

Том 23, № 2. С. 108-236

**2020**

Официальный журнал  
Российского Научного Общества Иммунологов

**РОССИЙСКИЙ  
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ  
ЖУРНАЛ**



**RUSSIAN JOURNAL  
OF IMMUNOLOGY**

Official Journal  
of Russian Society of Immunology

Volume 23  
Number 2

**2020**



## РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Расширенный поиск

ГЛАВНАЯ

О ЖУРНАЛЕ

ТЕКУЩИЙ ВЫПУСК

АРХИВЫ

ОБЪЯВЛЕНИЯ



Журнал является официальным изданием Российского научного общества иммунологов.

ISSN 1028-7221

Основан в 1996 г.

Периодичность: 4 раза в год

Главный редактор: академик РАН В.А. Черешнев

Включен в перечень изданий, рекомендованных ВАК для публикации научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата и

[Читать далее](#)

### ТЕКУЩИЙ ВЫПУСК

Том 22, № 1 (2019)

[Скачать выпуск](#) PDF

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

#### ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ ГОЛОГО ЗЕМЛЕКОПА

Е. А. Горшкова, Е. О. Губернаторова, А. Д. Медведевская, М. Ю. Высоких, С. Хольце, Т. Б. Хильдебрандт, М. С. Друцкая, С. А. Недоспасов

[PDF \(RUS\)](#)

5-12 4

[Аннотация](#)

#### TCR-МУТАЦИИ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ИММУННЫЙ СТАТУС У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ, В ОТДАЛЁННЫЕ СРОКИ

А. А. Аклеев, Е. А. Блинова, И. И. Долгушин

[PDF \(RUS\)](#)

13-23 1

[Аннотация](#)

#### ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИЙ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ УОРТИНО-ПОДОБНОГО ВАРИАНТА ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А. В. Боголюбова, А. Ю. Абросимов, Л. С. Селиванова, Н. Ю. Двинских, Д. В. Купраш, П. В. Белоусов

[PDF \(RUS\)](#)

24-30

[Аннотация](#)

#### IN SILICO АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К МИНОРНОМУ АНТИГЕНУ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ НА-2



Отправить статью

[Правила для авторов](#)

[Редакционная коллегия](#)

[Редакционный совет](#)

[Рецензирование](#)

[Этика публикаций](#)



OPEN ACCESS



We are Crossref Member



АНТИПЛАГИАТ  
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННУЮ УМОВ

### ПОПУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

#### ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ ГОЛОГО ЗЕМЛЕКОПА

Том 22, № 1 (2019)

TCR-МУТАЦИИ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ИММУННЫЙ СТАТУС У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ, В ОТДАЛЁННЫЕ СРОКИ

Том 22, № 1 (2019)

ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ФЕНОТИП И РИСК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

Том 22, № 1 (2019)

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯТЫ КАНДИДАТНОЙ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ-1 СУБТИПА А

Том 22, № 2-1 (2019)

ПРЕПАРАТЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ОНКОЛОГИИ

Том 22, № 2-1 (2019)

ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ОЗОНОТЕРАПИИ ПРИ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЕРЕЛОМАХ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

Том 22, № 2-1 (2019)

- ✓ **Электронная редакция**
- ✓ **Подача статей online**
- ✓ **Проверка рукописей на АНТИПЛАГИАТ**

- ✓ **Online-версия журнала**
- ✓ **DOI для каждой публикации**
- ✓ **Весь архив в PDF-формате**
- ✓ **Поиск статей по ключевым словам, авторам, заглавиям**

«Российский иммунологический журнал» входит в «Перечень российских рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук», а также в базу Russian Science Citation Index (RSCI), полностью интегрированную с платформой Web of Science

РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИММУНОЛОГОВ  
(РНОИ)

---

# РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

апрель-июнь

**2020, том 23**

**№. 2**

---

Основан в 1996 году

## Главный редактор

**Черешнев Валерий Александрович** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель Института иммунологии и физиологии, президент Российского Научного Общества Иммунологов, Екатеринбург, Россия

## Заместитель главного редактора

**Козлов Владимир Александрович** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

**Козлов Иван Генрихович** – доктор медицинских наук, профессор, Национальный медицинский исследовательский Центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии, Москва, Россия

## Редакционная коллегия

**Бен Мари** – доктор медицинских наук, профессор, руководитель гематологической лаборатории Клинического Центра Университета Нанта, Нант, Франция

**Бочаров Геннадий Алексеевич** – доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Института вычислительной математики РАН, Москва, Россия

**Ганковская Людмила Викторовна** – доктор медицинских наук, профессор, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, заведующая кафедрой иммунологии, Москва, Россия

**Григорова Ирина** – ассистент профессора отдела микробиологии и иммунологии, Медицинская школа, Мичиганский Университет, Эйн Арбор, США

**Кадагидзе Заира Григорьевна** – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей НИИ клинической онкологии имени академика Н.Н. Трапезникова НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина, Москва, Россия

**Караулов Александр Викторович** – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, Первый МГМУ имени И.М. Сеченова, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии, Москва, Россия

**Корнева Елена Андреевна** – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, главный научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

**Круглов Андрей Алексеевич** – руководитель лаборатории хронического воспаления, Исследовательский Ревматологический Центр Германии, Берлин, Германия

**Купраш Дмитрий Владимирович** – член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук, Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, главный научный сотрудник, МГУ имени Ломоносова, профессор кафедры иммунологии, Москва, Россия

**Лагарькова Мария Андреевна** – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор МГУ имени М.В. Ломоносова, заведующая лабораторией клеточной биологии Федерального научно-клинического Центра физико-химической медицины, Москва, Россия

**Лядова Ирина Владимировна** – доктор медицинских наук, Центральный НИИ туберкулеза, заведующая лабораторией биотехнологии отдела иммунологии, Москва, Россия

**Невинский Георгий Александрович** – профессор, доктор химических наук, заведующий лабораторией ферментов репарации Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

**Недоспасов Сергей Артурович** – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии МГУ имени М.В. Ломоносова и заведующий отделом молекулярной иммунологии в Институте физико-химической биологии имени Белозерского МГУ, Москва, Россия

**Петров Рэм Викторович** – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунологии Института биорганотической химии имени академиков М.М. Шемиякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

**Полторак Александр** – профессор, Школа биомедицинских наук имени Саклера, Университет Тафта, Бостон, США

**Продеус Андрей Петрович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой педиатрии РНИМУ имени Н.И. Пирогова, руководитель отделения иммунологии и ревматологии детей и подросткового ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва, Россия

**Руденский Александр** – Медицинский Институт Говарда Хьюза, Чеве Чейз, США

**Села Михаэль** – профессор, Институт наук Вейцмана, Реховот, Израиль

**Сенников Сергей Витальевич** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

**Симбирцев Андрей Семенович** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Сотникова Наталья Юрьевна** – доктор медицинских наук, профессор Ивановской государственной медицинской академии, заведующая научно-практическим отделением клинической иммунологии Ивановского НИИ материнства и детства, Иваново, Россия

**Стокингер Ганс** – Венский медицинский университет, Центр патофизиологии, инфекционной и иммунологии, Вена, Австрия

**Фрейдлин Ирина Соломоновна** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

**Хайтов Муса Рахимович** – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

**Хайтов Рахим Мусаевич** – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Москва), главный специалист аллерголог-иммунолог Минздрава России, президент Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов, Москва, Россия

## Ответственные секретари:

Ризопулу А.П., д.б.н. (Москва)  
Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)  
E-mail: rusimmun@gmail.com

## Редактор перевода:

Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)

## Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

Редакция журнала «Российский иммунологический журнал»

197101, Санкт-Петербург, а/я 130

Электронная версия: www.rusimmun.ru

© Российский иммунологический журнал

Журнал зарегистрирован Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций (свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №77-1125 от 04.01.2002 г.)

