полиморфному варианту может обуславливать и более высокую транскрипционную активность генов каспаз.

Очевидно, что нельзя выделить единый диагностический маркер, но можно спрогнозировать, что для каждого фенотипа заболевания имеет место комбинация признаков, которая максимально точно его характеризует. Всвязи с этим выделению фенотипов саркоидоза в последнее время проявляется большой интерес. При изучении фенотипов используют данные многочисленных эпидемиологических исследований. При проведении когортного исследования в 5 странах Европы было выявлено, что на основании генетического профиля саркоидоза можно выделить два основных фенотипа: «синдром Лефгрена» и «не синдром Лефгрена». Эти два фенотипа характеризуются разными молекулярными и иммунными механизмами. Предположили, что в основе лежат особенности генетической предрасположенности, которая определяет характер реакции Т-клеток CD4 и CD8, включая отношение CD4/CD8 у пациентов с синдромом Лефгрена и без него(Natalia Rivera, 2016). На основании данных исследований, которые занимаются, главным образом, изучением генов HLA, можно предположить,что с помощью

найденных генотипически-фенотипических связей возможно будет прогнозировать особенности течения саркоидоза, в частности тяжелое и прогрессирующее течение.

В настоящее время выделяют два фенотипа саркоидоза - это синдромы Лефгрена и Хеерфордта, которые, в основном, характеризуются благоприятным клиническим прогнозом. Между тем, у 10–20% пациентов с данными синдромами течение саркоидоза приобретает хронический характер и требует назначения иммуносупрессивной терапии.

Ввиду отсутствия, в настоящее время, методов ранней диагностики саркоидоза, определенные надежды возлагают на будущие генетические исследования. Изученные нами генетические маркеры не определяют предрасположенность к заболеванию, но возможно их использование для прогнозирования течения саркоидоза.

Заключение.

У большинства пациентов с саркоидозом в Республике Карелия имело место благоприятное течение заболевания. При наблюдении положительная клинико-лабораторная и рентгенологическая динамика (спонтанная регрессия и регрессия в процессе лечения) была отмечена у 312 (59%) пациентов. Прогрессирующее течение отмечалось у 8 % (40 пациентов). Стабилизация состояния (спонтанная, в процессе или после терапии) была достигнута у 30% (158 больных). Рецидивы заболевания через 1 год после окончания основного курса лечения или после спонтанной регрессии отмечались у 14 пациентов (12.4 % всех пациентов, получавших иммуносупрессивную терапию). Наиболее часто рецидивирующее течение саркоидоза отмечалось у пациентов старше 45 лет,с отягощенным коморбидным фоном , женщин , при наличии внелегочных проявлений саркоидоза.

Смертельные случаи при саркоидозе не наблюдались.

В группе пациентов со стабильным течением чаще встречается первая и вторая стадии заболевания. В группе пациентов с прогрессирующим и рецидивирующим течением превалируют вторая и третья стадии саркоидоза, отмечена тенденция к более частому нарушению функции внешнего дыхания.

В группе пациентов с прогрессирующим и рецидивирующим течением достоверно чаще отмечалось поражение кожи по типу узлов и бляшек , lupus pernio. В данной группе чаще регистрировалось поражение печени (гепатомегалия, очаговые поражения), глаз (передний и задний увеит) , нервной системы (нейросаркоидоз с бульбарными нарушениями, периферическая нейропатия), селезенки (спленомегалия, гиперспленизм).

В нашем исследовании показано, что частота аллелей и генотипов по -238G>A и -308 G>A полиморфным маркерам гена *TNF*-а в группе больных саркоидозом и в контрольной группе значимо не различалась (p>0,05)

Наиболее часто в обеих группах по -238G>A и -308 G>A полиморфным маркерам гена *TNF*-а представлен гомозиготный GG генотип. При этом редкий AA генотип исследуемых полиморфных маркеров гена *TNF*-а выявлен только в контрольных группах.

Достоверной разницы в частоте выявления данных генотипов не получено. Частоты аллелей и генотипов по исследуемым нами полиморфным вариантам гена *TNF*-а была аналогичной популяциям западно-европейских стран (Grutters et al., 2002;Wijnen et al.,2010).

При сравнении распределения аллелей по -308G>A и -238G>A полиморфным вариантам гена *TNF*а в группах больных с благоприятным и рецидивирующим (прогрессирующим) течением саркоидоза было обнаружено, что частоты аллелей данных маркеров значимо отличаются (таблицы 7,9). Наличие аллеля A -308 G>A гена *TNF* встречается только в группе больных без рецивирующего течения заболевания. Тогда как, аллель A -238G>A гена *TNF* ассоциируется с повышенным риском развития рецидивирующего

(прогрессирующего) течения. Полученные нами данные не противоречат данным других авторов [257,294], которые указывают на то, что носительство аллеля А -308G>A гена *TNF*а сопоставимо с более высокой продукцией TNF и чаще выявляется у пациентов с острым течением заболевания, как синдром Лефгрена, который является прогностически благоприятным вариантом течения заболевания и редко приводит к хронизации процесса.

Нами была изучено содержание мРНК гена *TNF-a* в ЛПК крови больных саркоидозом. Установлено достоверное повышение уровня мРНК гена *TNF* у пациентов с саркоидозом по сравнению с группой контроля (рисунок 1). Уровень транскриптов гена *TNF-a* в ЛПК больных благоприятным течением саркоидоза отмечался выше по сравнению с контрольной группой (таблица10). В ЛПК больных, с рецидивирующим и прогрессирующим течением, находящихся на терапии, содержание мРНК указанного гена было достоверно ниже, чем у пациентов без противоспалительной терапии (p=0.019). Следовательно, глюкокортикостероидная терапия способствовала уменьшению количества транскриптов *TNF* и вероятно, содержанию самого цитокина в плазме крови. Данные об уровне экспрессии гена *TNF-a* в ЛПК больных саркоидозом, полученные в нашем исследовании также свидетельствуют о существенной роли кодируемого им цитокина в патогенезе данного заболевания. В свою очередь, ингибирование *TNF* может улучшать функцию легких и внелегочные проявления у лиц с саркоидозом, что подтверждает важную роль этого цитокина в патогенезе заболевания (Chen, Moller, 2011).

По результатам проведенного исследования не выявлено достоверных различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного маркера -3279 C>A гена *FOXP3(* rs3761548) у пациентов с саркоидозом по сравнению с контрольной группой.

Нами было установлено, что распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера -3279C>A гена *FOXP3* не различаются в группах

больных саркоидозом с благоприятным и рецидивирующим (прогрессирующим) течением.

Таким образом, на данный момент нельзя утверждать о связи указанного полиморфного варианта гена *FOXP3* с развитием заболевания, а также с особенностями течения саркоидоза.

Содержание мРНК гена *FOXP3* значимо различалось в контрольной группе у лиц, имеющих АА и СС генотипы по -3279C>A полиморфному варианту. У носителей АА генотипа, уровень транскриптов этого гена был выше, чем у гомозигот по аллелю С. В группе больных саркоидозом у носителей АА+АС генотипов содержание мРНК гена *FOXP3,* отмечалась тенденция к снижению по сравнению с пациентами , имеющими СС генотип. Однако эти различия были статистически недостоверны (p=0.13).

В проведенном анализе выявлена статистически значимая ассоциация уровня мРНК -3279C>A гена *FOXP3* со стадиями заболевания (таблица 20), более высокий уровень отмечается при первой стадии , наименьший при стадии III-IV.

Нами не обнаружено значимых различий в уровне экспрессии мРНК генов каспаз 3, 6 и 9 в лейкоцитах периферической крови больных саркоидозом и контрольной группе.

В исследовании показано, что в контрольной группе уровень транскриптов гена каспазы 3 и гена каспазы 6 в ЛПК достоверно выше у носителей аллеля А по -308 G>A полиморфному маркеру гена *TNF*, по сравнению генотипом GG (таблица 18). В соответствии с данными дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса, замена -308G>A гена *TNF* влияет на уровень транскриптов генов *CASP3* и *CASP6* (H=6,49; p=0,011; H=7,88; p=0,005, соответственно).

ВЫВОДЫ

1. При длительном наблюдении положительная клинико-лабораторная и рентгенологическая динамика была отмечена у 312 (59%) пациентов. Прогрессирующее течение отмечалось у 8 % (40 пациентов). Рецидивы заболевания отмечались у 14 пациентов (12.4 % всех пациентов, получавших иммуносупрессивную терапию). Стабилизация состояния была достигнута у 30% (158 больных). Относительно литературных данных, в нашем наблюдении редко регистрировались экстраторакальные поражения и функциональные нарушения. В группе пациентов со стабильным течением чаще встречаются первая и вторая стадии заболевания. В группе пациентов с прогрессирующим и рецидивирующим течением превалируют вторая и третья стадии саркоидоза, отмечена тенденция к более частому нарушению функции внешнего дыхания, чаще отмечались экстраторакальные проявления саркоидоза.

2. Не выявлена связь носительства аллельных вариаций -308G>A и -238G>A гена *TNFα* и -3279 C>A гена *FOXP3* у обследованных лиц с наследственной предрасположенностью к саркоидозу.

