

Морфофункциональная характеристика и иммунологическая регуляция функции орбитальных фибробластов при эндокринной офтальмопатии

© *Е.С. Таскина**, *С.В. Харинцева*

ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия, Чита, Россия

Эндокринная офтальмопатия (ЭОП) – это хроническое заболевание, характеризующееся прогрессирующим аутоиммунным воспалением мягких ретробульбарных тканей. В патогенезе инфильтративного процесса и фиброобразования экстраокулярных мышц и/или ретробульбарной клетчатки важное значение имеют орбитальные фибробласты, обладающие уникальными морфофункциональными свойствами. Они в отличие от фибробластов других локализаций имеют не мезодермальное, а нейроэктодермальное происхождение. В обзоре рассматриваются иммунологические аспекты регуляции функции данных клеток в разные фазы активности заболевания. Межклеточное взаимодействие с Т-лимфоцитами (CD40–CD154) приводит к активации орбитальных фибробластов с усилением экспрессии патологических рецепторов к тиреотропному гормону, а также продукции компонентов межклеточного матрикса, молекул адгезии, ростовых факторов, цитокинов и простагландинов. Дана подробная морфофункциональная характеристика отдельных субпопуляций фибробластов орбиты, рассмотрены механизмы регуляции их трансдифференцировки в адипоциты и миофибробласты. Представлен анализ литературных данных по влиянию Т-хелперов 17 типа на функциональную активность Thy1+/Thy1– (CD90+/CD90–) орбитальных фибробластов. Отмечена важность дальнейшего изучения особенностей фибробластов орбиты при ЭОП и их межклеточного взаимодействия с различными иммунными клетками, что, возможно, сможет раскрыть новые патогенетические механизмы изучаемой патологии.

Ключевые слова: эндокринная офтальмопатия, патогенез, орбитальные фибробласты.

Morphofunctional characteristics and immunological regulation of the orbital fibroblasts function in endocrine ophthalmopathy

© *Elizaveta S. Taskina**, *Svetlana V. Kharintseva*

Chita State Medical Academy, Chita, Russia

Endocrine ophthalmopathy (EOP) is a chronic disease characterized by progressive autoimmune inflammation of the soft retrobulbar tissues in thyroid dysfunction. The orbital fibroblasts with their unique morphofunctional properties are very important in the pathogenesis of the infiltrative process and fibrosis of the extraocular muscles and/or retrobulbar tissue. They, unlike other localization fibroblasts, have not mesodermal, but neuro-ectodermal origin. The review acquaints with the immunological aspects of the regulation of these cells in different activity phases of disease. Intercellular interaction with T-lymphocytes (CD40-CD154) leads to orbital fibroblasts activation with increased expression of pathological receptors for thyroid-stimulating hormone, as well as production of intercellular matrix components, adhesion molecules, growth factors, cytokines and prostaglandins. Detailed morphofunctional characteristics of the orbit fibroblast subpopulations and mechanisms regulating their transdifferentiation into adipocytes and myofibroblasts are given. The analysis of literature data on the effect of T-helper type 17 on the functional activity of Thy1+/Thy1– (CD90+/CD90–) orbital fibroblasts is presented. The importance of the further study of the orbital fibroblasts characteristics in EOP and their intercellular interaction with various immune cells was noted, which may be able to uncover new pathogenetic mechanisms of this pathology.

Key words: Graves' ophthalmopathy, thyroid eye disease, endocrine ophthalmopathy, pathogenesis, orbital fibroblasts.

Список сокращений

ЭОП – эндокринная офтальмопатия
цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
α-SMA (α-smooth muscle actin) – α-гладко-мышечный актин
IGF-1 (insulin-like growth factor 1) – инсулиноподобный фактор роста 1
IFN-γ (interferon-γ) – интерферон-γ
IL (interleukin) – интерлейкин

GAG (glycosaminoglycans) – гликозаминогликаны
МНС (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости
PDGF (platelet-derived growth factor) – тромбоцитарный фактор роста
PPAR-γ (peroxisome proliferator-activated receptor-γ) – рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом-γ

PG (prostaglandin) – простагландин
 sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1) – растворимая форма молекулы межклеточной адгезии 1
 sVCAM-1 (soluble vascular cell adhesion molecule-1) – растворимая форма молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1
 TCR (T-cell receptor) – Т-клеточный рецептор
 TGF- β (transforming growth factor- β) – трансформирующий ростовой фактор- β
 Th (T-helper cells) – Т-хелперы
 Thy-1 (thymocyte antigen-1) – антиген тимочитов-1
 Thy1+ (CD90+) – субпопуляция орбитальных фибробластов или миофибробластов
 Thy1- (CD90-) – субпопуляция орбитальных фибробластов или преадипоцитов
 TNF- α (tumor necrosis factor- α) – фактор некроза опухолей- α
 TSAbs (thyroid stimulating antibodies) – тиреостимулирующие антитела
 TSHR (thyroid-stimulating hormone receptor) – рецептор к тиреотропному гормону

Введение

Эндокринная офтальмопатия (ЭОП) рассматривается как заболевание орбиты, которое характеризуется хроническим прогрессирующим аутоиммунным воспалением мягких тканей орбиты [1–4]. Повреждение ретробульбарной клетчатки и экстраокулярных мышц начинается с отека и инфильтрации до развития фиброза [1, 2]. На сегодняшний момент ЭОП относится к мультифакториальным заболеваниям без выявленного основного этиологического фактора, что обуславливает дальнейшую необходимость углубленного изучения клеточных и иммунологических аспектов патогенеза данной патологии.

Иммунологические аспекты патогенеза ЭОП

Согласно проведенным исследованиям, фибробласты ретробульбарной ткани играют важную роль в развитии и прогрессии ЭОП. На мембране данных клеток обнаружены матричные РНК, которые кодируют внеклеточную часть патологического рецептора к тиреотропному гормону (TSHR) [3, 5–8]. TSHR имеет две субъединицы: внеклеточную А-субъединицу, связанную через шарнирную область с трансмембральной В-субъединицей. На А-субъединице найдены специальные участки, богатые лейцином (LLRs – leucine rich repeating), имеющие высокое сродство к тиреотропному гормону, а также к патологическим антителам, стимулирующим рецептор тиреотропного гормона (TSAbs) [9–11].