**Хайдуков Сергей Валерьевич** – доктор биологических наук, ФГБУН Институт биорганотической химии имени академиков М.М. Шемиякина и Ю.А. Овчинникова РАН, старший научный сотрудник; ФГБУ Российская Детская Клиническая Больница, Центральная клиническая лаборатория, Москва, Россия

**Шварц Герберт** – Школа медицины Йонг Лу Лин Национального университета Сингапура

## Редакционный совет

**Арион Виталий Яковлевич** – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии и биохимии Федерального научно-клинического Центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

**Балмасова Ирина Петровна** – доктор медицинских наук, профессор, Российский университет дружбы народов, кафедра аллергологии и иммунологии ФПК; Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, заведующая лабораторией патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний, Москва, Россия

**Гариб Фируз Юсупович** – доктор медицинских наук, профессор, Российская медицинская академия последипломного образования, кафедра иммунологии; Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра иммунологии; Первый МГМУ имени С.М. Сеченова, кафедра клинической иммунологии и аллергологии, Москва, Россия

**Глушков Андрей Николаевич** – доктор медицинских наук, профессор, директор Института экологии человека Федерального исследовательского Центра угля и углехимии СО РАН, Кемерово, Россия

**Гущин Игорь Сергеевич** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, академик РАЕН, заведующий отделом № 80 клинической иммунологии и аллергологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

**Детгарева Марина Васильевна** – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой неонатологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

**Зурочка Александр Владимирович** – доктор медицинских наук, профессор, Институт иммунологии и физиологии УРО РАН, лаборатория иммунологии воспаления, ведущий научный сотрудник, Челябинск, Россия

**Карамов Эдуард Владимирович** – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией иммунохимии ФИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

**Колесникова Наталья Владиславовна** – доктор биологических наук, профессор, Кубанский государственный медицинский университет, кафедра клинической иммунологии и аллергологии, Краснодар, Россия

**Нестерова Ирина Вадимовна** – доктор медицинских наук, профессор, Российский университет дружбы народов, кафедра аллергологии и иммунологии ФПК; Институт иммунофизиологии, Москва, Россия

**Раев Михаил Борисович** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов УРО РАН, Пермь, Россия

**Румянцев Александр Григорьевич** – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, президент Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

**Свитич Оксана Анатольевна** – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, директор НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия

**Спешиашвили Реваз Исмаилович** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, академик Академии наук Грузии, заведующий кафедрой аллергологии и иммунологии Российского университета дружбы народов, директор Института иммунофизиологии, Москва, Россия

**Сизякина Людмила Петровна** – доктор медицинских наук, профессор, директор НИИ клинической иммунологии Ростовского государственного медицинского университета Минздрава России, заведующая кафедрой клинической иммунологии и аллергологии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов Ростовского государственного медицинского университета, Ростов-на-Дону, Россия

**Топтыгина Анна Павловна** – доктор медицинских наук, НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Н. Габричевского Роспотребнадзора, заведующая лабораторией цитокинов, ведущий научный сотрудник, Москва, Россия

**Тузанкина Ирина Александровна** – доктор медицинских наук, профессор, Институт иммунологии и физиологии УРО РАН, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления, главный детский иммунолог-аллерголог Минздрава Свердловской области, руководитель регионального Центра клинической иммунологии, Екатеринбург, Россия

**Тутельян Алексей Викторович** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией госпитальных инфекций и эпидемиологического анализа, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Федосова Татьяна Германовна** – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

**Чекнёв Сергей Борисович** – доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий, Москва, Россия

**Черешнева Маргарита Владимировна** – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник Института иммунологии и физиологии УРО РАН, Екатеринбург, Россия

**Ширинский Валерий Степанович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией клинической иммунофармакологии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

**Шмагель Константин Владимирович** – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов, профессор кафедры иммунологии Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

## Издательство «Человек»

199004, Россия, Санкт-Петербург, Малый пр. В.О., 26, оф. 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 14.09.2020 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 16. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.)

Заказ № 182

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

199178, Санкт-Петербург, 8-я линия В.О., 83, корп. 1, Литер А

Тел.: (812) 950-10-99.

**«Российский иммунологический журнал» входит в «Перечень российских рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук», а также в базу Russian Science Citation Index (RSCI), полностью интегрированную с платформой Web of Science**

RUSSIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY  
(RSI)

---

**RUSSIAN  
JOURNAL OF IMMUNOLOGY**

**ROSSIYSKIY  
IMMUNOLOGICHESKIY  
ZHURNAL**

April-June

**2020, volume 23**

**No. 2**

---

Published since 1996

## Editor-in-chief

**Valery A. Chereshev** – PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology and Physiology, Scientific Adviser, Yekaterinburg, Russian Federation, President of Russian Immunology Society Deputy editor-in-chief

## Deputy Editor-in-Chief

**Vladimir A. Kozlov** – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Scientific Adviser, Novosibirsk, Russian Federation

**Ivan G. Kozlov** – PhD, MD (Medicine), Professor, Chief, Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

## Editorial board

**Marie C. Bene** – Professor, Chief of Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France

**Gennady A. Bocharov** – Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Leading Researcher, Marchuk Institute of Numerical Mathematics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Irina S. Freidlin** – PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Institute of Experimental Medicine, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

**Ludmila V. Gankovskaya** – MD, PhD, Prof., Head of the Immunology Department, Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russian Federation

**Irina Grigороva** – PhD, Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, United States

**Zaira G. Kadagidze** – MD, PhD, Prof., Head of the Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

**Alexander V. Karaulov** – MD, PhD, Prof., Full Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

**Sergei V. Khaidukov** – Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Musa R. Khaïtov** – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, State Scientific Center "Institute of Immunology", FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

**Rakhim M. Khaïtov** – State Research Center Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation, PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology, Scientific Adviser, Moscow, Russian Federation

**Elena A. Korneva** – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Experimental Medicine, Department of Pathology and Pathophysiology, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

**Andrey A. Kruglov** – PhD, Chief, Laboratory of Chronic inflammation, German Rheumatism Research Centre (DRFZ), Berlin, Germany

**Dmitry V. Kuprash** – PhD, Professor, RAS Corresponding Member, Department of Immunology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

**Mariya A. Lagarkova** – PhD, Professor of Lomonosov Moscow State University, RAS Corresponding Member, Chief, Laboratory of Cellular Biology, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

**Irina V. Lyadova** – PhD, MD, Professor, Central Institute of Tuberculosis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

**Sergei A. Nedospasov** – PhD, Professor, RAS full member, Lomonosov State University, Department of Immunology, chief, Institute of Physico-Chemical Biology, Belozersky, Department of Molecular Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

**Georgiy A. Nevinsky** – Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

**Rem V. Petrov** – State Research Center Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation

**Alexander Poltorak** – Professor, Graduate Program in Immunology, Tufts University Sackler School of Biomedical Sciences, Boston, USA, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russian Federation