3. Выявлена ассоциация носительства аллелей по указанным полиморфным вариантам гена *TNFα* с характером течения заболевания. Аллель А -308 G>A гена *TNFα* встречается только в группе больных со стабильным течением, тогда как аллель А -238G>A гена *TNFα* ассоциируется с повышенным риском развития рецидивирующего и прогрессирующего течения заболевания.

4. Не обнаружено достоверных различий в уровне мРНК генов *TNF* и *FOXP3* в лейкоцитах периферической крови у больных саркоидозом по сравнению с контрольной группой у носителей разных генотипов по

исследуемым полиморфным маркерам гена *TNF* и *FOXP3*. Количество транскриптов гена *TNF* было значимо выше в группе контроля у лиц, имеющих GA и AA генотипы по -238G>A полиморфному варианту гена *TNF*.

5. Определяется достоверное повышение количества транскриптов гена *TNF* в лейкоцитах крови больных саркоидозом по сравнению с контролем. У пациентов с рецидивирующим и прогрессирующим течением глюкокортикостероидная терапия способствует снижению содержания транскриптов гена *TNF* и, вероятно, содержанию самого цитокина в плазме крови. В лейкоцитах периферической крови пациентов с саркоидозом без терапии и получающих глюкокортикостероидную терапию обнаружены значимые различия в содержании транскриптов гена *FOXP3*. У больных с рецидивирующим и прогрессирующим саркоидозом наблюдается более низкий уровень транскриптов гена *FOXP3*, что свидетельствует о снижение пула Т-регуляторных клеток у больных под влиянием глюкокортикостероидных препаратов. Уровень транскриптов генов каспаз 3,6,9 у пациентов с разным течением саркоидоза значимо не различался.

6. Выявлено влияние генотипа по -308G>A полиморфному варианту гена *TNF* на содержание транскриптов генов каспаз 3 и 6. Уровень транскриптов генов данных каспаз выше у носителей аллеля A по -308 G>A полиморфному маркеру гена *TNF*, что обуславливает более высокую транскрипционную активность генов каспаз.

Практические рекомендации

1. Целесообразно ведение регистра пациентов с саркоидозом для динамичного наблюдения. Возможно прогнозирование рецидивирующего

течения заболевания у женщин, пациентов старше 50 лет, с отягощенным коморбидным фоном, при наличии внелегочных проявлений.

2. Рекомендовано для оценки риска рецидивирующего (прогрессирующего) течения определение носительства аллелей по полиморфным маркерам -308G>A и -238G>A гена *TNF*.

3. При контроле эффективности глюкокортикостероидной терапии рекомендовано определение транскриптов генов *TNF* и *FOXP3* в динамике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аминева Л.Х. Диагностика, лечение и диспансерное наблюдение больных саркоидозом: автореф. дис. канд. мед.наук. — Уфа.: 1999. — С.26
2. Визель А.А., Визель И.Ю., Амиров Н.Б., Эпидемиология саркоидоза в Российской Федерации//Весник современной клинической медицины.—2017. —том 10. —вып 5. —С 66-73.
3. Визель А. А. Саркоидоз: от гипотезы к практике /Под ред. Чучалина А.Г. — Казань: Изд-во ФЭН , 2004 – С.156-158 .
4. Визель А.А.Саркоидоз. — М.:Атмосфера ,2010. —416с.
5. Визель А.А., Яушев М.Ф., Гурылёва М.Э. и др. О дифференциальной диагностике диссеминированного туберкулёза лёгких и саркоидоза // Казанский медицинский журнал. — 1993. — № 5. — С.350—353.
6. Визель И.Ю. Саркоидоз в Республике Татарстан :эффективность диагностики и лечения , анализ отдаленных результатов: Автореф. дис. докт. мед.наук. —М.,2017. — С.3-40.
7. Выренкова Т.Е., Олейниченко Е.Г. Клиника и диагностика саркоидозных увеитов // Дифференциальная диагностика саркоидоза и туберкулеза легких: Сб. науч.тр.— М. — 1988. — С.102–105.
8. Гончаров А.Г., Фрейдлин И.С., Смирнов В.С. и др. Основы клинической иммунологии и методологические подходы к оценке иммунного статуса //Практикум: Сб. науч.тр . —Калининград, 1997. —73 с.
9. Демьяненко Н.Г Клинико- лабораторные особенности впервые выявленного и рецидивирующего саркоидоза : Автореф. дис. канд. мед.наук. — М., 2017. — С.112.
10. Евфимьевский В.П., Борисов С.Е., Богородская Е.М. Нарушения дыхательной функции при гранулёматозах и распространённых поражениях

иной природы // Пособие для врачей— МЗ РФ, ММА им.И.М.Сеченова, НИИ фтизиопульмонологии. — М. — 1998. — С. 32.

11. Евфимьевский В.П., Романов В.В., Нефедов В.Б. Клиническое применение результатов исследования механики дыхания у больных саркоидозом легких// Пробл.туб. — 1982. — № 4. – С. 38–40.

12. Ерохин В.В., Л.Е. Гедымин, Л.Н. Лепеха, И.В. Двораковская. Интерстициальные болезни легких // Клеточная биология легких в норме и при патологии. – М.: Медицина.- 2000.- С. 386- 409 .

13. Замотаев И.П., Воробьева З.В., Дмитриева К.В. Состояние вентиляционно– перфузионных соотношений в легких при легочном саркоидозе // Диссеминированные процессы легких: Сб. науч. трудов. —М. —1984. — С.92–95.

14. Илькович М.М. Саркоидоз органов дыхания. Интерстициальные заболевания легких / Под ред. М.М. Ильковича, А.Н. Кокосова. – СПб: Нордмедиздат, 2005. – С.288-329.

15. Илькович М.М., Новикова Л.Н., Лучкевич В.С. Саркоидоз органов дыхания. – СПб, 1996. – С. 66.

16. Лепеха Л.Н. Макрофаги и дендритные клетки легких. Респираторная медицина / под. ред. Чучалина А.Г. М.: ГЭОТАР – Медиа, 2007. – т.1.- С. 174186

17. Лепеха Л.Н. Сурфактантная система легких при эксперементальном туберкулезном воспалнии и оценка ее морфофункционального состояния у человека: Автореф. дис. докт. биол. наук. – М. – 1995. – С.8,12.

18. Лямина С.В. Формирование воспалительного компонента в бронхолегочной системе при заболеваниях легких и гастроэзофагеальной рефлюксной болезни: роль сурфактантного белка D и репрограммирования макрофагов: Дис. докт. мед. наук. – М. – 2013. —С.12-24.

19. Макух Е.А. Психические расстройства при саркоидозе: автореф. дис. канд. мед.наук. — М.,2017. — С.190

20. Насретдинова Г.Р. Особенности течения саркоидоза в республике Татарстан: Автореф. дис. канд. мед.наук. – М. – 2005. —С.5-8,12.

21. Николаева Г.М., Дорожкова И.Р., Болотов П.Н. Дифференциальная диагностика саркоидоза и диссеминированного туберкулеза по данным цитологического и бактериологического изучения бронхоальвеолярных смывов // Диагностический бронхоальвеолярный лаваж. – М.: медицина. – 1988. – С. 104-108.

22. Николаева Г.М., Дорожкова И.Р., Болотов П.Н. Комплексное цитологическое и бактериологическое исследование жидкости бронхоальвеолярного лаважа в целях дифференциальной диагностики саркоидоза и диссеменированного туберкулеза легких // Пробл. туб. – 1989. - № 3.м – С. 33-37.

23. Николаева Г.М. Цитология туберкулеза и других гранулематозов легких. – М., 2004 .—С.18-46.

24. Озерова Л.В., Васильев С.Н., Шеметун О.Н. Церебральный саркоидоз, клиника и течение // Пробл.туб. — 2002. — № 7. — С. 20–23.

25. Озерова Л.В., Рыбакова Н.П., Михеева Л.П. Диспансерное наблюдение больных саркоидозом // Пробл.туб. — 1998. — № 3. — С. 24–27.

26. Озерова Л.В., Рыбакова Н.П., Зайцева И.П. и др. Клиника, течение и лечение рецидива саркоидоза по данным диспансерного наблюдения // Пробл. туб. — 1999. — № 1. — С. 44–47.

27. Поддубный А.Ф., Когосов Л.С. Иммунологические сдвиги при различных формах саркоидоза. // Диагностика, клиника и лечение саркоидоза легких: Сб. трудов ВНИИП, Л. «Медицина» - 1978 – С. 62-67.

28. Рабен А.С. Саркоидоз – М.:Медицина, 1964. – С.99-102.

29. Рабухин А.Е., Доброхотова М.Н., Тонитрова Н.С. Саркоидоз. – М.:Медицина, 1975. – 175 с.

30. Романов В.В. Эффективность кортикостероидной терапии у больных саркоидозом: Автореф. дис. канд. мед.наук. – М, 1988. — 24 с.