В патогенезе ЭОП важное значение имеют Т-лимфоциты, перекрестно реагирующие с TSHR, расположенными как в тканях щитовидной железы, так и на поверхности орбитальных фибробластов [9]. Дополнительному усилению пролиферации и дифференцировки аутоактивных Т-лимфоцитов способствует наличие при ЭОП дефекта Т-супрессоров. В свою очередь повышение числа клонов Т-хелперов 2 типа (Th-2) стимулирует антителообразование В-лимфоцитами [4, 12].

TSAbs и тиреотропный гормон имеют схожие механизмы влияния на TSHR, включающие активацию аденилатциклазы с повышением продукции тиреоцитами циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). В тканях щитовидной железы данные антитела стимулируют пролиферацию фолликулярного эпителия и высвобождение гормонов щитовидной железы (Т₄ и Т₃) [13]. При ЭОП TSAbs связываются с патологическими TSHR на орбитальных фибробластах и активируют PI3K/АКТ/mTOR, что дополнительно стимулирует увеличение продукции цАМФ и цитокинов. Внутриклеточный сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR, центральными компонентами которого являются ферменты фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), протеинкиназа В (АКТ) и протеинкиназа mTOR, относится к одному из универсальных и отвечает за рост, пролиферацию и усиление метаболизма клеток [13].

При ЭОП аутоантитела стимулируют выработку про- и противовоспалительных медиаторов иммунными клетками, которые регулируют локальный воспалительный ответ, адипогенез, пролиферацию и синтетическую активность фибробластов в мягких тканях орбиты [3, 4, 9, 13]. Активность заболевания напрямую коррелирует с титром антител к TSHR [5, 13–15].

Активная фаза ЭОП характеризуется инфильтрацией экстраокулярных мышц и ретробульбарной клетчатки CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами, В-лимфоцитами, а также мононуклеарными клетками [9, 12]. В патогенезе формирования инфильтративного процесса ключевое значение отводят орбитальным фибробластам, на поверхности мембраны которых обнаружена повышенная экспрессия ко-стимулирующих молекул CD40 и МНС II (major histocompatibility complex – главный комплекс гистосовместимости). CD154 (CD40L – CD40-ligand) является ко-стимулирующим протеином, экспрессируемым многими клетками (тромбоцитами, лейкоцитами, эндотелиальными, эпителиальными, гладкомышечными клетками и др.) и отвечающим за регуляцию их активности [16].

Межклеточное взаимодействие CD40–CD154 с Т-лимфоцитами способствует активации орбиталь-

ных фибробластов с усилением экспрессии патологических TSHR, а также синтеза компонентов межклеточного матрикса (коллаген, фибронектин, гликозаминогликаны), молекул адгезии (sVCAM-1, sICAM-1), ростовых факторов (PDGF, IGF-1), цитокинов (TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-8) и простагландинов (PGE₂) [17]. Активированные орбитальные фибробласты имеют ускоренную пролиферацию и способны дифференцироваться в миофибробласты или адипоциты [4, 6, 18].

В активную фазу ЭОП выявлено изменение профиля про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови и слезе [19]. Обнаружена повышенная секреция таких медиаторов, как IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-8, TNF- α [12]. IL-6 усиливает экспрессию TSHR на поверхности орбитальных фибробластов, а также ускоряет дифференцировку и выработку аутоантител к данному рецептору В-лимфоцитами [20]. Повышение рецепторов к IL-6 (IL-6R) имеет прямые корреляционные связи с активностью ЭОП [21]. IL-1 β стимулирует синтез гиалуроновой кислоты фибробластами орбиты и ускоряет адипогенез [22]. Кроме того, IL-1 β и лейкорегулин способствуют усилению продукции простагландина E₂ (PGE₂), который дополнительно ускоряет созревание Th-2 и В-лимфоцитов и экспрессию IL-6 орбитальными фибробластами [6].

Неактивная стадия заболевания характеризуется тканевым ремоделированием с фиброгенезом экстраокулярных мышц и ретробульбарной клетчатки [4]. В позднюю фазу преобладают Th-2 и ассоциированные с ними цитокины [4, 12]. IL-4 активирует патологическую пролиферацию фибробластов и продукцию компонентов межклеточного матрикса [23]. В неактивную фазу ЭОП интерферон- γ (IFN- γ), напротив, обладает противовоспалительными свойствами и ингибирует орбитальный адипогенез [24]. Были получены данные о том, что IFN- γ и фактор некроза опухолей- α (TNF- α) усиливают продукцию моноцитарного хемотаксического протеина 1, 2 и 3 (MCP – monocyte chemotactic protein), который играет важную роль в процессах фиброгенеза в орбите [25]. IFN- γ и IL-1 β действуют синергично, усиливая синтез гликозаминогликанов (glycosaminoglycans – GAG), фибронектина и коллагена фибробластами орбиты [23]. Более того, IL-1 β стимулирует выработку тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1 (TIMP-1) орбитальными фибробластами, замедляя процессы утилизации компонентов соединительной ткани и способствуя развитию фиброза мягких тканей орбиты [23]. Также IFN- γ стимулирует экспрессию маркера CD40 и растворимой формы молекулы межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) фибробластами орбиты, способствуя формированию

лейкоцитарной инфильтрации ретробульбарных тканей и хронизации локального воспалительного процесса [24]. Трансформирующий фактор роста- β (TGF- β) напрямую усиливает экспрессию TSHR, не влияя на адипогенез в орбите. Также под влиянием TGF- β дополнительно активируется профиброгенный подкласс CD90+ фибробластов, которые синтезируют α -гладкомышечный актин (α -smooth muscle actin – α -SMA) и компоненты межклеточного матрикса [3, 24].