**Andrey P. Prodeus** – PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department of Immunology and Rheumatology, National Scientific-Practical Center of Pediatric Hematology, Moscow, Russian Federation

**Alexander Rudensky** – Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, United States

**Michael Sela** – Professor, Weizmann Institute of Science Israel, Rehovot, Israel

**Serguei V. Sennikov** – Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Herbert Schwarz** – Yong Loo Lin School of Medicine, Singapore City, Singapore

**Andrey S. Simbirsev** – PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

**Nataliya Yu. Sotnikova** – MD, PhD, Prof., Ivanovo State Medical Academy, Head of the Department of Scientific and Practical Clinical Immunology, Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood (Ivanovo, Russia), Russian Federation

## Managing Editors:

Anna Rizopulu, PhD (Biology) (Moscow)

Natalia Rakitianskaia, (St. Petersburg)

E-mail: rusimmun@gmail.com

## Translation editor:

Dmitrii V. Isakov, PhD (Medicine) (St. Petersburg)

## Online version editorial manager:

Vera S. Erofeeva (St. Petersburg)

**Editorial Office: phone/fax (812) 233-08-58**

**Address for correspondence:**

Editorial Office of the "Russian Journal of Immunology"  
197101, St.Petersburg, post box 130

**Electronic version:** www.rusimmun.ru

© Russian Journal of Immunology

Journal registered with the Ministry of the Russian Federation for Press, Broadcasting and Mass Media (certificate of registration of mass media PI No. 77-11525 of January 4, 2002)

**Hannes Stockinger** – Medizinische Universität Wien, Zentrum für Pathophysiologie, Infektiologie und Immunologie, Vienna, Austria

## Editorial Council

**Vitaliy Ya. Arion** – MD, PhD, Professor, Head Researcher, Laboratory of Molecular Immunology and Biochemistry, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

**Irina P. Balmasova** – MD, PhD, Professor, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

**Sergey B. Cheknyov** – PhD, MD (Medicine), N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Cellular Interactions, Moscow, Russian Federation

**Margarita V. Cheresheva** – Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

**Tatiana G. Fedoskova** – PhD, MD (Medicine), Professor, State Research Center Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation

**Firuz Yu. Garib** – MD, PhD, Professor, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

**Andrey N. Glushkov** – MD, PhD, Professor, Director of Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of SB RAS, Kemerovo, Russian Federation

**Igor S. Gushchin** – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Natural Sciences, Head of the Department of Clinical Immunology and Allergology №60, State Scientific Center "Institute of Immunology", FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

**Marina V. Degtyareva** – MD, PhD, Professor, Department of Neonatology, chief, Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russian Federation

**Edward V. Karamov** – PhD, Professor, Head of the Laboratory of Immunochemistry, N. F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

**Natalya V. Kolesnikova** – PhD, Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Kuban State Medical Academy, Krasnodar, Russian Federation

**Irina V. Nesterova** – MD, PhD, Professor, Department of Allergology and Immunology, RUDN University, Moscow, Russian Federation

**Mikhail B. Rayev** – PhD, Professor, Leading Researcher, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russian Federation

**Alexander G. Rumyantsev** – PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, President of National Scientific-Practical Center of Pediatric Hematology, Moscow, Russian Federation

**Revaz I. Sepiashvili** – MD, PhD, Prof., Academician of the Georgian National Academy of Sciences, Head of the Department of Allergology and Immunology, Peoples' Friendship University of Russia, Head of the Institute of Immunophysiology (Moscow, Russia) Russian Federation

**Ludmila P. Sizyagina** – MD, PhD, Professor, Head of the Institute of Clinical Immunology, Rostov State Medical University, Head of the Department of Clinical Immunology and Allergology, Faculty of Postgraduate Professional Training of Physicians, Rostov State Medical University (Rostov-on-Don, Russia) Russian Federation

**Valeriy S. Shirinskii** – PhD, MD (Medicine), Professor, Chief, Laboratory of Clinical Pharmacology, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Konstantin V. Shmegal** – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Professor, Department of Immunology, Perm State Medical University named after Academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation

**Oksana A. Svitich** – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera RAMS, Moscow, Russian Federation

**Anna P. Toptygina** – MD, PhD, Professor, Chief, Laboratory of Cytokines, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

**Aleksey V. Tutelyan** – PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Chief, Laboratory for Hospital Infections and Epidemiological Analysis, Central Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

**Irina A. Tuzankina** – MD, PhD, Prof., General Secretary of the Russian Society of Immunologists and Ural Society of Immunologists, Allergists and Immunorehabilitologists, Chief Researcher, Laboratory of Inflammation Immunology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Head of the Regional Center for Clinical Immunology, Children Regional Hospital, Chief Immunologist of the Sverdlovsk Region and Ural Federal District, Yekaterinburg, Russian Federation

**Alexander V. Zurochka** – MD, PhD, Professor, Leading Researcher, Laboratory of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Chelyabinsk Russian Federation

Chelovek Publishing House

199004, Russian Federation, St. Petersburg, Malyi ave., Vasilevsky Island, 26, office 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

Phone/fax: (812) 325-25-64.

Passed for printing 14.09.2020. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing. Printed sheets 16. Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

199178, Russian Federation, St. Petersburg, 8 line of Vasilevsky Island, 83/1-A

Phone: (812) 950-10-99

*According to the decision of the Higher Attestation Commission of the Ministry of Education of Russia, the Russian Journal of Immunology has been regularly included in the "List of periodical scientific and scientific-technical publications published in the Russian Federation, in which publication of the main results of dissertations for the degree of Doctor of Science is recommended" and included in Russian Science Citation Index (RSCI) database fully integrated with the Web of Science platform*