31. Сивокозов И.В. Бронхологические методы в диагностике саркоидоза и экзогенного аллергического альвеолита с учетом микотической колонизации респираторного тракта: Автореф. дис. канд. мед.наук. —М., 2017. — С.18-22.

32. Сидорова Н.Ф. Значение повторных цитологических и иммунологических исследований БАС при саркоидозе органов дыхания : Автореф.дис. канд. мед. наук. – М, 1992 . — 29 с.

33. Спирина А.Г., Визель И.Ю. Фактор некроза опухоли альфа при саркоидозе : от патогенеза к лечению// Весник современной клинической медицины . —2011. —№4. —С. 24-28.

34. Турлай Е.А. Клинико-рентгенологические проявления саркоидоза. Влияние генетических факторов на течение и прогноз : Автореф. дис. канд. мед.наук. –Барнаул,2009. —23с.

35. Филипов В.П., Ловачева О.В., Лебедев К.М. и др. Достижения и перспективы развития эндоскопической диагностики туберкулеза и других гранулематозных заболеваний органов дыхания//Пробл. Туб . – 1996. —№6. —С.44-47 .

36. Филипов В.П. Бронхоальвеолярный лаваж при диффузных поражениях легких. – М.: Медицина, 2006 —С 74-86.

37. Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. – М. Медицина. – 1980. – 216 с.

38. Фролова О.Е. Морфофункциональная характеристика моноцитов. Значение исследования нуклеарного аппарата // Клин. лаб. диагностика. – 1998. - № 10. – С. 3-8.

39. Хаитов Р.М. Иммунология./ Р.М. Хаитов. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 514 с.

40. Хоменко А.Г., Александрова А.В. Классификация саркоидоза // Пробл. туб. — 1982. —№ 4. —С.15–20.

41. Цыпленкова В.Г., Бескровнова Н.Н. Апоптоз // Арх. патол. – 1996. – т.58, № 5. – С. 71-74.

42. Черняев А.Л., Самсонова М.В. Патологическая анатомия легких. Атлас. М.: Атмосфера, 2011 —С.75–98.

43. Чучалин А.Г. Респираторная медицина / Под ред. А.Г. Чучалина. - М.: ГЭОТАР Медиа, 2007. – 1616 с.

44. Шмелев Е.И. Дифференциальная диагностика интерстициальных заболеваний легких // Consilium medicum. – 2003. —Т. 5. № 4. —С. 176-181

45. Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // Актуальные проблемы патофизиологии, 2001. – С. 13-56.

46. Ярилин, А.А. Основы иммунологии.—М., Медицина, 1999 – 608 с.

47. Abe C., Iwai K., Mikami R., et al. Frequent isolation of Propionibacterium acnes from sarcoidosis lymph nodes//Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A. — 1984. —V.256. —P.541547.

48. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival // Science 1998; Vol. 2811. —P.1322-1326.

49. Agostini C., Trentin L., Facco M., Sancetta R., Cerutti A., Tassinari C., Cimarosto L., Adami F., Cipriani A., Zambello R. Role of IL-15, IL-12, and their receptors in the development of Tcell alveolitis in pulmonary sarcoidosi // Immunol. — 1996, —V.157. — P.910–918.

50. Alessandrini F., Beck-Speier I., Krappmann D. et al. Role of oxidative stress in ultrafine particle-induced exacerbation of allergic lung inflammation//Am J Respir Crit Care Med. 2009;Vol.179(11).—P.984-991.

51. Annegret Fischer, David Ellinghaus, Marcel Nutsua, Sylvia Hofmann at al. Identification of Immune-Relevant Factors Conferring Sarcoidosis Genetic Risk// Respir Crit Care Med.—2015. — Vol.192(6) . — P.727–736.

52. Antoniou KM, Tzouvelekis A, Alexandrakis MG, Tsiligianni I, Tzanakis N, Sfiridaki K, Rachiotis G, Bouros D, Siafakas NM. Upregulation of Th1 cytokine profile (IL-12, IL-18) in bronchoalveolar lavage fluid in patients with pulmonary sarcoidosis// Interferon Cytokine Res. — 2006. — V.26. —P.400-405 .

53. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Statement Committee. American Thoracic Society. European Respiratory Society. World Association for Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders //Eur. Respir. J. — 1999. — Vol.14. — N 4. — P.735-737.

54. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease// Am J Pathol . — 1990. — Vol.136. — P.593-608.

55. Asukata Y, Ota M, Meguro A, et al. Lack of association between toll-like receptor 4 gene polymorphisms and sarcoidosis-related uveitis in Japan//Ocular immunology and inflamation — 2013 . — Vol.21.— P. 234-236.

56. Bargagli E., Olivieri C., Prasse A. et al. (S100A9) levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases// Inflammation. — 2008. — Vol.31(5) . — P. 351-400.

57. Barna B.P, Culver D.A, Abraham S. et al. Depressed peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPargamma) is indicative of severe pulmonary sarcoidosis: possible involvement of interferon gamma (IFN-gamma)//Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. – 2006–Vol.23(2) –P.93–100.

58. Barna B.P., Huizar I., Malur A. et al. Carbon nanotube-induced pulmonary granulomatous disease: twist1 and alveolar macrophage M1 activation// Int J Mol Sci. – 2013 –Vol.14(12) –P. 23858-23971.

59. Baumer I, Zissel G, Schlaak M, et al. Th1/Th2 cell distribution in pulmonary sarcoidosis// Respir Cell Mol Biol. –1997 . —Vol.16(2) .— P. 171-177.

60. Besnard V, Calender A, Bouvry D, Pacheco Y, Chapelon-Abric C, Jeny F, Nunes H, Planès C, Valeyre D. G908R NOD2 variant in a family with sarcoidosis// Respir Res. — 2018. —Vol. 19(1) . — P.44.

61. Bi Y., Yang R. Direct and indirect regulatory mechanisms in TH17 cell differentiation and functions// Scand J Immunol 2012. —Vol.75(6) .— P.522-543.

62. Bianchi M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger// Leukoc Biol. — 2007. — Vol. 81(1) . — P.1–5.

63. Biragyn A., Ruffini P.A., Leifer C.A. et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2// Science. — 2002. — Vol.98(5595) . — P1025-1029.

64. Bogdan, C., Macrophage deactivation by interleukin 10 //Exp Med.. – 1991. – Vol. 174(6). -P. 1549–1555 .

65. Borger D. Sarkoidose. Theorie und Praxis. — 1980. — P. 140–146.

66. Bratkovskis M., Barzdina I. Features of tuberculosis incidence and clinical forms for sarcoidosis patients. // Europ. Respir. J. – 2004. – Vol.28, suppl.48. – P.1269.

67. Bream G.H., Ping A., Zhang X. et al. A single nucleotide polymorphism in the proximal IFN-gamma promoter alters control of gene transcription// Genes and Immunity . — 2002. — №31. — P.165-169.

68. Bresnitz EA, Strom BL.Epidemiology of sarcoidosis// Epidemiol Rev. — 1983. — Vol.5 . — P.124-156 .

69. Broos C.E., van Nimwegen M., Henk C et al. Granuloma Formation in Pulmonary Sarcoidosis// Front Immunol. . —2013. —№4. — P.437.

70. Brownell I., Ramírez-Valle F., Sanchez M., Prystowsky S. Evidence for Mycobacteria in Sarcoidosis// Respir Cell Mol Biol. . — 2011 . — V. 45, P. 899–905.

71. Campbell, D.A. Phenotypic analysis of alveolar macrophages in normal subjects and in patients with interstitial lung disease // Thorax. – 1986. – Vol. 41(6). – P. 429-434.

72. Chao, C.C. Modulation of human microglial cell superoxide production by cytokines // Leukoc. Biol.. - 1995. – Vol. 58. – P. 65–70

73. Chen E.S., Song Z., Willett M.H. et al. Serum amyloid A regulates granulomatous inflammation in sarcoidosis through Toll-like receptor-2// Respir Crit Care Med. — 20101. — Vol.81(4). — P.70-79.

74. Chen D., Xie H., Luo X. et al. Roles of Th17 cells in pulmonary granulomas induced by Schistosoma japonicum in C57BL/6 mice// Cell Immunol . — 2013 . — Vol.285(1–2) . — P.149–157.

75. Cristophi G.P., Caza T., Curtiss C. et al. Gene expression profiles in granuloma tissue reveal novel diagnostic markers in sarcoidosis// Exp. Mol. Pathol.—2014. —Vol.96(3) . —P.393-399.

76. Crystal R.G., Bitterman P.B., Rennard S.I. Interstitiatlung disease of unknown cause. Disordere characterised by chronic inflammation of the lower respiretory tract.// N. Engl. J. Med.- 1984.- Vol. 310.- P. 154-166.

77. Cui A., Anhenn O., Theegarten D. et al. Angiogenic and angiostatic chemokines in idiopathic pulmonary fibrosis and granulomatous lung disease.// Respiration. — 2010. —Vol.80(5) . —P.372-378.

78. Culver D.A., Barna B.P., Raychaudhuri B. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity is deficient in alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis// Respir Cell Mol Biol. — 2004. — Vol.30(1) . — P.1–5.