Субпопуляции орбитальных фибробластов

Известно, что фибробласты являются основными клетками соединительной ткани, участвующими в обменных процессах и синтезирующими компоненты межклеточного матрикса. При ЭОП данные клетки представлены смешанной популяцией клеток, включающей фиброциты, а также подтипы Thy1+/Thy1– (CD90+/CD90–), которые предложены в качестве основы для фиброгенеза и адипогенеза [26]. Разнообразие наблюдаемых фенотипов дает основание предполагать, что орбитальные фибробласты могут обладать свойствами стволовых клеток [27].

Фибробласты орбиты обладают уникальными морфофункциональными свойствами. Они в отличие от фибробластов других локализаций имеют не мезодермальное, а нейроэктодермальное происхождение [6]. При репарации поврежденных тканей пул фибробластов способен восполняться трансдифференцировкой фиброцитов. Данный процесс называется эпителиально-мезенхимальным переходом (epithelial-mesenchymal transition) [28].

Фиброциты являются мезенхимальными клетками, циркулирующими в кровотоке. Они быстро инфильтрируют очаг повреждения и способствуют развитию воспаления, тканевого ремоделирования и фиброза поврежденных тканей. Известно, что фиброциты экспрессируют α - и β -цепи рецепторов для тромбоцитарного фактора роста (PDGF), запуская процесс фиброгенеза мягких ретробульбарных тканей [29]. Также при ЭОП данные клетки усиленно экспрессируют на поверхности своей мембраны TSHR, рецепторы к инсулиноподобному фактору роста 1 (IGF-1R), тиреоглобулин и тиреоидпероксидазу [7].

У пациентов с ЭОП выявлено повышение числа циркулирующих фиброцитов в периферической крови [30, 31]. При этом циркулирующие фиброциты инфильтрируют мягкие ретробульбарные ткани, дифференцируясь в CD34+ орбитальные фибробласты с дальнейшим превращением в адипоциты или миофибробласты, в то время как у здоровых лиц они дифференцируются в CD34– [30]. Однако молеку-

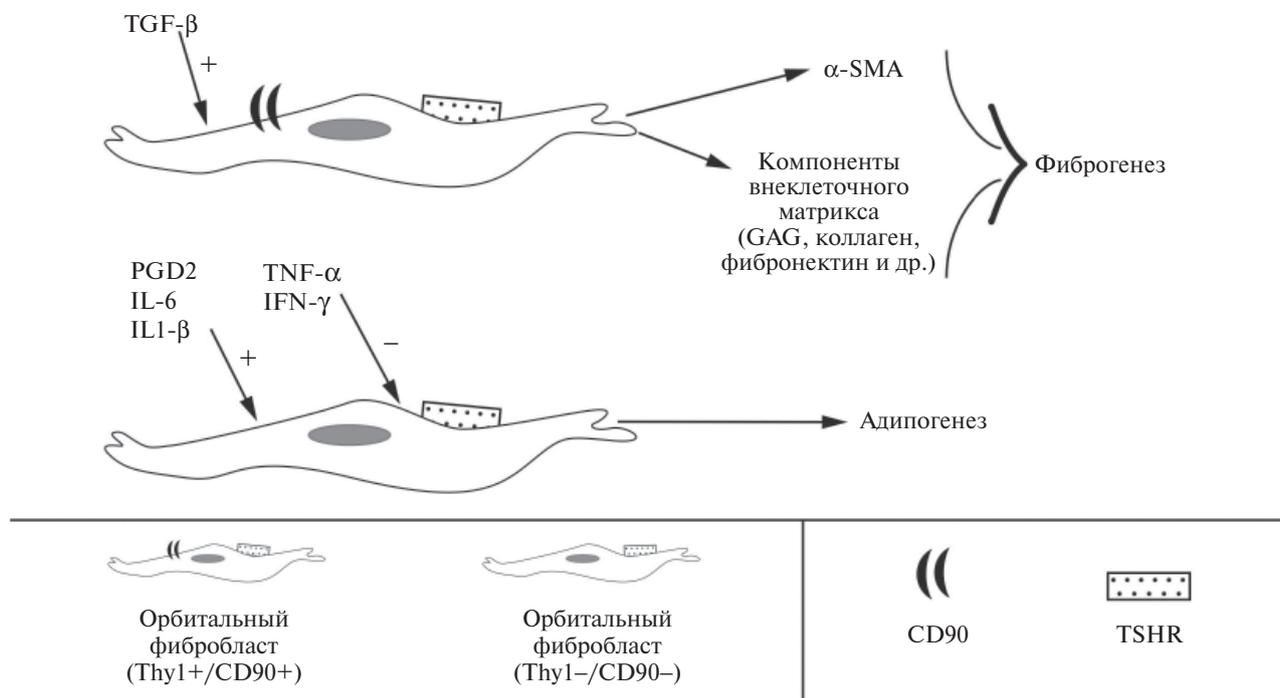


Рисунок. Субпопуляция Thy1+/Thy1- (CD90+/CD90-) орбитальных фибробластов.

лярные механизмы, происходящие при миграции фиброцитов в мягкие ткани орбиты, изучены не в полной мере [6].

По возможности экспрессии гликопротеина CD90, также известного как антиген тимоцитов-1 (Thy-1 – thymocyte antigen-1), различают две фенотипически и функционально гетерогенные субпопуляции фибробластов (рисунок). Thy1+ или CD90+ фибробласты экспрессируют на своей поверхности Thy-1 и участвуют в ремоделировании и фиброгенезе мягких ретробульбарных тканей [26]. Субпопуляция Thy1- или CD90- не имеет на клеточной мембране маркер Thy-1 и способна к дифференцировке в зрелые адипоциты [2, 4, 6, 26].

Под действием TGF-β Thy1+ (CD90+) фибробласты дифференцируются в миофибробласты [26]. После данной трансдифференцировки миофибробласты прекращают пролиферацию и начинают избыточно синтезировать компоненты внеклеточного матрикса, в частности GAG, фибронектин, коллаген I, III и IV типов, а также α-гладкомышечный актин (α-SMA). α-SMA является изоформой протеина актина, которая преобладает в сосудистых гладкомышечных клетках и играет важную роль в фиброгенезе [28]. При этом экспрессия α-SMA напрямую коррелирует с активностью миофибробластов [32].