## СОДЕРЖАНИЕ

### Краткие сообщения

Власова В.В., Шмагель Н.Г. СОДЕРЖАНИЕ PGC-1 $\alpha$ В РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЯХ CD4 <sup>+</sup> T-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА .....	115
Гейн С.В., Кадочникова Я.А. ВЛИЯНИЕ ЭНДОМОРФИНА-1 НА ФУНКЦИИ ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА <i>IN VITRO</i> .....	119
Забокрицкий Н.А. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ГЕЛЕВОГО МЕТАБИОТИКА НА ФАКТОРЫ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГОВ КОЖИ.....	125
Кулакова А.С., Снимщикова И.А., Плотникова М.О. РОЛЬ МОРФОГЕННЫХ БЕЛКОВ WNT-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ (СКЛЕРОСТИНА И $\beta$ -КАТЕНИНА) В АДИПОГЕНЕЗЕ .....	133
Михайлова И.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Чайникова И.Н., Кузьмичева Н.А., Филиппова Ю.В. ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ФЛАВОНОИДЫ, НА МОДЕЛИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА.....	139
Поздина В.А., Данилова И.Г., Абидов М.Т. ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ И МАКРОФАГОВ СЕЛЕЗЕНКИ ЖИВОТНЫХ С МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА И ИХ КОРРЕКЦИЯ АМИНОДИГИДРОФТАЛАЗИНДИОНОМ НАТРИЯ <i>IN VITRO</i> .....	145
Сарычева Ю.А., Токарева А.А., Штиль А.А., Колыванова М.А., Морозов В.Н., Панфилова Т.В., Фролов Б.А. ОЦЕНКА АНТИМУТАГЕННОГО ЭФФЕКТА ТРИТЕРПЕНОИДА МИЛИАЦИНА У МЫШЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ .....	153
Тимганова В.П., Бочкова М.С., Ужвиюк С.В., Шардина К.Ю., Заморина С.А., Раев М.Б. ПОЛУЧЕНИЕ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ <i>IN VITRO</i> .....	157
Файзуллина А.И., Зурочка А.В. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩИХ ШТАММОВ <i>STARNYLOCOCCLUS AUREUS</i> , ИМЕЮЩИХ И НЕ ИМЕЮЩИХ ГЕН БЕЛКА A, ПРИ ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ .....	163
Фомина Л.О., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Гриценко В.А. ОЦЕНКА НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ <i>STARNYLOCOCCLUS AUREUS</i> , ПРОДУЦИРУЮЩИХ И НЕ ПРОДУЦИРУЮЩИХ ЦИТОКИНОПОДОБНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ПРИ ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ .....	169
Южанинова С.В., Гилёва С.Г. ВЛИЯНИЕ БЕТА-ЭНДОРФИНА И ДИНОРФИНА A НА АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i> .....	175
Батурина И.Л., Логинова Ю.В., Емельянов И.В., Никушкина К.В., Зотова М.А., Никонова Т.И. АНАЛИЗ T- И B-КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ.....	181
Бедулева Л.В., Сидоров А.Ю., Абишева Н.Н., Гильманова Л.У., Горбушина А.Н. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТДЕЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА С ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ .....	187
Беляева С.В. АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА <i>IL6</i> У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ С РАЗНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ .....	191
Виноградов А.В., Резайкин А.В., Литвинова Д.В., Лобода А.Н., Сазонов С.В., Сергеев А.Г. ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ ГЕНА <i>TR53</i> ПРИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ ВЗРОСЛЫХ.....	195
Дианова Д.Г., Долгих О.В., Алексеев В.Б. ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ У ЛИЦ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ В КРОВИ ВАНАДИЯ .....	203
Долгих О.В., Дианова Д.Г. ОСОБЕННОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К ГАПТЕНАМ И ИММУННЫЙ СТАТУС У ОБУЧАЮЩИХСЯ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП .....	209
Емелина Ю.Н. ХАРАКТЕРИСТИКА СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К ИНГАЛЯЦИОННЫМ И ПИЩЕВЫМ АЛЛЕРГЕНАМ У ДЕТЕЙ.....	217
Кодинцева Е.А., Аклеев А.А. КОРРЕЛЯЦИИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АДАПТИВНОГО И ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ХРОНИЧЕСКИ ОБЛУЧЕННЫХ ЛЮДЕЙ В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ .....	225
Юбилей .....	231
Правила для авторов .....	233
Авторский указатель .....	236
Предметный указатель .....	236

## CONTENTS

### Short communications

<i>Vlasova V.V., Shmagel N.G.</i> <b>PGC-1<math>\alpha</math> IN HUMAN CD4<sup>+</sup>T CELL SUBSETS</b> .....	115
<i>Gein S.V., Kadochnikova Ya.A.</i> <b>ENDOMORPHIN-1 AFFECTING INNATE IMMUNE CELLS <i>IN VITRO</i></b> .....	119
<i>Zabokritskiy N.A.</i> <b>PHARMACOLOGICAL ASSESSMENT OF IMMUNOTROPIC ACTIVITY OF NEW GEL METABIOTIC ON CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN EXPERIMENTALLY MODELED THERMAL SKIN BURNS</b> .....	125
<i>Kulakova A.S., Snimshchikova I.A., Plotnikova M.O.</i> <b>ROLE OF WNT SIGNALING MORPHOGENIC PROTEINS (SCLEROSTIN AND <math>\beta</math>-CATENIN) IN ADIPOGENESIS</b> .....	133
<i>Mikhailova I.V., Perunova N.B., Ivanova E.V., Chaynikova I.N., Filippova Yu.V., Kuzmicheva N.A.</i> <b>IMMUNOREGULATORY EFFECTS OF FLAVONOID-CONTAINING MEDICINAL HERBS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS</b> .....	139
<i>Pozdina V.A., Danilova I.G., Abidov M.T.</i> <b>IMMUNOPHENOTYPICAL ASPECTS OF LUNG AND SPLEEN MACROPHAGES DERIVED ANIMALS WITH THE MODEL OF ALLOXAN DIABETES (TYPE I) AND THEIR CORRECTION BY SODIUM AMINODIGYDROPTALAZINDIONE <i>IN VITRO</i></b> .....	145
<i>Sarycheva Yu.A., Tokareva A.A., Shtil A.A., Kolyvanova M.A., Morozov V.N., Panfilova T.V., Frolov B.A.</i> <b>EVALUATION OF TRITERPENOID MILIACIN-RELATED ANTIMUTAGENIC EFFECT IN MICE EXPOSED TO IONISING RADIATION</b> .....	153
<i>Timganova V.P., Bochkova M.S., Uzhviyuk S.V., Shardina K.Yu., Zamorina S.A., Rayev M.B.</i> <b>GENERATION OF HUMAN MYELOID SUPPRESSOR CELLS IN THE <i>IN VITRO</i> EXPERIMENTAL MODEL</b> .....	157
<i>Fayzullina A.I., Zurochka A.V.</i> <b>ELISA-BASED COMPARATIVE ANALYSIS OF NON-SPECIFIC ACTIVITY FOR CYTOKINE-PRODUCING PROTEIN A GENEPOSITIVE AND NEGATIVE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> STRAINS</b> .....	163
<i>Fomina L.O., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A.</i> <b>NON-SPECIFIC ACTIVITY OF <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> STRAINS PRODUCING AND NOT PRODUCING CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES ASSESSED BY IMMUNO-ENZYME ANALYSIS</b> .....	169
<i>Yuzhaninova S.V., Gileva S.G.</i> <b>EFFECTS OF BETA-ENDORPHIN AND DYNORPHIN A ON <i>IN VITRO</i> APOPTOSIS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES</b> .....	175
<i>Baturina I.L., Loginova Yu.V., Nikushkina K.V., Emelyanov I.V., Zotova M.A., Nikonova T.I.</i> <b>EVALUATING T AND B CELL LINEAGE DIFFERENTIATION STAGE AND RELATED PROGNOSTIC IMPACT IN MISCARRIAGE</b> .....	181
<i>Beduleva L.M., Sidorov A.Yu., Abisheva N.N., Gilmanova L.U., Gorbushina A.N.</i> <b>DETECTION OF IMMUNOREGULATORY RHEUMATOID FACTOR</b> .....	187
<i>Belyaeva S.V.</i> <b>ANALYZING <i>IL6</i> GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH VARIOUS CLINICAL FORMS OF PULMONARY TUBERCULOSIS</b> .....	191
<i>Vinogradov A.V., Rezyaykin A.V., Litvinova D.V., Loboda A.N., Sazonov S.V., Sergeev A.G.</i> <b>PATHOGENETIC VALUE OF <i>TP53</i> POINT MUTATIONS IN ADULT ACUTE MYELOID LEUKEMIA PATIENTS</b> .....	195
<i>Dianova D.G., Dolgikh O.V., Alekseev V.B.</i> <b>EXPERIENCE OF APPLYING FLOW CYTOMETRY TO ASSESS IMMUNOLOGIC REACTIVITY IN SUBJECTS WITH INCREASED BLOOD VANADIUM CONCENTRATION</b> .....	203
<i>Dolgikh O.V., Dianova D.G.</i> <b>FEATURES OF HAPTEN SPECIFIC SENSITIZATION AND IMMUNE STATUS IN DIFFERENT STUDENT AGE GROUPS</b> .....	209
<i>Emelina Yu.N.</i> <b>SENSITIZATION TO INHALED AND FOOD ALLERGENS IN CHILDREN</b> .....	217
<i>Kodintseva E.A., Akleyev A.A.</i> <b>DELAYED CORRELATED PARAMETERS OF ADAPTIVE AND INNATE IMMUNITY IN CHRONICALLY IRRADIATED SUBJECTS</b> .....	225
<b>Anniversary</b> .....	231
<b>Instructions to Authors</b> .....	233
<b>Author index</b> .....	236
<b>Subject index</b> .....	236