79. Culver D. A., Newman L. S., Kavuru M. S. Gene-environment interactions in sarcoidosis: challenge and opportunity// Clin Dermatol. — 2007 . —Vol. 25(3) . —P.267–275.

80. D'Andrea. A. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. // J Exp Med. – 1993. – Vol. 178(3).-P. 1041–1048

81. Davidson T.S., DiPaolo R.J., Andersson J. et al. Cutting edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp31 T regulatory cells. // Immunol . —2007. —Vol.178(7) . —P.4022-4026.

82. Drake W.P., Pei Z., Pride D.T.,Collins R.D., Cover T.L. Molecular analysis of sa rcoidosuis tissue for mycobacterialspecies DNA// Emerg. Infect. Dis . — 2002. —Vol.8, P.1334-1344

83. Eishi Y. Propionibacterium acnes as a Cause of Sarcoidosis//Sarcoidosis.—2013 . —P 26-78.

84. Eishi Y., Suga M., IshigeI., Kobayashi D., Yamada T., Takemura T., Takizawa T., Koige M., Kudoh S., CostabelU., Guzman J., Rizzato G., Gambacorta M., de Bo is R., Nicholson A.G., Sharma O.P.,Ando M. Quantitative Analysis of Mycobacteri al and Propionibacterial DNA in LymphNodes of Japanese and European Patients w ith Sarcoidosis// Clin Microbi. — 2002. —Vol.40 . —P.198–204

85. Evans W, Carlisle J, Hajizadeh R, Nadaf M, Shepherd BE, Pride DT, Johnson JE, Drake WP. Superoxide dismutase a antigens derived from molecular analysis of

sarcoidosis granulomas elicit systemic th-1 immune responses// Respir Res. — 2008 . —Vol.9 . —P.3-6.

86. Falcone F.H. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses // Blood . — 2000. – Vol. 96(13). – P. 4028-4038

87. Facco M., Cabrelle A., Teramo A. et al. Sarcoidosis is a Th1/Th17 multisystem disorder// Thorax . — 2011. —Vol.66(2) . —P.144-150.

88. Feng Y., Zhou J., Gu C. et al. Association of six well-characterized polymorphisms in TNF-α and TNF-β genes with sarcoidosis: a meta-analysis// PLoS ONE. — 2013. —Vol.8(11) . —67-95

89. Figueroa L, Xiong Y, Song C, et al. The Asp299Gly polymorphism alters TLR4 signaling by interfering with recruitment of MyD88 and TRIF// J Immunol . —2012. —Vol.188(9) . —P. 4506-4515.

90. Fleming E. (1988 Fleming H.A., Bailey S.M. Sarcoid heart disease. // J. R. Coll. Physicians. Lond. — 1981. — Vol.15. — P.245-249.

91. Furusawa H., Suzuki Y., Miyazaki Y. et al. Th1 and Th17 immune responses to viable Propionibacterium acnes in patients with sarcoidosis//Respir Investig. — 2012. —Vol.50(3) . —P.104-109.

92. Gaede K.I., Amicosante M., Schürmann M. et al. Function associated transforming growth factor-beta gene polymorphism in chronic beryllium disease// J Mol Med (Berl) . —2005. —Vol.83(5) . —P.397–405.

93. Ghari S.A., Malur A., Huizar I. et al. Sarcoidosis activates diverse transcriptional programs in bronchoalveolar lavage cells//Respir. res. — 2016. — Vol.26.17 —P.93-117.

94. Grunewald J., Brynedal B., Darlington P. et al. Different HLA-DRB1 allele distributions in distinct clinical subgroups of sarcoidosis patients//Respir res . —2010 . —Vol.11.25. —15-48.

95. Grunewald J., Eklund A. Löfgren's syndrome: human leukocyte antigen strongly influences the disease cours//RespirCrit Care Med . —2009. —V. 1794 . —P. 307-312 .

96. Grunewald J, Eklund A; Role of CD4+ T cells in sarcoidosis//Proc AmThorac Soc . — 2007 . —Vol.45 . —P.461-464 .

97. Gudmundsson G., Hunninghake G.W. Interferon-gamma is necessary for the expression of hypersensitivity pneumonitis//J Clin Invest. —.1997. — Vol.99(10) . —P.2386–2390.

98. Gundy V.K., Sharma O.P. Pathogenesis of Sarcoidosis. // West. J. Med. – 1987. – №8. –147. – P.168-164.

99. Gupta D., Rao V.M., Aggarwal A.N. et al. Haematological abnormalities in patients of sarcoidosis // Indian J. Chest Dis. AlliedSci. — 2002. — Vol. 44. — N 4. — P.233–236 .

100. Guyatt G.H., Bensen V.G., StolmanL P., ef. al. HLA-BSand erythema nodosum.// Can. Med. Assoc. J 1. —982. — Vol. 127. —P. 1005-1006.

101. Haslam P.L. Bronchoalveolare lavage. // Semin. Respir. Med. —1984 . —№6 .– P.55-79 .

102. Ha¨nsch H.C., Smith D.A., Mielke M.E. et al. Mechanisms of granuloma formation in murine Mycobacterium avium infection: the contribution of CD41 T cells// Int Immunol . — 1996. —Vol.8(8)1. —P.299–310.

103. Hedfors E., Lindström F. HLA-B8/DR3 in sarcoidosis. Correlation to acute onset disease with arthritis//Tissue Antigens . —1983. —V. 223. —P. 200-203.

104. Hena K.M., Yip J., Jaber N. et al. Clinical Course of Sarcoidosis in World Trade Center-Exposed Firefighters// Chest . —2018. —Vol.153(1) . —P.114-123.

105. Hena K.M., Yip J., Jaber N. et al. Clinical Course of Sarcoidosis in World Trade Center-Exposed Firefighters// Chest. —2018. —Vol.153(1) . —P.114-123.

106. Homma J.Y., Abe C., Chosa H., Bacteriological investigation on biopsyspecimens f rom patients with sarcoidosis//Jpn J Exp Med. — 1978 . — Vol.48 . —P.251-255;

107. Huang C.T., Heinrich A.E., Rosen Y., Moon S., Lyons H.A. Pulmonary sarcoidosis , roentgenogrephic functional fnd pathological correlation.// Respiration. —1976. —Vol. 37. — P. 337-346.

108. Huang H., Lu Z., Jiang C. et al. Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in sarcoidosis// Int J Mol Sci. — 2013. —Vol.14(11) . —P. 21463-21473.

109. Huizar I., Malur A., Patel J. et al. The role of PPAR-gamma in carbon nanotube-elicited granulomatous lung inflammation// Respir Res . — 2013. —Vol.14. —P.7.

110. Hunninghake G.W., Crystal R.G. Palmonary sarcoidosis: a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity.// N. Engl. J. Med . —1981. —Vol. 305. —P. 429-434.

111. Hunninghake G.W., Bedell G.H.,Savala D.C., Moniek M., Bredy M. Role of interleukin-2 by lung T-lymphocytes in setive pulmonary sarcoidisis.// Am. Rev. Reapir. —1983 . —Vol.128. — P. 634-638.

112. Hunninghake G.W., Garrett K.C., Richerson H.D., Pantene J.C., Ward P.A., Rennard S.I., Bitterman P.B., Crystal R.G.Patogenesis of granulomatous lung diseases.// Am. Rev, Respir. Dis. — 1984. —Vol. 130. —P. 476-496

113. Hunninghake G. W., CostableU., Ando M. Et al. Statement on sarcoidosis // Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis . —1999 . —V. 16, № 2. —P. 149-173.

114. Hunninghake G. W, Gedek J.E., Kawanami O et al. Inflammatory and immune processin human lung in helth and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage//Amer.J.Path. —1979. —Vol.97, №1. —P. 179-206.

115. Hunninghake G.W. et al. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/ European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis// 1999. —Vol.16(2) . —P.149–173.

116. Hunninghake G.W., Crystal R.G. Pulmanary sarcoidosis: a disoder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity//N Engl J Med. — 1981. —305(8)4. —P.29-34.

117. Hu S. Differential regulation by cytokines of production of nitric oxide by human astrocytes // Glia. – 1995. – Vol. 15. –P. 491–494 .

118. Iannuzzi M.C., Rybicki B.A. Genetics of Sarcoidosis: Candidate Genes and Genome Scans// Proceedings of the ATS. — 2007. —Vol.4. —96-108.

119. Iannuzzi M.C., Maliarik M.J., Poisson L.M. et al. Sarcoidosis susceptibility and resistance HLA-DQB1 alleles in African Americans// Am. J. Respir. Crit. Care. Med. — 2003. —Vol.167(9) . —P.1225–1231.

120. Idali F., Wahlstrom J., Muller-Suur C. et al. Analysis of regulatory T cell associated forkhead box P3 expression in the lungs of patients with sarcoidosis// Clin Exp Immunol. — 2008. —Vol.152(1) . —P. 127-137.

121. Ikeda T., Hayashi S., Kamikawaji N. et al. Adverse effect of chronic tonsillitis on clinical course of sarcoidosis in relation to HLA distribution//Chest. — 1992. —Vol.101(3) . —P.758-762.