GAG представляют собой группу линейных полианионных гетерополисахаридов, включающих хондроитинсульфат, дерматансульфат, гепарансуль-

фат, гепарин, кератансульфат и гиалуроновую кислоту. Цепи данных макромолекул, за исключением гиалуроновой кислоты, ковалентно присоединены к белкам ядра, образуя протеоглики, которые являются элементами клеточной мембраны, внутриклеточных гранул, а также компонентами основного вещества межклеточного матрикса соединительной ткани [33]. GAG обладают гидрофильными свойствами, связывая молекулы воды и способствуя развитию отека ретробульбарных тканей [3, 4, 8, 34, 35]. С.С. Kriger и соавт. обнаружили прямую зависимость между повышением концентрации данных макромолекул в суточной моче и фазой активности ЭОП [35].

Такие медиаторы, как лейкорегулин, IL-1β, TNF-α, IFN-γ, TGF-β, простагландин E2 (PGE2), PDGF, IGF-1, усиливают продукцию гиалуроновой кислоты Thy1+/CD90+ орбитальными фибробластами [6, 36]. Синтез гиалуроновой кислоты регулируется клеточной мембраной, экспрессирующей гиалуронсинтазу (HASs – hyaluronan synthases). В настоящее время изучены три изоформы HAS (HAS1-3). При ЭОП наибольшую роль в синтезе гиалуроновой кислоты орбитальными фибробластами играет HAS2 [6].

Субпопуляция орбитальных фибробластов Thy1- (преадипоциты) в отличие от фибробластов другой локализации способна дифференцироваться в адипоциты [2, 4, 6]. Такие провоспалительные медиаторы, как IL-1β, IL-6 и простагландин D2 (PGD2),

усиливают адипогенез в орбите. IFN- γ и TNF- α , напротив, ингибируют адипогенную дифференцировку орбитальных фибробластов. Это согласуется с ролью Th-1-связанных цитокинов в ранней активной воспалительной фазе ЭОП [6].

Важную роль при этой дифференцировке преадипоцитов в зрелые адипоциты играет усиление экспрессии ядерных рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом- γ (PPAR- γ – peroxisome proliferator-activated receptors- γ) [37]. Пероксисомы являются внутриклеточными органеллами, содержащими различные ферменты (в основном оксидазы и каталазы). Данные органеллы выполняют метаболические функции: β -окисление жирных кислот, аэробное клеточное дыхание, участие в метаболизме холестерина. При различных патологических состояниях и заболеваниях в клетках увеличивается число пероксисом и усиливается оксидативный стресс [37].

Рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом (PPARs), относятся к лиганд-активируемым транскрипционным факторам и играют существенную роль в регуляции энергетического и метаболического гомеостаза, а также клеточной дифференцировки [37]. Описано три класса PPARs: PPAR- α (NR1C1), PPAR- β/δ (NR1C2) и PPAR- γ (NR1C3). Структурно PPARs аналогичны рецепторам стероидных или тиреоидных гормонов. При связывании PPARs с пролифератором пероксисом возникает активация и экспрессия различных генов. При отсутствии лигандов данные гетеродимеры находятся в связанном состоянии с ко-репрессорным комплексом, блокирующим транскрипцию генов [38].

PPAR- γ подразделяется на четыре изоформы: $\gamma 1$ присутствуют практически во всех тканях, включая селезенку, сердце, мышцы, толстую кишку, почки и поджелудочную железу; $\gamma 2$ экспрессируются в основном жировой ткани; $\gamma 3$ обнаружены в макрофагах, толстой кишке и белой жировой ткани; $\gamma 4$ синтезируются в эндотелиальных клетках. PPAR- γ играет важную роль в иммунном ответе за счет способности ингибировать экспрессию воспалительных цитокинов и направлять дифференцировку иммунных клеток на противовоспалительные фенотипы. Также PPAR- γ усиливает экспрессию генов, кодирующих белки, которые регулируют метаболизм глюкозы и липидов, а также участвует в дифференцировке адипоцитов [39, 40].

Имеются сведения, что изоформа PPAR- γ способна влиять на Thy1-фенотип орбитальных фибробластов, превращая их в зрелые адипоциты. Более того, под влиянием данной изоформы отмечена высокая способность зрелых адипоцитов к синтезу рецептора к тиреотропному гормону (TSHR) [4, 6].

Межклеточное взаимодействие между Т-хелперами 17 типа и Thy1+/Thy1- (CD90+/CD90-) орбитальными фибробластами

Идентификация особого подтипа CD4+ лимфоцитов – Т-хелперов 17 (Th-17) в 2005 г. как антигена STLA8, локализующегося на мембране цитотоксических лимфоцитов мышей, заставило пересмотреть устоявшиеся взгляды на патогенез развития аутоиммунной патологии. Данные лейкоциты синтезируют IL-17 и IL-23, которые играют важную патогенетическую роль при различных иммуновоспалительных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, болезнь Крона, псориаз, реакция отторжения трансплантата, бронхиальная астма и др. [41–43].

Помимо IL-17 Th-17 экспрессируют хемокиновые рецепторы (CCR4 и CCR6) и синтезируют IL-22, IL-26, хемокиновый лиганд 20 и моноцитарный хемокиновый протеин (MCP) [25]. IL-6 и TGF- β индуцируют дифференцировку Th-17 из наивных предшественников (Th-0) [44]. Важную роль в регуляции функциональной активности Th-17 играют CD4+ Т-регуляторы, которые подавляют экспрессию фактора транскрипции программы дифференцировки ROR γ t (retinoic acid-receptor-related orphan receptor). Однако под воздействием провоспалительных цитокинов CD4+ Т-регуляторы способны трансформироваться в Th-17 [44].