## СОДЕРЖАНИЕ PGC-1 $\alpha$ В РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЯХ CD4<sup>+</sup>T-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Власова В.В., Шмагель Н.Г.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия*

**Резюме.** Популяция CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов является гетерогенной и объединяет клетки с различными функциями. На функциональную активность отдельных субпопуляций CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов значительное влияние оказывает регуляция энергетического метаболизма клетки. В наивных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах, CD4<sup>+</sup>T-клетках центральной и эффекторной памяти, а также CD4<sup>+</sup> терминальных эффекторах здоровых людей методом проточной цитофлуориметрии проведена оценка содержания транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$  – регулятора окислительного фосфорилирования в клетке. Установлено, что PGC-1 $\alpha$  экспрессируется во всех CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах. Как среди конвенциональных, так и среди регуляторных клеток было обнаружено повышенное содержание PGC-1 $\alpha$  в субпопуляциях CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов центральной памяти, эффекторной памяти и терминальных эффекторах при их сравнении с наивными клетками. При этом содержание транскрипционного коактиватора в конвенциональных CD4<sup>+</sup>T-клетках оказалось выше, чем в регуляторных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что конвенциональные и регуляторные CD4<sup>+</sup>T-клетки в разной степени зависят от присутствия транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$ . По-видимому, PGC-1 $\alpha$  является важным, но не единственным регулятором функционального состояния митохондрий регуляторных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов.

*Ключевые слова:* регуляторные CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты, PGC-1 $\alpha$ , конвенциональные CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты, CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты памяти, проточная цитометрия

## PGC-1 $\alpha$ IN HUMAN CD4<sup>+</sup>T CELL SUBSETS

Vlasova V.V., Shmagel N.G.

*Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

**Abstract.** CD4<sup>+</sup>T lymphocyte pool is heterogeneous in nature consisting of distinct subsets. The functional activity of each subset is highly influenced by how its energy metabolism is controlled. In naïve, central memory, effector memory, and TEMRA CD4<sup>+</sup>T cells received from healthy volunteers aged 29–42 years we evaluated the level of the major cell energy metabolism regulator: transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$ . PGC-1 $\alpha$  was shown to be expressed in all CD4<sup>+</sup>T cells. Its level in central memory, effector memory, and TEMRA cells was higher than that in naïve cells for both conventional and regulatory CD4<sup>+</sup>T lymphocytes. Moreover, its level was found to be higher in conventional when compared with regulatory CD4<sup>+</sup>T cells. Our findings suggest that regulatory

### Адрес для переписки:

Власова Виолетта Викторовна  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения Российской академии наук  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (324) 280-92-11.  
E-mail: violetbaudelaire73@gmail.com

### Address for correspondence:

Vlasova Violetta V.  
Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Ural  
Branch, Russian Academy of Sciences  
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.  
Phone: 7 (324) 280-92-11.  
E-mail: violetbaudelaire73@gmail.com

### Образец цитирования:

В.В. Власова, Н.Г. Шмагель «Содержание PGC-1 $\alpha$  в различных субпопуляциях CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов человека» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 115–118.  
doi: 10.46235/1028-7221-348-PIH  
© Власова В.В., Шмагель Н.Г., 2020

### For citation:

V.V. Vlasova, N.G. Shmagel “PGC-1 $\alpha$  in human CD4<sup>+</sup>T cell subsets”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 115–118.  
doi: 10.46235/1028-7221-348-PIH  
DOI: 10.46235/1028-7221-348-PIH

and conventional CD4<sup>+</sup>T cells rely on PGC-1 $\alpha$  to a different extent. Apparently, PGC-1 $\alpha$  is an important but not the only factor influencing the functional state of mitochondria in regulatory CD4<sup>+</sup>T lymphocytes.

*Keywords: regulatory CD4<sup>+</sup>T cells, PGC-1 $\alpha$ , conventional CD4<sup>+</sup>T cells, memory CD4<sup>+</sup>T cells, flow cytometry*

Работа выполнена в рамках государственного задания «Механизмы регуляции иммунной системы» (номер государственной регистрации темы АААА-А19-119112290007-7) с использованием оборудования ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

## Введение

T-лимфоциты, экспрессирующие коактивационную молекулу CD4, представляют собой гетерогенную популяцию, в которую входят наивные лимфоциты, клетки центральной и эффекторной памяти, а также терминально-дифференцированные клетки [6]. Кроме того, в каждой субпопуляции можно выделить конвенциональные и регуляторные CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты [9]. Известно, что функциональная активность отдельных субпопуляций CD4<sup>+</sup>T-клеток определяется особенностями их метаболического профиля. Так, в покое все CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты получают энергию преимущественно путем окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий. Однако CD4<sup>+</sup>T-клетки памяти и наивные клетки имеют неодинаковые энергетические запросы и, соответственно, разную активность электрон-транспортной цепи [1]. Для поддержания разнообразных функций CD4<sup>+</sup>T-клеток необходим строгий контроль окислительного фосфорилирования посредством транскрипционной и посттранскрипционной регуляции.

Одним из ключевых факторов, регулирующих синтез АТФ в дыхательной цепи митохондрий, является транскрипционный коактиватор PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1-alpha – коактиватор-1-альфа гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом) [2]. К его функциям относятся биогенез митохондрий [12], регуляция транспорта жирных кислот и глюкозы [3] и контроль экспрессии генов, кодирующих компоненты электрон-транспортной цепи, а также ферменты цикла трикарбоновых кислот и  $\beta$ -окисления жирных кислот [7, 11, 12]. **Целью данного исследования** являлось определение содержания транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$  в различных субпопуляциях регуляторных и конвенциональных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов здоровых людей.

## Материалы и методы

План исследования был утвержден этическим комитетом (рег. № IRB00008964). Каждый

обследованный предоставил письменное информированное согласие на участие в исследовании. В периферической крови относительно здоровых добровольцев (n = 23) в возрасте 29-42 лет определяли содержание регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>T-лимфоцитов и конвенциональных (FoxP3<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup>T-клеток. Анализировали их субпопуляционный состав: наивные (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), центральной памяти (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), эффекторной памяти (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>), терминально-дифференцированные (TEMRA; CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>). Содержание PGC-1 $\alpha$  определяли с использованием анти-PGC-1 $\alpha$  антител.

В выборке рассчитывали медиану, интерквартильный размах (25-75 перцентиль) и 10-90%-ные интервалы. Значимость различий между группами устанавливали с помощью U-критерия Манна–Уитни и W-критерия Вилкоксона. Статистические расчеты и построение графиков осуществляли с использованием программного обеспечения Statistica 6.0.