122. Ishihara M., Ohno S., Ishida T. et al. Genetic polymorphisms of the TNFB and HSP70 genes located in the human major histocompatibility complex in sarcoidosis. Tissue Antigens. — 1995. —Vol.46(1) . —P.59–62.

123. James D.G. Sarcoidosis // Curr. Med. Drugs . —1967. —Vol.7, №9. — P.10-21.

124. Kaplan, A.P. Chemokines, chemokine receptors and allergy // Int Arch Allergy Immunol. – 2001. –Vol. 124(4) . —P. 423-431 .

125. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics// Br J Cancer . —1972 . — Vol. 26 . —P.239-257.

126. Kishi J., Nishioka Y., Kuwahara T. et al. Blockade of Th1 chemokine receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice// Eur Respir J .—2011. —Vol.38(2).—P.415-424.

127. Krein P.M., Winston B.W. Roles for insulin-like growth factor I and transforming growth factor-beta in fibrotic lung disease//Chest. — 2002. — Vol.122(6, Suppl) . —P.289–293.

128. Kieszko R., Krawczyk P., Chocholska S. et al. TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms in Polish patients with sarcoidosis. Connection with susceptibility and prognosis// Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. —2010. —Vol.27(2) . —P.131-137.

129. Kruit A., Grutters J.C., Ruven HJ, et al. Transforming growth factor beta gene polymorphisms in sarcoidosis patients with and without fibrosis// Chest. — 2006. —Vol.129(6) . —P.1584–1591.

130. Korthagen N.M., Nagtegaal M.M., van Moorsel C.H. et al. MRP14 is elevated in the bronchoalveolar lavage fluid of fibrosing interstitial lung diseases// Clin Exp Immunol . —2010. —Vol.161(2) . —P.342-347.

131. Kriegova E., Fillerova R., Tomankova T. et al. T-helper cell type-1 transcription factor T-bet is upregulated in pulmonary sarcoidosis// Eur Respir J. — 2011. —Vol.38(5) . —P.1136-1144.

132. Kubarenko AV, Ranjan S, Rautanen A, et al. A naturally occurring variant in human TLR9, P99L, is associated with loss of CpG oligonucleotide responsiveness//J Biol Chem . —2010. —Vol.285(47) . —P.36486-36494.

133. Kunkel S.L., Lukacs N.W., Strieter R.M., Chensue S.W. Thl and Th2 responses regolate expermental lung granuloma development//SarcoidosisVascDiffuseLungDis . —1996. —Vol.13. — P. 120-138.

134. Li N, Bajoghli A, Kubba A, Bhawan J. Identification of mycobacterial DNA in cutaneous lesions of sarcoidosis// J Cutan Pathol . —1999 . —Vol.26. — P.271–278 .

135. Li Y., Wollnik B., Pabst S. et al. BTNL2 gene variant and sarcoidosis// Thorax. — 2006. —Vol.61(3) .—P. 273-284.

136. Lommatzsch M., Bratke K., Bier A. et al. Airway dendritic cell phenotypes in inflammatory diseases of the human lung// Eur Respir J.—2007.— Vol.30(5). —P.878-886.

137. Lommatzsch M, Bratke K, Bier A, Julius P, Kuepper M,Luttmann W, Virchow JC. Airway dendritic cell phenotypes in inflammatory diseases of the human lung//Eur Respir J. — 2007.—Vol.30. —P.878–886

138. Marques L.J., Zheng L., Poulakis N., Guzman J., Costabel U. Pentoxifylline inhibits TNF-alpha production from human alveolar macrophages// Am J Respir Crit Care Med . —1999. — V.159. — P.508–511.

139. Malysheva I.E., Topchieva L.V., Tikhonovich E.L. et al. Analysis of an association of TNF -308G>A polymorphism with a risk for pulmonary sarcoidosis in the Russian population of the Republic of Karelia// Ter Arkh . – 2017. –Vol. 89(3) . – P.61-64.

140. Mathew S., Bauer K.L., Fischoeder A. et al. The anergic state in sarcoidosis is associated with diminished dendritic cell function. J Immunol. – 2008. – Vol.181(1) . – P. 746-755.

141. Malysheva I.E., Topchieva L.V., Tikhonovich E.L., et al. Association of FOXP3 gene -3279 C>A polymorphism with the risk of pulmonary sarcoidosis// Ter Arkh. —2017. —Vol.89(12). —P.64-67.

142. Maertzdorf J, Weiner J 3rd, Mollenkopf HJ; TBornotTB Network, Bauer T, Prasse A, Müller-Quernheim J, Kaufmann SH. Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and sarcoidosis.roc Natl Acad Sci U S A. —2012 . —Vol.109(20). —P.7853-7858.

143. Muraközy G., Gaede K.I., Zissel G. et al. Analysis of gene polymorphisms in interleukin-10 and transforming growth factor-beta 1 in sarcoidosis// Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. —2001. —Vol.18(2) . —P.165–169.

144. Mana J., Montero A., Vidal M. et al. Recurrent sarcoidosis: a study of 17 patients with 24 episodes of recurrence // Sarcoidosis Vasc. DiffuseLungDis. — 2003. — Vol. 20, N 3. — P.212–221.

145. Mantovani, A. Macrophage diversity and polarization.: in vivo veritas // Blood. – 2006. –Vol. 108(2). – P. 408-409

146. Mantovani, A. New vistas on macrophage differentiation and activation / A. Mantovani, A. Sica, M. Locatti // European Journal of Immunology . — 2006. – Vol. 37(1). – P. 14-16 .

147. McConkey D.J., Zhivotovsky B., Orrenius S. Apoptosis-molecular mechanisms and biomedical implications //Molec. Aspects Med. — 1996. — Vol. 17. – P. 91-110.

148. McGrath D.S., Goh N., Foley P.J., et al. Sarcoidosis: genes and microbes--soil or seed? Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases // World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders . –2001 . –V.18 . – P.149-164 .

149. McAleer J.P., Kolls J.K. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense// Immunol Rev. – 2014. –Vol.260(1) . –P.129-144.

150. Miyara M., Amoura Z., Parizot C. et al. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells// J Exp Med. – 2006. –Vol.203(2) . –P.359-370.

151. Moller DR, Rybicki BA, Hamzeh NY, Montgomery CG, Chen ES, Drake W, Fontenot AP. Genetic, Immunologic, and Environmental Basis of Sarcoidosis. Ann Am Thorac Soc.—2017. —Vol.6. —P.429-436

152. Moller D.R. Affilations Sarcoidosis, Vasculitis, and Diffuse Lung Diseases// Official Journal of WASOG . –1999 . –Vol.16(1)2. –P. 4-31.

153. Mollers M., Aries S.P., Dromann D. et al. Intracellular cytokine repertoire in different T cell subsets from patients with sarcoidosis// Thorax. – 2001. –Vol.56(6) . –P.487-493.

154. Morgan A.J., Guillen C., Symon F.A. et al. Expression of CXCR6 and its ligand CXCL16 in the lung in health and disease// Clin Exp Allergy. . – 2005. – Vol.35(12) . –P.155-180.

155. Mu¨ller-Quernheim J., Pfeiffer S., Ma¨nnel D. et al. Lung restricted activation of the alveolar macrophage/monocyte system in pulmonary sarcoidosis// Am Rev Respir Dis . –1992. –Vol.145. –P.187-192.

156. Munro C.S., Campbell D.A., Du Bois R.M. et al. Dendritic cells in cutaneous, lymph node and pulmonary lesions of sarcoidosis//Scand J Immunol . – 1987. –Vol.25(5) . –P. 27-46.

157. Mrazek F., Holla L.I,. Hutyrova B. et al. Association of tumour necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha and HLADRB1 gene polymorphisms with Lofgren's syndrome in Czech patients with sarcoidosis// Tissue Antigens . –2005. –Vol.65. –P.163–171.

158. Marzilli L, Greenlee BM, Chen ES, Silver RF, Askin FB, Teirstein AS, Zhang Y, Cotter RJ, Moller DR. Mycobacterial catalase-peroxidase is a tissue antigen and target of the adaptive immune response in systemic sarcoidosis// J Exp Med . –2005. –Vol.201. –P.755–767.

159. Moller D.R Mahevas M., Le Page L., Salle V. Et al. Thrombocytopenia in sarcoidosis// Sarcoidosis Vacs. DiffuseLungDis. – 2006 . –Vol. 23, № 3 . –P 229-235.

160. Moscovic EA. Sarcoidosis and mycobacterial L-forms. A critical reappraisal of pleomorphic chromogenic bodies (Hamazaki corpuscles) in lymph nodes// Pathol Annu. – 1978. –Vol.13, Pt. 2. – P.164-169.

161. Moller D.R. Potential Etiologic Agentsin Sarcoidosis//Proc Am Thorac Soc. – 2007 . – Vol.15. –P.465–468 .

162. Morell F., Levy G. Orriols R. et al. Delayed cutaneous hypersensitivity tests and lymphopenia as activity markers in sarcoidosis//Chest.–2002.– Vol.121,№4 . –P.1239-1244.