Установлено, что IL-17 синтезируется широким спектром иммунных клеток, включая дендритные клетки, макрофаги, нейтрофилы, естественные киллерные клетки, тучные клетки. В настоящее время описано 6 видов IL-17 (IL-17A-F). IL-17A является димерным гликопротеином с массой 15 кДа, который состоит из 155 аминокислот. Данный интерлейкин обеспечивает взаимодействие между врожденным и приобретенным иммунитетом. В кровяном русле может циркулировать в виде гомодимера, состоящего из двух цепей IL-17A (IL-17A), или гетеродимера, дополнительно включающего IL-17F (IL-17A/F). IL-17A и IL-17A/F связываются с рецепторным комплексом, образованным субъединицами IL-17 рецептора А-типа (IL-17RA) и IL-17 рецептора С-типа (IL-17RC). Данная рецепторная система опосредует свой ответ через активацию Act1 (также известного как CIKS – Connection to IKK and SAPK/JNK), регулирующего продукцию медиаторов врожденного иммунитета (фактор некроза опухолей- α (TNF- α), IL-1, IL-6, IL-8) [41].

Фибробласты, эпителиальные клетки, кератиноциты и синовиоциты экспрессируют рецептор для IL-17 (IL-17R). Активировавшись, данные клетки синтезируют медиаторы, усиливающие рекрутирова-

ние Th-17 и нейтрофилов в очаг воспаления [42]. Данные о влиянии Th-17 и IL-17 на течение аутоиммунного воспалительного процесса при ЭОП противоречивы. Отмечено, что IL-17 обладает мощным провоспалительным эффектом, усиливающим экспрессию цитокинов и хемокинов [43]. IL-17 активирует продукцию активных форм кислорода Ras1 ГТФазой и NADPH-оксидазой 1, что в свою очередь стимулирует пролиферацию, миграцию, подвижность и дифференцировку мезенхимальных клеток, в том числе и орбитальных фибробластов [44, 46].

Также появились сведения о профибротическом эффекте IL-17 благодаря усилению секреции моноцитарного хемокинового протеина (MCP) и развитию макрофагальной инфильтрации [25]. Более того, IL-17 стимулирует синтез матриксных металлопротеиназ (MMPs) 1, 2, 8, 13, 27 [47].

По данным J. Shen и соавт., концентрация IL-17 была повышена как при активной, так и при неактивной фазах ЭОП [43]. Другие авторы отмечают раннее повышение концентрации IL-17 при развитии активной ЭОП [48, 49]. При этом увеличение числа патологических Th-17 напрямую коррелировало с активностью ЭОП [50]. Было выявлено, что только субпопуляция CD44⁺ Th17 способна продуцировать IL-17A при ЭОП [50]. CD44 является основным рецептором для гиалуроновой кислоты, опосредующим адгезию Т-клеток к орбитальным фибробластам [51].

В недавних исследованиях был отмечен провоспалительный эффект IL-17 при ЭОП [50, 51]. Свое провоспалительное действие IL-17 реализует через активацию продукции цитокинов орбитальными фибробластами обеих субпопуляций – CD90⁺ и CD90⁻. На поверхности CD90⁺ и CD90⁻ отмечена повышенная экспрессия ко-стимулирующей молекулы MHC II и CD40, что позволяет рассматривать данные клетки в качестве антигенпредставляющих [50, 51]. Взаимодействие CD40L-CD40 и Т-клеточный рецептор (TCR) – MHC II дополнительно усиливает взаимную активацию орбитальных фибробластов и Th-17.

Было выявлено, что CD90⁺ и CD90⁻ орбитальные фибробласты могут *in vitro* усиливать дифференцировку Th-17. Это объясняется наличием большого числа клеток RORγt⁺ IL-17A⁺ [50]. Хотя Th-17 не индуцируют продукцию IL-1β и IL-23 с помощью орбитальных фибробластов, но они способны усиливать продукцию PGE2. Применение индометацина при ЭОП сдерживало синтез PGE2 фибробластами орбиты и ингибировало дифференцировку Th17 [53].

Значительное повышение уровня IL-17 приводит к развитию фиброза мягких ретробульбарных тканей у пациентов с ЭОП ввиду того, что данный

цитокин напрямую усиливает экспрессию α-гладкомышечного актина (α-SMA) и продукцию компонентов межклеточного матрикса [52]. Также IL-17 через усиление продукции TGF-β индуцируется фиброгенез мягких ретробульбарных тканей вследствие стимулирования дифференцировки орбитальных фибробластов CD90⁺ в миофибробласты и избыточной секреции компонентов межклеточного матрикса [50, 54]. Более того, IL-17 усиливает восприимчивость CD90⁺ к действию TGF-β [55]. Чрезмерный иммунный ответ Th-17, особенно при тяжелой форме ЭОП, вероятно, вызовет орбитальный фиброз быстрее. Регрессия воспалительного процесса в орбите на фоне высокого уровня клеток Th-17 будет продолжать усугублять фиброз в поздней неактивной фазе ЭОП [52, 55].

Одновременно с активацией фиброгенеза происходит торможение 15-D-простагландин J2-индуцированного адипогенеза CD90⁻ [50, 56]. Антиадипогенный эффект IL-17A на CD90⁻ орбитальные фибробласты, возможно, связан с дефосфорилированием транскрипционного фактора СЕВР/α через инактивацию GSK-3β (glycogen synthase kinase-3β – киназа гликогенсинтетазы-3β) [50, 56, 57]. Также, возможно, IL-17 способен на ранних стадиях (24–48 ч) участвовать в деградации липидов за счет ускорения их катаболизма. Более того, есть предположение, что IL-17 тормозит этапы дифференцировки орбитальных фибробластов CD90⁻ в адипоциты, потому что является антагонистом PPAR-γ [50]. В совокупности орбитальные фибробласты имеют гетерогенные ответы на IL-17, которые регулируют фиброз и адипогенез в сторону профибротического смещения [52].