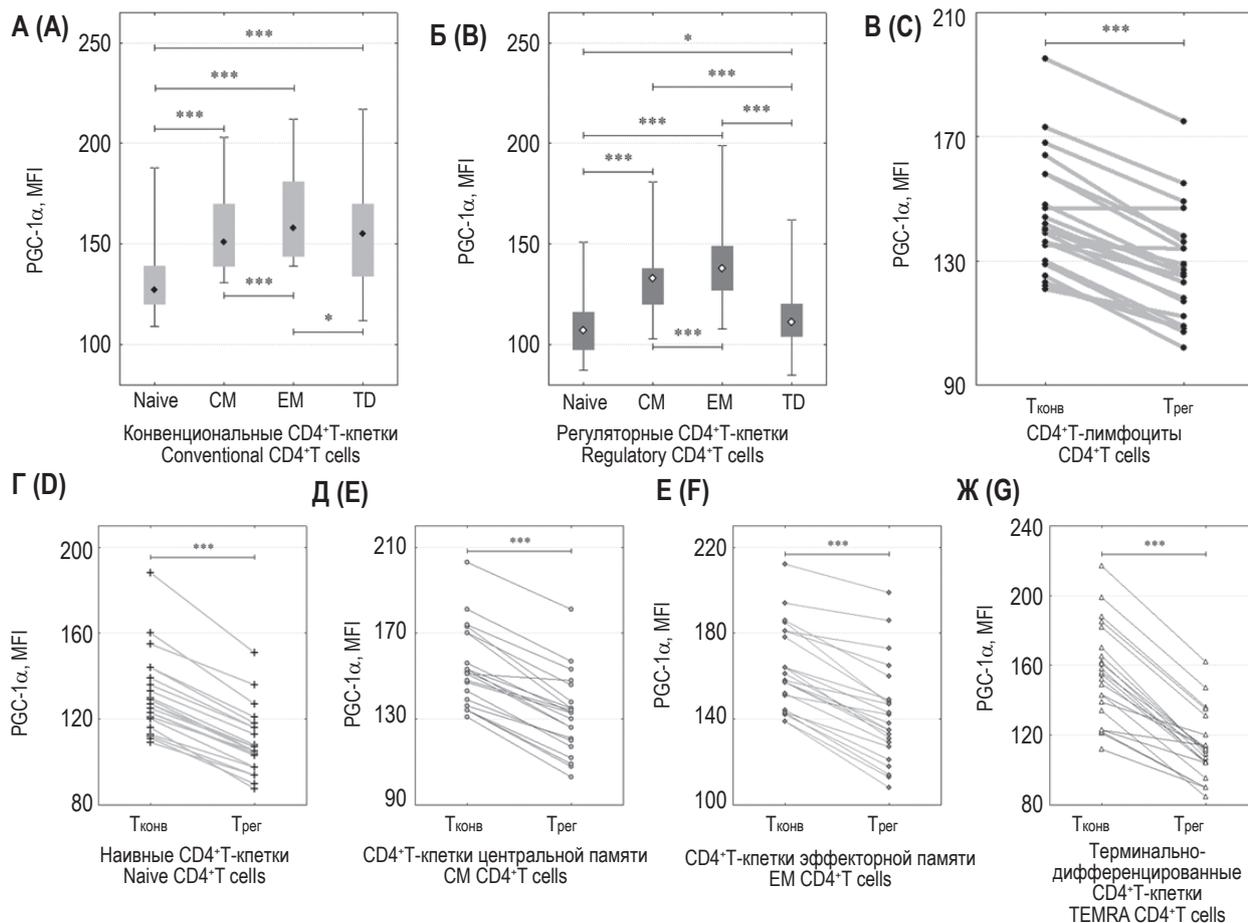
## Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что конвенциональные CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты содержат больше транскрипционного коактиватора, чем регуляторные T-клетки (p < 0,001). Кроме того, в каждой субпопуляции CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов количество PGC-1 $\alpha$  было выше в конвенциональных T-клетках, чем в регуляторных T-лимфоцитах того же донора (p < 0,001; рис. 1В-Ж).

Важно отметить, что CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты различной степени дифференцировки также отличаются по экспрессии PGC-1 $\alpha$ . Как среди конвенциональных, так и среди регуляторных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов наименьшее содержание PGC-1 $\alpha$  было отмечено в пуле наивных T-клеток, а максимальное – в пуле клеток эффекторной памяти (рис. 1А, Б). Среди регуляторных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов клетки центральной памяти, при их сравнении с терминально-дифференцированными T-клетками, характеризовались более высоким уровнем экспрессии PGC-1 $\alpha$  (p < 0,001; рис. 1Б).

В пуле конвенциональных T-лимфоцитов отличий между этими двумя субпопуляциями обнаружено не было.

Повышенное содержание PGC-1 $\alpha$  в субпопуляциях CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов памяти объясняет обнаруженные ранее различия между морфо-



**Рисунок 1. Уровень PGC-1 $\alpha$  в конвенциональных (T<sub>conv</sub>) и регуляторных (T<sub>reg</sub>) клетках различных субпопуляций CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов**

Примечание. А, Б – содержание PGC-1 $\alpha$  в наивных Т-клетках (naïve), клетках центральной памяти (CM), клетках эффекторной памяти (EM), терминально-дифференцированных Т-лимфоцитах (TD). Представлены медианы (точки внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90%-ные интервалы (вертикальные отрезки); \* – p < 0,05; \*\*\* – p < 0,001 (U-критерий Манна–Уитни). В, Г, Д, Е, Ж – количество PGC-1 $\alpha$  в конвенциональных и регуляторных CD4<sup>+</sup>T-клетках на разных стадиях дифференцировки; линии соединяют показатели одного донора; \*\*\* – p < 0,001 (W-критерий Вилкоксона). MFI: Median Fluorescence Intensity (англ.) – средняя яркость флуоресценции.

Figure 1. PGC-1 $\alpha$  levels in different subsets of conventional (T<sub>conv</sub>) and regulatory (T<sub>reg</sub>) CD4<sup>+</sup>T cells

Note. A, B, PGC-1 $\alpha$  levels in naïve, central memory (CM), effector memory (EM) and TEMRA cells. Medians (dots inside of bars), interquartile ranges (bars) and 10-90% intervals (whiskers) are shown; \*, p < 0,05; \*\*\*, p < 0,001 (Mann–Whitney U test). C, D, E, F, G, PGC-1 $\alpha$  levels in conventional and regulatory CD4<sup>+</sup>T cells of different subsets; the lines are connecting the values of one donor, \*\*\* – p < 0,001 (Wilcoxon signed-rank test). MFI: Median Fluorescence Intensity.