163. Moller D.R., Konishi K., Kirby M.,Balbi B., Crystal R.G. Bias toward use of a specific T cell receptor beta-chain variable region in a subgroup of individuals with sarcoidosis// J Clin Invest . –1988. –Vol. 824 . –P. 1183-1191.

164. Miyara M., Amoura Z., Parizot C., Badoual C., Dorgham K., Trad S., Kamboudhner M., Valeyre D., Chaperon-Abric C., Debre P., Piette J.C., Gorochov G. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells// J Exp Med . –2006. – Vol. 203 . –P. 359–370.

165. Moller DR. Cells and cytokines involved in the pathogenesis of sarcoidosis// Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. – 1999 . – Vol.16 . –P.24-31.

166. Mishra BB, Poulter LW, Janossy G, James DG. The distribution of lymphoid and macrophage like cell subsets of sarcoid and kveim granulomata: possible mechanism of negative PPD reaction in sarcoidosis// Clin Exp Immunol . – 1983. –Vol.54. –P.705–715

167. Muhunthan Thillai, Christian Eberhardt, Alex M. Lewin, Lee Potiphar, Suzie Hingley-Wilson, Saranya Sridhar,Jonathan Macintyre, Onn Min Kon, Melissa Wickremasinghe, Athol Wells, Mark E. Weeks, Donald Mitchell, Ajit Lalvani . Sarcoidosis and Tuberculosis Cytokine Profiles: Indistinguishable in Bronchoalveolar Lavage but Different in Blood//PlosOne . –2012. –Vol. 7 (7) . –P.36-48.

168. Napolitano M. Phospholipase A2 mediates apolipoprotein-independent uptake of chylomicron remnant-like particles by human macrophages // International Journal of Vascular Medicine. – 2012. – Vol. 2012 – P. 501954.

169. Negi M., Takemura T., Guzman J., Uchida K., Furukawa A., Suzuki Y., Iida T., Ish ge I.,Minami J., Yamada T.,Kawachi H., Eishi Y. Localization of Propionibacterium acnes in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium//Mod Pathol. – 2012 . –Vol. 25 . –P.1284–1297.

170. Nguyen T., Liu X.K., Zhang Y., Dong C. BTNL2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation// J. Immunol . –2006. –Vol.176(12) . –P.7354–7360.

171. Ostadkarampour M, Eklund A, Moller D, et al. Higher levels of interleukin IL-17 and antigenspecific IL-17 responses in pulmonary sarcoidosis patients with Lofgren's syndrome// Clin Exp Immunol . –2014. –Vol.178(2) . –P.342–352.

172. Oswald-Richter K.A., Culver D.A., Hawkins C. et al. Cellular responses to mycobacterial antigens are present in bronchoalveolar lavage fluid used in the diagnosis of sarcoidosis// Infect Immun . – 2009 . –Vol.77(9) . –P.3740–8.

173. Ota M, Amakawa R, Uehira K, et al. Involvement of dendritic cells in sarcoidosis//Thorax . –2004. –Vol.59(5) . –P.408-413.

174. Pabst S, Bradler O, Gillissen A, et al. Toll-like receptor-9 polymorphisms in sarcoidosis and chronic obstructive pulmonary disease//Adv Exp Med Biol . –2013 . –Vol.756. –P.239-245.

175. Pavlovic-Popovic Z., Djuric B., Grujic S., Pekic R. Cardiac involvement in sarcoidosis evaluated by echocardiography // Proc of 7th WASOG Congress in Stockholm June 16-19, 2002. —N 1 . –177-182.

176. Pietinalho A., Hiraga Y., Hosoda Y., Lofroos A.B., Yamaguchi M., Selroos O. The frequency of sarcoidosis in Finland and Hokkaido, Japan. A comparative epidemiological study // Sarcoidosis. — 1995. — Vol.12. N 1. — P. 61–67

177. Paone G., Lucantoni G., Leone A. et al. Human neutrophil peptides stimulate tumor necrosis factor-alpha release by alveolar macrophages from patients with sarcoidosis// Chest . –2009. –Vol.135(2) . –P. 47-58.

178. Pathak S.K., Basu S., Basu K.K. et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and

TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages// Nat Immunol . –2007. –Vol.8(6) . –P.61-68.

179. Pechkovsky D.V., Prasse A., Kollert F. et al. Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction//Clin Immunol . –2010. –Vol.137(1) . –P.89–101.

180. Pechkovsky D.V., Zissel G., Ziegenhagen M.W. et al. Effect of proinflammatory cytokines on interleukin-8 mRNA expression and protein production by isolated human alveolar epithelial cells type II in primary culture// Eur Cytokine Netw . – 2000. –Vol.11(4) . –P. 25-61.

181. Piotrowski W.J., Kurmanowska Z., Antczak A. et al. Exhaled 8-isoprostane in sarcoidosis: relation to superoxide anion production by bronchoalveolar lavage cells// Inflamm Res . – 2010. –Vol.59(12) . –P. 53-102.

182. Prasse A., Zissel G., Lutzen N. et al. Inhaled vasoactive intestinal peptide exerts immuno-regulatory effects in sarcoidosis// Am J Respir Crit Care Med . – 2010. –Vol.182(4) . –P.54-58.

183. Prasse A, Georges CG, Biller H, Hamm H, Matthys H, Luttmann W, Virchow JC Jr. Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4+ and CD8+ T cells// Clin Exp Immunol. – 2000. –Vol.122(2) . –P. 8-24.

184. Prasse A. The Diagnosis, Differential Diagnosis, and Treatment of Sarcoidosis// Dtsch Arztebl Int . –2016 . –Vol.22 (33-34) . –P. 565-574

185. Pravica V., Asderakis A, Perrey C. et al. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene// Eur J Immunogenet. – 1999. –Vol.26(1) . –P.1-3.

186. Pravica V, Perrey C, Stevens A. et al. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human INF-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high INF-gamma production// Hum Immunol . –2000. – Vol.61(9) . –P.863-876.

187. Prud'homme G.J. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations// Lab Invest . – 2007. –Vol.87(11) . –P.1077–1091.

188. Poulter L.V. Immune aspects of sarcoidosis.// Postgrad. Med. J. – 1988. – Vol. 64. – P. 541-548.

189. Prior C. Knight R.A., Herold M., Ott G., and Spiteri M.A. Pulmonary sarcoidosis: patterns of cytokine release in vitro // Eur. Respir. J. –1996. – N9. – P.47 - 53.

190. Prasse A, C G Georges, H Biller, H Hamm, H Matthys, W Luttmann, and J C Virchow, Jr. Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells// Clin Exp Immunol. – 2000 . – Vol. 122. – P. 241–248.

191. Prasse A. Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4+ and CD8+ T cells // Clinical & Experimental Immunology. – 2000. – Vol.122 (2). – P.241-248.

192. Rosen Y., Vuletin Y.C., Pertschut L.P., Silverstein E. Sarcoidosis from the patholodists viewpoint.// Pathol. Annu . –1978. – Vol.14. – P. 405-439.

193. Rappl G., Pabst S., Riemann D. et al. Regulatory T cells with reduced repressor capacities are extensively amplified in pulmonary sarcoid lesions and sustain granuloma formation// Clin Immunol. – 2011. –Vol.140(1). –P.71–83.

194. Richmond B.W., Ploetze K., Isom J. et al. Sarcoidosis Th17 cells are ESAT-6 antigen specific but demonstrate reduced IFN-gamma expression// J Clin Immunol. – 2013 . –Vol.33(2) . –P.446–455.

195. Ringkowski S., Thomas P.S., Herbert C. Interleukin-12 family cytokines and sarcoidosis// Front Pharmacol . –2014. –Vol.5. –P.233.

196. Riva M., Ka¨ llberg E., Bjork P. et al. Induction of NFkappaB responses by the S100A9 protein is TLR4-dependent//Immunology. – 2012. –Vol.137(2).-172-182.

197. Rottoli P., Magi B., Cianti R. et al. Carbonylated proteins in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis associated

with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis// Proteomics. – 2005. – Vol.5(10) . –P.2612-2628.

198. Rossman M.D., Thompson B., Frederick M. Maliarik M., Iannuzzi M.S., Rybicki B.A., Pandey J.P., Newman L.S., Magira E., Beznik-CizmanB., Monos D. HLA-DRB1*1101. A Significant Risk Factor for Sarcoidosis in Blacks and Whites// Am J Hum Genet . – 2003 . –Vol.73 . –P.720–735 .

199. Rubin R. Bronchoalveolare lavage. // Z. Erkr. Atm. Org. –1985. – Vol.164,№1 –P. 4-18 .

200. Rybicki B.A., Iannuzzi M C , Frederick M M et al. Familial aggregation of sarcoidosis. A case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS)// Am J Respir Crit Care Med . –2001. –Vol.164(11) . –P.2085-2091.

201. Rybicki B.A., Maliarik M.J. et al. The major histocompatibility complex gene region and sarcoidosis susceptibility in African Americans// Am J Respir Crit Care Med . –2003. –Vol.167. –P. 444-449.