Предполагается, что IL-12 и IL-23 являются регуляторными цитокинами и участвуют в образовании и поддержании функциональной активности Th-17 [43, 58, 59]. Данные цитокины являются гетеродимерами с общей субъединицей β-цепью p40. IL-12 и IL-23 регулируют дифференцировку Т-лейкоцитов по линиям Th1– и Th-17. Помимо этого IL-23 участвует в активации Th-17 и усиливает синтез IL-17 [58–60]. Результаты исследований показали, что только на активированных Th-17 экспрессируются рецепторы к IL-23 (IL-23R). При этом только IL-23R-позитивные Th17 способны к миграции в очаг воспаления [59, 60].

Данные о влиянии IL-23 на течение и прогноз ЭОП немногочисленны и требуют более углубленного изучения. Было выявлено, что при ЭОП происходит одновременное повышение уровня IL-23 и IL-1β как в сыворотке крови, так и в мягких ретробульбарных тканях [52]. При этом данные интерлейкины способны инициировать воспалительный процесс и усиливать дифференцировку наивных

T-лимфоцитов в патогенный фенотип Th-17 [52]. Несмотря на синергическое действие, индуцирующий эффект PGE2 на линию Th17 был независимым от IL-23 [50].

Заключение

Таким образом, орбитальные фибробласты играют важную роль в запуске аутоиммунного воспаления и инфильтрации экстраокулярных мышц и ретробульбарной клетчатки с дальнейшим развитием фиброза при ЭОП. Несмотря на достижения в изучении патогенеза данного заболевания, механизмы межклеточного взаимодействия и иммунологической регуляции функции данных клеток являются актуальными для дальнейшего исследования.

Дополнительная информация

Информация о конфликте интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Серия наблюдений и публикация настоящей статьи осуществлялись без привлечения дополнительного финансирования.

Список литературы [References]

1. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Свириденко Н.Ю., и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению эндокринной офтальмопатии при аутоиммунной патологии щитовидной железы. // Проблемы эндокринологии. – 2015. – Т. 61. – №1. – С. 61-74. [Dedov II, Melnichenko GA, Sviridenko NY, et al. Federal clinical recommendations on diagnostics and treatment of endocrine ophthalmopathy associated with autoimmune thyroid pathology. *Problems of endocrinology*. 2015;61(1):61-74. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.14341/probl201561161-74>.
2. Петунина Н.А., Трухина Л.В., Мартиросян Н.С. Эндокринная офтальмопатия: современный взгляд. // Проблемы эндокринологии. – 2013. – Т. 58. – №6. – С. 24-32. [Petunina NA, Trukhina LV, Martirosyan NS. Endocrine ophthalmopathy: state-of-the-art approaches. *Problems of endocrinology*. 2013; 58(6):24-32. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.14341/probl201258624-32>.
3. Khong JJ, McNab AA, Ebeling PR, et al. Pathogenesis of thyroid eye disease: review and update on molecular mechanisms. *Br J Ophthalmol*. 2016;100(1):142-150. doi: <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2015-307399>.
4. Bahn RS. Current insights into the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Horm Metab Res*. 2015;47(10):773-778. doi: <https://doi.org/10.1055/s-0035-1555762>.
5. Свириденко Н.Ю., Лиханцева В.Г., Беловалова И.М., и др. Антитела к рецептору ТТГ как предикторы тяжести и исходов эндокринной офтальмопатии у пациентов с болезнью Грейвса. // Проблемы эндокринологии. – 2011. – Т. 57. – №2. – С. 23-26. [Sviridenko NYu, Likhantseva VG, Belovalova IM, et al. Anti-TSH receptor antibodies as predictors of the severity and outcome of endocrine ophthalmopathy in the patients presenting with Graves' disease. *Problems of endocrinology*. 2011;57(2):23-26. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.14341/probl201157223-26>.
6. Dik WA, Virakul S, van Steensel L. Current perspectives on the role of orbital fibroblasts in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Exp Eye Res*. 2016;142:83-91. doi: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.02.007>.
7. Fernando R, Lu Y, Atkins SJ, et al. Expression of thyrotropin receptor, thyroglobulin, sodium-iodide symporter, and thyroperoxidase by fibrocytes depends on AIRE. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(7):E1236-1244. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2013-4271>.
8. Shan SJ, Douglas RS. The pathophysiology of thyroid eye disease. *J Neuroophthalmol*. 2014;34(2):177-185. doi: <https://doi.org/10.1097/WNO.0000000000000132>.
9. Banga JP, Moshkelgosh S, Berchner-Pfannschmidt U, Eckstein A. Modeling Graves' orbitopathy in experimental Graves' disease. *Horm Metab Res*. 2015;47(10):797-803. doi: <https://doi.org/10.1055/s-0035-1555956>.
10. Rapoport B, Aliesky HA, Chen CR, McLachlan SM. Evidence that TSH receptor A-subunit multimers, not monomers, drive antibody affinity maturation in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(6):E871-875. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1528>.
11. Kleinau G, Neumann S, Gruters A, et al. Novel insights on thyroid-stimulating hormone receptor signal transduction. *Endocr Rev*. 2013;34(5):691-724. doi: <https://doi.org/10.1210/er.2012-1072>.
12. Naik VM, Naik MN, Goldberg RA, et al. Immunopathogenesis of thyroid eye disease: emerging paradigms. *Surv Ophthalmol*. 2010;55(3):215-226. doi: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2009.06.009>.
13. Kotwal A, Stan M. Thyrotropin receptor antibodies – an overview. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*. 2018;34(4Suppl1):S20-S27. doi: <https://doi.org/10.1097/IOP.0000000000001052>.
14. Lin TY, Li N, Yeh MW, et al. Prognostic indicators for the development of strabismus among patients with Graves' ophthalmopathy. *J Clin Transl Endocrinol*. 2017;9:38-40. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcte.2017.06.005>.
15. Smith TJ. TSHR as a therapeutic target in Graves' disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(4):427-432. doi: <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1288215>.
16. Wang H, Zhu LS, Cheng JW, et al. CD40 ligand induces expression of vascular cell adhesion molecule 1 and E-selectin in orbital fibroblasts from patients with Graves' orbitopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015;253(4):573-582. doi: <https://doi.org/10.1007/s00417-014-2902-1>.
17. Feldon SE, Park DJ, O'Loughlin CW, et al. Autologous T-lymphocytes stimulate proliferation of orbital fibroblasts derived from patients with Graves' ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(11):3913-3921. doi: <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0605>.
18. Wang Y, Smith TJ. Current concepts in the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(3):1735-1748. doi: <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14002>.
19. Харинцев В.В., Серебрякова О.В., Серкин Д.М., и др. Роль некоторых про- и противовоспалительных цитокинов в течении эндокринной офтальмопатии. // Забайкальский медицинский вестник. – 2016. – №2. – С. 33-40. [Kharintsev VV, Serebryakova OV, Serkin DM, et al. The role of some pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the development