функциональными показателями митохондрий в разных субпопуляциях CD4<sup>+</sup>T-клеток [1]. Авторы продемонстрировали, что для CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов памяти, при их сравнении с наивными клетками, характерны удлиненная и разветвленная форма митохондрий, усиленная экспрессия компонентов дыхательной цепи и, как следствие, активный синтез АТФ путем окислительного фосфорилирования. Однако регуляторные CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты также обладают повышенной относительно конвенциональных клеток активностью электрон-транспортной цепи. Кроме того, регуляторные CD4<sup>+</sup>T-клетки

в меньшей степени зависят от гликолиза и преимущественно используют энергию  $\beta$ -окисления жирных кислот в митохондриях для синтеза АТФ [8]. При этом полученные нами данные свидетельствуют о том, что уровень PGC-1 $\alpha$  в регуляторных клетках значительно ниже, чем в конвенциональных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах. Причиной несоответствия между усиленным окислительным фосфорилированием и относительно низким содержанием PGC-1 $\alpha$  в регуляторных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах может служить следующее. Помимо PGC-1 $\alpha$ , на активность дыхательной цепи митохондрий в регуляторных CD4<sup>+</sup>T-

клетках могут оказывать влияние другие факторы. Так, белок FoxP3 (forkhead box P3) индуцирует экспрессию генов, кодирующих комплексы I, II и III дыхательной цепи митохондрий, в регуляторных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах [5]. Кроме того, на интенсивность окислительного фосфорилирования и количество клеточного АТФ в регуля-

торных клетках прямо влияет содержание киназы LKB1 (liver kinase B1) [4]. Таким образом, транскрипционный коактиватор PGC-1 $\alpha$ , несмотря на важную роль в контроле митохондриального пути синтеза АТФ, не является единственным фактором, стимулирующим окислительное фосфорилирование в регуляторных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах.

## Список литературы / References

1. Dimeloe S., Mehling M., Frick C., Loeliger J., Bantug G.R., Sauder U., Fischer M., Belle R., Develioglu L., Tay S., Langenkamp A., Hess C. The Immune-metabolic basis of effector memory CD4<sup>+</sup> T cell function under hypoxic conditions. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 1, pp. 106-114.
2. Feige J.N., Auwerx J. Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol.*, 2007, Vol. 17, no. 6, pp. 292-301.
3. Handschin C., Spiegelman B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr. Rev.*, 2006, Vol. 27, no. 7, pp. 728-735.
4. He N., Fan W., Henriquez B., Yu R.T., Atkins A.R., Liddle C., Zheng Y., Downes M., Evans R.M. Metabolic control of regulatory T cell (Treg) survival and function by Lkb1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, Vol. 114, no. 47, pp. 12542-12547.
5. Howie D., Cobbold S.P., Adams E., Ten Bokum A., Necula A.S., Zhang W., Huang H., Roberts D.J., Thomas B., Hester S.S., Vaux D.J., Betz A.G., Waldmann H. FOXP3 drives oxidative phosphorylation and protection from lipotoxicity. *JCI insight*, 2017, Vol. 2, no. 3, e89160. doi: 10.1172/jci.insight.89160.
6. Jameson S.C., Masopust D. Understanding subset diversity in T cell memory. *Immunity*, 2018, Vol. 48, no. 2, pp. 214-226.
7. Lehman J.J., Barger P.M., Kovacs A., Saffitz J.E., Medeiros D.M., Kelly D.P. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Clin. Invest.*, 2000, Vol. 106, no. 7, pp. 847-856.
8. Michalek R.D., Gerriets V.A., Jacobs S.R., Macintyre A.N., MacIver N.J., Mason E.F., Sullivan S.A., Nichols A.G., Rathmell J.C. Cutting edge: Distinct Glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4<sup>+</sup>T cell subsets. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 6, pp. 3299-3303.
9. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*, 1995, Vol. 155, no. 3, pp. 1151-1164.
10. Sena L.A., Li S., Jairaman A., Prakriya M., Ezponda T., Hildeman D.A., Wang C.-R., Schumacker P.T., Licht J.D., Perlman H., Bryce P.J., Chandel N.S. Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 2, pp. 225-236.
11. Vega R.B., Huss J.M., Kelly D.P. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol. Cell. Biol.*, 2000, Vol. 20, no. 5, pp. 1868-1876.
12. Wu Z., Puigserver P., Andersson U., Zhang C., Adelmant G., Mootha V., Troy A., Cinti S., Lowell B., Scarpulla R.C., Spiegelman B.M. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 1999, Vol. 98, no. 1, pp. 115-124.

### Авторы:

**Власова В.В.** — лаборант лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

**Шмагель Н.Г.** — д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

### Authors:

**Vlasova V.V.**, Assistant, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Shmagel N.G.**, PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 11.06.2020  
Принята к печати 06.07.2020

Received 11.06.2020  
Accepted 06.07.2020

## **ВЛИЯНИЕ ЭНДОМОРФИНА-1 НА ФУНКЦИИ ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА IN VITRO**

**Гейн С.В., Кадочникова Я.А.**

*Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия  
ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия*

**Резюме.** Опиоидные пептиды являются одной из наиболее изучаемых групп регуляторных пептидов, поскольку проявляют чрезвычайно широкий спектр биологической активности и играют важную роль в регуляции гомеостаза. Эндогенная опиоидная система участвует в функционировании целого ряда органов и систем, в том числе и иммунной системы. В настоящее время наиболее подробно описано иммуномодулирующее действие трех основных семейств опиоидных пептидов: эндорфинов, энкефалинов, динорфинов. Гораздо меньше информации об иммуномодулирующих эффектах эндоморфинов. Цель настоящей работы – оценка влияния эндоморфина-1 на фагоцитоз, продукцию активных форм кислорода и IL-1 $\beta$  различными фракциями клеток врожденного иммунитета периферической крови *in vitro*.

В качестве объекта исследования использовались лейкоциты периферической венозной крови здоровых доноров-добровольцев в возрасте от 22 до 40 лет. Эндоморфин-1 использовали в концентрациях 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-12</sup> М. Для получения фракции лейкоцитов гепаринизированную венозную кровь отстаивали в течение 2 ч в термостате при 37 °С. Выделение фракции нейтрофилов проводили на градиенте плотности фиколл-урографин ( $\rho = 1,077$ ) путем наслаивания верхнего слоя плазмы крови с лейкоцитами. Оценку кислородзависимой микробицидной активности лейкоцитов осуществляли с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). В качестве индуктора использовали опсонизированный зимозан 150 мкг/мл, в качестве маркера выраженности реакции – люминол 10<sup>-5</sup> М. Выделение фракции мононуклеарных клеток проводили на градиенте плотности фиколл-урографин ( $\rho = 1,077$ ). Фракцию моноцитов выделяли механическим способом. Для оценки продукции IL-1 $\beta$  мононуклеары и моноциты культивировали в течение 24 ч, концентрацию цитокинов определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа. Для оценки поглотительной активности моноцитов и нейтрофилов использовали метод, основанный на поглощении FITC-меченого *St.aureus*. Для статистической обработки использовали однофакторный дисперсионный анализ и парный LSD-критерий для *post-hoc* сравнения, различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

Установлено, что эндоморфин-1 снижал спонтанную продукцию активных форм кислорода и не влиял на стимулированную продукцию кислородных радикалов лейкоцитами. Во фракции нейтрофилов эндоморфин-1 не влиял на спонтанную кислородзависимую микробицидность и снижал интенсивность респираторного взрыва в стимулированных нейтрофилах. Пептид повышал процент фагоцитоза моноцитов и усиливал спонтанную продукцию IL-1 $\beta$  мононуклеарами. Таким образом,

---

### **Адрес для переписки:**

*Гейн Сергей Владимирович  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения Российской академии наук  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (902) 831-77-05.  
E-mail: gein@iegm.ru*

### **Address for correspondence:**

*Gein Sergei V.  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural  
Branch, Russian Academy of Sciences  
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.  
Phone: 7 (902) 831-77-05.  
E-mail: gein@iegm.ru*

---

### **Образец цитирования:**

*С.В. Гейн, Я.А. Кадочникова «Влияние эндоморфина-1 на функции эффекторных клеток врожденного иммунитета in vitro» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 119-124.  
doi: 10.46235/1028-7221-371-EAI  
© Гейн С.В., Кадочникова Я.А., 2020*

### **For citation:**

*S.V. Gein, Ya.A. Kadochnikova "Endomorphin-1 affecting innate immune cells in vitro", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 119-124.  
doi: 10.46235/1028-7221-371-EAI  
DOI: 10.46235/1028-7221-371-EAI*

эндоморфин-1 оказывает разнонаправленное действие на различные показатели врожденного иммунитета. Как это свойственно и другим группам регуляторных пептидов, направленность эффектов эндоморфина зависела от состава клеточной фракции и присутствия стимулирующего сигнала.