202. Rybicki BA, Walewski J.L, Maliarik M.J. et al. The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and whites// Am J Hum Genet . – 2005. –Vol.77(3). –P.491-499.

203. Somoskovi A., Zissel G., Seitzer U. Polymorphisms at position-308 in the promoter region of the TNF-alpha and in the first intron of the TNF-beta genes and spontaneous and lipopolysaccharide-induced tnf-alpha release in sarcoidosis // Cytokine. — 1999. — Vol. 11, № 11. — P.882—887.

204. Sarcoidosis edited by M. Drent and U. Costabel // Eur. Resp. Mon . – 2005. –Vol. –P.1032.

205. Saboor SA, Johnson NM, McFadden J.Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction// Lancet.– 1992. – Vol.25,№339. – P.1012-1015 .

206. Sakthivel P , Brudera D. Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis// Current Opinion in Hematology.–2017 .–Vol. 24 .–P 59–65.

207. Seitzer U., Gerdes J., Müller-Quernheim J. Evidence for disease phenotype associated haplotypes (DR.TNF) in sarcoidosis. Sarcoidosis// Vasc Diffuse Lung Dis . –2001. –Vol.18(3) . –P.279-283.

208. Seitzer U, Swider C, Stuber F. et al. Tumour necrosis factor alpha promoter gene polymorphism in sarcoidosis//Cytokine . –1997. –Vol 9. –P.787–790.

209. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD41 memory T cells: functional modules for tailored immunity// Eur J Immunol . –2009. –Vol.39(8) . P.2076-2082.

210. Saltini C., Spurzem J.R., Lee J.J. et al. Spontaneous release of interleukin 2 by lung T lymphocyin active pulmonary sarcoidosis is primarity from the Leu3+DR+ T cell subset//J Clin Invest. – 1986. –Vol.77(6) . –P.1962-1970

211. Seitzer U., Swider C., Stüber F. et al. Tumour necrosis factor alpha promoter gene polymorphism in sarcoidosis// Cytokine. – 1997. –Vol.9(10) . –P.787–790.

212. Sharma S, B Ghosh, S K Sharma Clin Exp Immunol. Association of TNF polymorphisms with sarcoidosis, its prognosis and tumour necrosis factor (TNF)-α levels in Asian Indians, 2008. – 259 p.

213. Sgonc R., Wick G. Pro- and anti-fibrotic effects of TGF-beta in scleroderma// Rheumatology (Oxford) . –2008 . –Vol.47(Suppl 5). –P.5–7 .

214. Smith N.L., Denning D.V. Clinical implications of interferon-γ genetic and epigenetic variants// Immunology . –2014. –Vol.143(4) . –P.499-511.

215. Somoskövi A., Zissel G., Seitzer U. Polymorphisms at position -308 in the promoter region of the TNF-alpha and in the first intron of the TNF-beta genes and spontaneous and lipopolysaccharide-induced TNF alpha release in sarcoidosis// Cytokine . – 1999. –11(11) . –P.882–887.

216. Schmitt N, Ueno H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines//Curr Opin Immunol. – 2015. –Vol.34. –P.130-136.

217. Shigehara K., Shijubo N., Ohmichi M. et al. IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN-gamma production in sarcoid lungs// J Immunol– 2001– Vol.166(1). –P.642-649.

218. Song X, Gao H, Qian Y. Th17 differentiation and their pro-inflammation function// Adv Exp Med Biol. – 2014. –Vol.841. –P.99–121.

219. Sugiyama K., Mukae H., Ishii H. et al. Elevated levels of interferon gamma-inducible protein-10 and epithelial neutrophil-activating peptide-78 in patients with pulmonary sarcoidosis // Respirology. 2006. –Vol.11(6) . –P. 708-714.

220. Scadding J.G.Mycobacterium tuberculosis in the aetiology of sarcoidosis//Br Med J. –1960.–Vol. 3 (708)–P.1617-1623.

221. Schürmann M., Lympany P.A., Reichel P. et al. Familial sarcoidosis is linked to the major histocompatibility complex region// Am J Respir Crit Care Med . – 2000 . –Vol.1623. – P. 861-864 .

222. Schürmann M, Kwiatkowski R, Albrecht M, et al. Study of Toll-like receptor gene loci in sarcoidosis// Clin Exp Immunol . –2008. –Vol.152(3) . –P.423-431.

223. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, KuzielWA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection// Immunity. – 2003 . –Vol.19. –P.59–70 .

224. Seitzer U., Gerdes J., Müller-Quernheim J. Evidence for disease phenotype associated haplotypes (DR.TNF) in sarcoidosis// Sarcoidosis. Vasc Diffuse Lung Dis . – 2001. –Vol.18(3) . –P.279-283.

225. Seitzer U, Swider C, Stuber F. et al. Tumour necrosis factor alpha promoter gene polymorphism in sarcoidosis// Cytokine. – 1997. –Vol.9. –P.787–790.

226. Shuxian H. Inhibition of microglial cell RANTES production by IL-10 and TGF-b // Journal of Leukocyte Biology. – 1999. – Vol. 65. – P. 815 -821.

227. Shorr A.F., Torrington K.G., Hnatiuk O.W. Endobronchial biopsy for sarcoidosis : a prospective study // Chest. — 2001. — Vol. 120,N 1. — P.109–114.

228. Sharma O.P., Alam S. Diagnosis,pathogenesis, and treatment of sarcoidosis.// Curr. Opin. Pulm. Med . –1995. –Vol. 1(5) sep . –P. 392-400.

229. Sharma S.K.; Khanna M; Sharma S; Srivastava L.M; Verma K; KLhilnani G.C., Pande JN. Effect of corticosteroid treatment on various serological& bronchoalveolar lavage abnormalities in patients with sarcoidosis.// Indian. J. Med. Res. – 1995. –Vol. 101. –P. 207-212.

230. Sgonc R., Wick G. Pro- and anti-fibrotic effects of TGF-beta in scleroderma// Rheumatology (Oxford) . –2008. –Vol.47(Suppl 5) . –P5–7.

231. Song Z., Marzilli L.,Greenlee B.M., Chen E.S., Richard F. Silver R.F., Askin F.B., Teirstein A.S., ZhangY.,Cotter R.J., Moller D.R. Mycobacterial catalase peroxidase is a tissue antigen andtarget of the adaptive immune response in systemi c sarcoidosis// J Exp Med . – 2005. –Vol. 201. –P. 755–767.

232. Shaykhiev R. Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease // The Journal of Immunology. – 2009. – Vol. 183. – P. 2867 -2883 .

233. Stout R.D. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences / R.D. Stout, C. Jiang, B. Matta, et al. // J Immunol. – 2005. – Vol. 175(1). – P. 342-349 .

234. Stout, R.D. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments // Journal of Leukocyte Biology. – 2004. – Vol. 76(3). – P. 509-513 .

235. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells . –Annu Rev Immunol . –2003 . –Vol.21. –P.685–711 .

236. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution// J Exp Med . –1973. –V.137 . –P.1142–1162.

237. Talalaj J., Chyczewska E., Korniluk M., Ossolinska M. Coagulation activity of bronchoalveolar lavage fluid and blood is dependent on pulmonary sarcoidosis stage. // Eur. Respir. J. – 2003. – Vol.22(45). – P.84-94.

238. Talalaj J., Chyszewska E., Korniluk M., Ossolinska M. Coagulation activity of bronchoalveolar lavage fluid and blood in patients with interstitial lung diseases.// Eur. Respir. J. – 2002. – Vol.20(38). – P.174-182.

239. Taflin C., Miyara M., Nochy D. et al. FoxP31 regulatory T cells suppress early stages of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions// Am J Pathol. – 2009. –Vol.174(2) . –P.497–508.

240. Takano Y., Niimi T. Sato S. et al. Effects of FOXP3 gene polymorphism in sarcoidosis patients// Sarcoidosis. Vasc Diffuse Lung Dis . –2007. –Vol.24(2) . –P.102-105.

241. Takeuchi M., Oh I.K., Suzuki J. et al. Elevated serum levels of CXCL9/monokine induced by interferongamma and CXCL10/interferon-gamma-inducible protein-10 in ocular sarcoidosis// Invest Ophthalmol Vis Sci . – 2006. – Vol.47(3) . –P.1063-1074.

242. Ten Berge B., Paats M.S., Bergen I.M. et al. Increased IL-17A expression in granulomas and in circulating memory T cells in sarcoidosis// Rheumatology (Oxford). – 2012. –Vol.51(1) . –P.37–46.

243. Tondell A., Moen T., Borset M. et al. Bronchoalveolar lavage fluid IFN-gamma1 Th17 cells and regulatory T cells in pulmonary sarcoidosis// Mediators Inflamm . – 2014. –Vol.438070. –P.887-962.

244. Tutor-Ureta P., Citores M.J., Castejon R. et al. Prognostic value of neutrophils and NK cells in bronchoalveolar lavage of sarcoidosis// Cytometry B Clin Cytom. –2006. –Vol.70(6) . –P.416-422.