- of endocrine ophthalmopathy. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2016;(2):33-40. (In Russ.)]
20. Gillespie EF, Raychaudhuri N, Papageorgiou KI, et al. Interleukin-6 production in CD40-engaged fibrocytes in thyroid-associated ophthalmopathy: involvement of Akt and NF-kappaB. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(12):7746-7753. doi: <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9861>.
 21. Slowik M, Urbaniak-Kujda D, Bohdanowicz-Pawlak A, et al. CD8+CD28-lymphocytes in peripheral blood and serum concentrations of soluble interleukin 6 receptor are increased in patients with Graves' orbitopathy and correlate with disease activity. *Endocr Res*. 2012;37(2):89-95. doi: <https://doi.org/10.3109/07435800.2011.635622>.
 22. Cawood TJ, Moriarty P, O'Farrelly C, O'Shea D. The effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin1 on an in vitro model of thyroid-associated ophthalmopathy; contrasting effects on adipogenesis. *Eur J Endocrinol*. 2006;155(3):395-403. doi: <https://doi.org/10.1530/eje.1.02242>.
 23. Han R, Smith TJ. T helper type 1 and type 2 cytokines exert divergent influence on the induction of prostaglandin E2 and hyaluronan synthesis by interleukin-1beta in orbital fibroblasts: implications for the pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy. *Endocrinology*. 2006;147(1):13-19. doi: <https://doi.org/10.1210/en.2005-1018>.
 24. Antonelli A, Ferrari SM, Fallahi P, et al. Monokine induced by interferon gamma (IFNgamma) (CXCL9) and IFNgamma inducible T-cell alpha-chemoattractant (CXCL11) involvement in Graves' disease and ophthalmopathy: modulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(5):1803-1809. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2450>.
 25. Zhang J, Qiao Q, Liu M, et al. IL-17 promotes scar formation by inducing macrophage infiltration. *Am J Pathol*. 2018;188(7):1693-1702. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.04.005>.
 26. Li H, Fitchett C, Kozdon K, et al. Independent adipogenic and contractile properties of fibroblasts in Graves' orbitopathy: an in vitro model for the evaluation of treatments. *PLoS One*. 2014; 9(4):e95586. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095586>.
 27. Kozdon K, Fitchett C, Rose GE, et al. Mesenchymal stem cell-like properties of orbital fibroblasts in Graves' orbitopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(10):5743-5750. doi: <https://doi.org/10.1167/iovs.15-16580>.
 28. Shu DY, Lovicu FJ. Myofibroblast transdifferentiation: The dark force in ocular wound healing and fibrosis. *Prog Retin Eye Res*. 2017; 60:44-65. doi: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.08.001>.
 29. Aono Y, Kishi M, Yokota Y, et al. Role of platelet-derived growth factor/platelet-derived growth factor receptor axis in the trafficking of circulating fibrocytes in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;51(6):793-801. doi: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0455OC>.
 30. Douglas RS, Afifiyan NF, Hwang CJ, et al. Increased generation of fibrocytes in thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(1):430-438. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1614>.
 31. Wu T, Mester T, Gupta S, et al. Thyrotropin and CD40L stimulate interleukin-12 expression in fibrocytes: implications for pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid*. 2016;26(12):1768-1777. doi: <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0243>.
 32. Cherng S, Young J, Ma H. Alpha-smooth muscle actin (α -SMA). *J Am Sci*. 2008;4(4):7-9.
 33. Krieger CC, Gershengorn MC. A modified ELISA accurately measures secretion of high molecular weight hyaluronan (HA) by Graves' disease orbital cells. *Endocrinology*. 2014;155(2):627-634. doi: <https://doi.org/10.1210/en.2013-1890>.
 34. Bartalena L, Baldeschi L, Boboridis K, et al. The 2016 European Thyroid Association/European Group on Graves' Orbitopathy Guidelines for the Management of Graves' Orbitopathy. *Eur Thyroid J*. 2016;5(1):9-26. doi: <https://doi.org/10.1159/000443828>.
 35. Krieger CC, Neumann S, Place RF, et al. Bidirectional TSH and IGF-1 receptor cross talk mediates stimulation of hyaluronan secretion by Graves' disease immunoglobins. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(3):1071-1077. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3566>.
 36. van Steensel L, Paridaens D, van Meurs M, et al. Orbit-infiltrating mast cells, monocytes, and macrophages produce PDGF isoforms that orchestrate orbital fibroblast activation in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):E400-408. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2697>.
 37. Fanale D, Amodeo V, Caruso S. The interplay between metabolism, PPAR signaling pathway, and cancer. *PPAR Res*. 2017;2017:1830626. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/1830626>.
 38. Grygiel-Gorniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutr J*. 2014;13:17. doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>.
 39. Mazumder M, Ponnann P, Das U, et al. Investigations on binding pattern of kinase inhibitors with PPAR γ : molecular docking, molecular dynamic simulations, and free energy calculation studies. *PPAR Res*. 2017;2017:1-11. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/6397836>.
 40. Kajita K, Mori I, Kitada Y, et al. Small proliferative adipocytes: identification of proliferative cells expressing adipocyte markers [Review]. *Endocr J*. 2013;60(8):931-939. doi: <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-0141>.
 41. Насонов Е.Л., Денисов Л.Н., Станислав М.Л. Интерлейкин 17 – новая мишень для антицитокиновой терапии иммуновоспалительных ревматических заболеваний. // Прогресс в ревматологии в 21 веке. – 2013. – Т. 51. – №5. – С. 545-552. [Nasonov EL, Denisov LN, Stanislav ML. Interleukin-17 is a new target for anti-cytokine therapy of immune inflammatory rheumatic diseases. *Science-practical rheumatology*. 2013;51(5):545-552. (In Russ.)]
 42. Qu N, Xu M, Mizoguchi I, et al. Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in inflammatory diseases. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:968549. doi: <https://doi.org/10.1155/2013/968549>.
 43. Shen J, Li Z, Li W, et al. Th1, Th2, and Th17 cytokine involvement in thyroid associated ophthalmopathy. *Dis Markers*. 2015;2015:609593. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/609593>.
 44. Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, et al. Autoimmune Th17 cells induced synovial stromal and innate lymphoid cell secretion of the cytokine GM-CSF to initiate and augment autoimmune arthritis. *Immunity*. 2018;48(6):1220-1232 e1225. doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.009>.

45. Qian Y, Kang Z, Liu C, Li X. IL-17 signaling in host defense and inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol.* 2010;7(5):328-333. doi: <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.27>.
46. Huang H, Kim HJ, Chang EJ, et al. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. *Cell Death Differ.* 2009;16(10):1332-1343. doi: <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.74>.
47. Moran EM, Mullan R, McCormick J, et al. Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor-alpha, oncostatin M and response to biologic therapies. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(4):R113. doi: <https://doi.org/10.1186/ar2772>.
48. Wei H, Guan M, Qin Y, et al. Circulating levels of miR-146a and IL-17 are significantly correlated with the clinical activity of Graves' ophthalmopathy. *Endocr J.* 2014;61(11):1087-1092. doi: <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ14-0246>.
49. Kim SE, Yoon JS, Kim KH, Lee SY. Increased serum interleukin-17 in Graves' ophthalmopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012;50(10):1521-1526. doi: <https://doi.org/10.1007/s00417-012-2092-7>.
50. Fang S, Huang Y, Zhong S, et al. Regulation of orbital fibrosis and adipogenesis by pathogenic Th17 cells in Graves orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(11):4273-4283. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01349>.
51. Guo N, Woeller CF, Feldon SE, Phipps RP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit transforming growth factor-beta-induced, hyaluronan-dependent, T cell adhesion to orbital fibroblasts. *J Biol Chem.* 2011;286(21):18856-18867. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.179317>.
52. Fang S, Huang Y, Wang S, et al. IL-17A exacerbates fibrosis by promoting the proinflammatory and profibrotic function of orbital fibroblasts in TAO. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(8):2955-2965. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1882>.
53. Paulissen SM, van Hamburg JP, Davelaar N, et al. Synovial fibroblasts directly induce Th17 pathogenicity via the cyclooxygenase/prostaglandin E2 pathway, independent of IL-23. *J Immunol.* 2013;191(3):1364-1372. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300274>.
54. Pawlowski P, Reszec J, Eckstein A, et al. Markers of inflammation and fibrosis in the orbital fat/connective tissue of patients with Graves' orbitopathy: clinical implications. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:412158. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/412158>.
55. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18(7):1028-1040. doi: <https://doi.org/10.1038/nm.2807>.
56. Shin JH, Shin DW, Noh M. Interleukin-17A inhibits adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells and regulates pro-inflammatory responses in adipocytes. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(12):1835-1844. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.03.008>.
57. Pelaez-Garcia A, Barderas R, Batlle R, et al. A proteomic analysis reveals that Snail regulates the expression of the nuclear orphan receptor Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 6 (Nr2f6) and interleukin 17 (IL-17) to inhibit adipocyte differentiation. *Mol Cell Proteomics.* 2015;14(2):303-315. doi: <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.045328>.
58. Jain R, Chen Y, Kanno Y, et al. Interleukin-23-induced transcription factor Blimp-1 promotes pathogenicity of T helper 17 cells. *Immunity.* 2016;44(1):131-142. doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.11.009>.
59. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(9):585-600. doi: <https://doi.org/10.1038/nri3707>.
60. Бекетова Т.В., Александрова Е.Н., Никонова Н.О. Интерлейкин 23 у больных системными васкулитами, ассоциированными с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами: собственные результаты и обзор литературы. // Научно-практическая ревматология. – 2015. – Т. 53. – №5. – С. 493-501. [Beketova TV, Aleksandrova EN, Nikonorova NO. Interleukin-23 in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitides: the authors' results and a review of literature. *Science-practical rheumatology.* 2015;53(5):493-501. (In Russ.)]

Информация об авторах [Authors info]

*Таскина Елизавета Сергеевна [Elizaveta S. Taskina, MD]; адрес: Россия, 672000, Чита, ул. Горького, д. 39а [address: 39a Gorkiy street, 672000 Chita, Russia]; телефон: 8-924-472-6332; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6223-8888>; eLibrary SPIN: 5687-2122; e-mail: taskins@yandex.ru

Харинцева Светлана Владимировна, д.м.н., профессор [Svetlana V. Kharintseva, MD, PhD, Professor]; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8899-5465>; eLibrary SPIN: 6788-2110; e-mail: s.v.19.28@mail.ru

Как цитировать [To cite this article]

Таскина Е.С., Харинцева С.В. Морфофункциональная характеристика и иммунологическая регуляция функции орбитальных фибробластов при эндокринной офтальмопатии // Клиническая и экспериментальная тиреодология. – 2018. – Т. 14. – №4. – С. 183-191. doi: <https://doi.org/10.14341/ket10147>

Taskina ES, Kharintseva SV. Morphofunctional characteristics and immunological regulation of the orbital fibroblasts function in endocrine ophthalmopathy. *Clinical and experimental thyroidology.* 2018;14(4):183-191. doi: <https://doi.org/10.14341/ket10147>

Рукопись получена: 19.03.2019.

Рукопись одобрена: 22.03.2019.

Received: 19.03.2019.

Accepted: 22.03.2019.