245. Tomasz Urbankowski1, Grażyna Hoser2, Joanna Domagała‐ Kulawik. Th1/Th2/Th17‐ related cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis: association with smoking//Polskie archiwum vedycyny wewnetrzznej. – 2012. – V. 122.– P.320-324.

246. Thillai M., Eberhardt C.,Lewin A.M., Potiphar L., Hingley-Wilson S., Sridhar S., Macintyre J., Kon O.M.,Wickremasighe M., Wells A., Mitch ell D., Lalvani A. Sarcoidosis and TuberculosisCytokine Profiles: Indistinguishable in Bronchoalveolar Lavage but Different in Blood//PLoS One. . — 2012. — 7(7) . – – P.67-89.

247. Teirstein A.S., Padilla M.L., De Palo L.R., Schilero G.J. Sarcoidosis mythology // Mt.Sinai.J.Med. — 1996. — Vol. 63, N 5–6. — P.335–341.

248. Ten Berge B.,Kleinjan A.,Muskens F.,Hammad H., Hoogsteden H.C., Hendriks R.W., Lambrecht B.N., van der Blick B. Evidence for local dendritic cell activation in pulmonary sarcoidosis //Respir Res. —2012 . — Vol.13 . —P. 33-43 .

249. Umemura, N. Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics // J. Leukoc. Biol. – 2008. – Vol. 83(5). – P. 1136–1144 .

250. Valentonyte R., Hampe J., Huse K. et al. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2//Nat. Genet. —2005 . —Vol.37(4) . — P.357–364.

251. Vasakova M., Sterclova M., Kolesar L. et al. Cytokine gene polymorphisms and BALF cytokine levels in interstitial lung diseases// Respir Med. — 2009. —Vol.103(5) . —P.773–779.

252. Vereyken, E.J.F. Classically and alternatively activated bone marrow derived macrophages differ in cytoskeletal functions and migration towards specific CNS cell types // Journal of Neuroinflammation. - 2011. –Vol. 8.– P. 58 .

253. Valencia X, Stephens G., Goldbach-Mansky R. et al. TNF downmodulates the function of human CD41CD25hi T-regulatory cells//Blood. —2006. — Vol.108(1) . —P.253-261.

254. Van Haarst J.M., Verhoeven G.T., de Wit H.J. et al. CD1a1 and CD1a-accessory cells from human bronchoalveolar lavage differ in allostimulatory potential and cytokine production// Am J Respir Cell Mol Biol. . — 1996. — Vol.15(6) . —P.952-997.

255. Vasakova M., Sterclova M., Kolesar L. et al. Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases// Scand J Immunol. – 2009. —Vol.69(3)2. — P.68–74.

256. Veltkamp M, Grutters JC, van Moorsel CH, et al. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphism Asp299Gly is not associated with disease course in Dutch sarcoidosis patients// Clin Exp Immunol . — 2006 . —Vol.145(2) . — P.215-218.

257. Veltkamp M, van Moorsel CH, Rijkers GT, et al. Toll-like receptor (TLR)-9 genetics and function in sarcoidosis// Clin Exp Immunol. — 2010. — Vol.162(1). —P. 68–74.

258. Veltkamp M, van Moorsel CH, Rijkers GT, et al. Genetic variation in the Toll-like receptor gene cluster (TLR10-TLR1-TLR6) influences disease course in sarcoidosis// Tissue Antigens . — 2012. —Vol.79(1) . — P.25–32.

259. Veltkamp M, Wijnen PA, van Moorsel CH, et al. Linkage between Toll-like receptor (TLR) 2 promotor and intron polymorphisms: functional effects and relevance to sarcoidosis// Clin Exp Immunol . —2007 . — Vol.149(3) . —P.453-462.

260. Verreck, F. A. W., de Boer, T., Langenberg, D. M. L., Hoeve, M. A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., Ottenhoff, T. H. M. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10 producing type 2 macrophages subvert immunity to mycobacteria //Proc. Natl. Acad. Sci. .—2004 .—Vol.101.—P.4560-4565 .

261. Verreck F.,A.,W., de Boer T., Langenberg D.,M.,L., van der Zanden L., Ottenhoff T.,H.,M. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-γ- and CD40L-mediated costimulation//*J.* LeukocyteBiol. — 2006 . — Vol. 79, № 2. — P.285-299 .

262. Voorter C.E., Drent M., van den Berg-Loonen E.M. Severe pulmonary sarcoidosis is strongly associated with the haplotype HLA-DQB1*0602DRB1*15010// Hum Immunol. — 2005. —Vol. 667. —P. 826-835.

263. Wahlstrom J., Dengjel J., Winqvist O. et al. Autoimmune T cell responses to antigenic peptides presented by bronchoalveolar lavage cell HLA-DR molecules in sarcoidosis// Clin Immunol. — 2009. —Vol.133(3) . —P.353-363.

264. Wennerstrom A., Pietinalho A., Vauhkonen H. et al. HLA-DRB1 allele frequencies and C4 copy number variation in Finnish sarcoidosis patients and associations with disease prognosis// Hum Immunol. — 2012 . —Vol.73. —P.93–100.

265. Wysoczanska B., Bogunia-Kubik K., Lange A. INF-gamma and HLA polymorphisms in sarcoidosis// Genes and Immunity. — 2003. —Vol 4. —P.44.

266. Wikén M., Grunewald J., Eklund A., Wahlström J. Multiparameter phenotyping of T-cell subsets in distinct subgroups of patients with pulmonary sarcoidosis// J Intern Med. — 2012 . —Vol.271(1). —P.90–103.

267. Wiken M, Grunewald J, Eklund A, et al. Higher monocyte expression of TLR2 and TLR4, and enhanced pro-inflammatory synergy of TLR2 with NOD2 stimulation in sarcoidosis// J Clin Immunol . —2009. —Vol.29(1)7. —P.88–89.

268. Wirnsberger R.M., de Vries J., Wouters E.F., Drent M. Clinical presentation of sarcoidosis in the Netherlands an epidemiological study // Neth.J.Med. — 1998. — Vol. 53, N 2. — P. 53–60.

269. Xie X.J., Wu M., Niu Y. et al. Associations between tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and sarcoidosis: a meta-analysis//Mol. Biol. Rep. — 2014. —Vol.41(7) . —P.4475-4480.

270. Yamaguchi E., Itoh A., Hizawa N, Kawakami Y. The gene polymorphism of tumor necrosis factor-beta, but not that of tumor necrosis factor-alpha, is associated with the prognosis of sarcoidosis// Chest. — 2001. —Vol.119. — P.753–761

271. Yonekawa K., Neidhart M., Altwegg L.A. et al. Myeloid related proteins activate Toll-like receptor 4 in human acute coronary syndromes// Atherosclerosis. —2011. —Vol.218(2) . —P.486-492.

272. Zabel P., Entzian P., Dalhoff K., Schlaak M. Pentoxifylline in treatment of sarcoidosis//AmJRespirCritCareMed . – 1997. – Vol.155, P.1665–1669

273. Zaatari FA, Naser SA, Markesich DC, Kalter DC, Engstand L,Graham DY Id entification of Mycobacterium avium complex in sarcoidosis// J ClinMicrobiol. – 1996. – Vol.34. – P.2240-2245.

274. Zeyda M. Human adipose tissue macrophages are of anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production //. Int J Obes. – 2007. - Vol. 31 (9). – P. 1420-1428.

275. Zissel G. Sarcoidosis – immunopathogenitic concepts // J. Semin Respir Crit Care Med. – 2007. – Vol.28 (1). – P.3-14.

276. Ziegenhagen M.W., RotheM.E., Schlaak M., and Müller-Quernheim J. Bronchoalveolar and serological parameters reflecting the severity of sarcoidosis. // Eur. Respir. J. – Mar 2003. – Vol. 21. – P.407 - 413.

277. Ziora D., Gawlik R., Baumgarten C. et al. Bradykinin levels in BAL fluid in patients with sarcoidosis. //Pneum. Alergol Pol . – 1996. –Vol. 64(1-2). – P.54-58 .

278. Zissel G., Homolka J., Schlaak J. et al. Anti-inflammatory cytokine release by alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis// Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1996. – Vol.154(3 Pt 1) . – P.713–719.

279. Zissel G., Ernst M., Schlaak M. et al. Accessory function of alveolar macrophages from patients with sarcoidosis and other granulomatous and nongranulomatous lung diseases// J Investig Med. – 1997. – Vol.45(2). –P. 75–86.

280. Zhang, X. Lipopolysaccharide structure-function relationship in activation versus reprogramming of mouse peritoneal macrophages // J Leukoc Biol. – 1993 – Vol. 54(5). – P.444-450 .

281. Zheng, L. Alveolar macrophage TNF-alpha release and BAL cell phenotypes in sarcoidosis // Am J Respir Crit Care Med. – 1995. – Vol. 152(3). – P.10-41 .

282. Ziegenhagen M.W., Rothe M.E., Schlaak M. et al. Bronchoalveolar and serological parameters reflecting the severity of sarcoidosis// Eur Respir J. 2003. – Vol.21(3) . – P.407-413.

283. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults// Blood. –2008. – Vol.112(5) . – P.1557-1569.