*Ключевые слова:* эндоморфины, эндогенная опиоидная система, иммунорегуляция, активные формы кислорода, фагоцитоз, моноциты, мононуклеары, нейтрофилы

## ENDOMORPHIN-1 AFFECTING INNATE IMMUNE CELLS IN VITRO

Gein S.V., Kadochnikova Ya.A.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation  
Perm State National Research University, Perm, Russian Federation*

**Abstract.** Opioid peptides belong to one of most studied groups of regulatory peptides due to exerting extremely wide range of biological activities and play an important role in regulating homeostasis. The endogenous opioid system is involved in the functioning of diverse organs and systems, including the immune system. Currently, an immunomodulatory effect of the three major families of opioid peptides such as endorphins, enkephalins, dinorphins has been thoroughly described. Much less data are available about the endomorphin-related immunomodulatory effects. The aim of this work was to assess effects of endomorphin-1 on phagocytosis, production of reactive oxygen species and IL-1 $\beta$  by various subsets of peripheral blood innate immune cells *in vitro*.

The leukocytes of obtained from peripheral venous blood of healthy volunteer donors aged 22 to 40 years were used in the study. Endomorphin-1 was used at concentrations of 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-12</sup> M. Blood leukocyte fraction was isolated from heparinized venous blood settled for 2 hours in a thermostat at 37 °C. The neutrophil fraction was isolated by centrifuging in of Ficoll-Urographin ( $\rho = 1.077$ ) density gradient placing the upper layer of blood plasma with leukocytes. Assessment of leukocyte oxygen-dependent microbicidal activity was carried out by using the reaction of luminol-dependent chemiluminescence (LZHL) by using opsonized zymosan at concentration of 150  $\mu\text{g/ml}$ ; 10<sup>-5</sup> M luminol was used to probe reaction magnitude. The separation of the mononuclear cell fraction was carried out by centrifuging in of Ficoll-Urographin ( $\rho = 1.077$ ) density gradient. The monocyte fraction was isolated mechanically. To assess IL-1 $\beta$  production, mononuclear cells and monocytes were cultured for 24 hours followed by measuring its level with enzyme-linked immunosorbent assay. To evaluate monocytes and neutrophil phagocyte activity, FITC-labeled *St.aureus* uptake method was used. Statistical processing was performed with one-way ANOVA test and paired LSD criterion for post-hoc comparison, with significance set at  $p < 0.05$ .

It was found that endomorphin-1 reduced leukocyte spontaneous, but not induced production of reactive oxygen species. In the neutrophil fraction, endomorphin-1 did not affect spontaneous oxygen dependent microbicidity and reduced intensity of the respiratory burst in stimulated neutrophils. In addition, it increased the percentage of monocyte phagocytosis and enhanced spontaneous IL-1 $\beta$  production by mononuclear cells. Thus, endomorphin-1 exhibited multidirectional effects on various parameters of innate immunity. Being typical to other groups of regulatory peptides, modality of endomorphin-1 related effects depended on cell fraction and presence of a stimulating cues.

*Keywords:* endomorphins, endogenous opioid system, immunoregulation, reactive oxygen species, phagocytosis, monocytes, mononuclear cells, neutrophils

Исследования проведены в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы № АААА-А19-119112290007-7.

### Введение

Опиоидные пептиды являются одной из наиболее изучаемых групп регуляторных пептидов, поскольку проявляют чрезвычайно широкий

спектр биологической активности и играют важную роль в регуляции гомеостаза. Эндогенная опиоидная система участвует в функционировании целого ряда органов и систем, в том числе и иммунной системы [3]. В настоящее время показана способность опиоидов модулировать функции как врожденного, так и адаптивного иммунитета [1]. Наиболее подробно описано

иммуномодулирующее действие трех основных семейств опиоидных пептидов: эндорфинов, энкефалинов, динарфинов, имеющих общую N-концевую последовательность и образующихся при расщеплении крупных молекул-предшественников. Гораздо меньше информации об иммуномодулирующих эффектах эндоморфинов, структура которых отличается от упомянутых выше опиоидных пептидов тем, что эндоморфины не имеют общей N-концевой последовательности, а их эндогенный предшественник до сих пор не идентифицирован [5].

**Цель настоящей работы** — исследовать влияние эндоморфина-1 на поглотительную активность, продукцию активных форм кислорода и IL-1 $\beta$  различными фракциями клеток врожденного иммунитета *in vitro*.

## Материалы и методы

Объектом исследования служили лейкоциты периферической венозной крови здоровых доноров-добровольцев в возрасте от 22 до 40 лет.

Фракцию лейкоцитов получали из гепаринизированной венозной крови, которую отстаивали в течение 2 ч в термостате при 37 °С. Выделение фракции нейтрофилов проводили на градиенте плотности фиколл-урографин ( $\rho = 1,077$ ). Фракцию лейкоцитов центрифугировали при 1500 об/мин в течение 40 мин, после осевшие на дно гранулоциты собирали и дважды отмывали средой RPMI 1640 на центрифуге в течение 10 мин. Клеточную суспензию выдерживали в течение 1 ч при 4 °С в полной питательной среде для снятия активации. Продукцию кислородных радикалов проводили с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). В качестве индуктора использовали опсонизированный зимозан 150 мкг/мл, в качестве маркера выраженности реакции — люминол  $10^{-5}$  М. Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах ( $10^5$  клеток в 100 мкл раствора Хенкса). Результаты регистрировали с помощью многофункционального спектрофотометра TECAN (Австрия).

Фракцию мононуклеаров выделяли на градиенте плотности фиколл-урографин ( $\rho = 1,077$ ). Фракцию моноцитов выделяли механическим способом, для этого охлажденные мононуклеары наносили на стерильную стеклянную чашку Петри, которую помещали в термостат и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Неадгезировавшиеся клетки удаляли, а адгезировавшиеся клетки снимали резиновым шпателем, дважды отмывали, выдерживали в течение 1 ч при 4 °С и использовали как моноциты. Для оценки продукции IL-1 $\beta$  мононуклеары и моноциты культивировали в 24-луночных плоскодонных планшетах 24 ч

в  $1 \times 10^6$  кл/мл. Среду готовили на основе RPMI 1640 (ICN, США) с добавлением 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамин (Sigma, США), 100 мкг/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия). В качестве индуктора использовали опсонизированный зимозан 150 мкг/мл. Супернатанты собирали и замораживали при -20 °С. Концентрацию цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «ВЕКТОР-БЕСТ» (г. Новосибирск).

Для оценки поглотительной активности в качестве объекта исследования использовали фракцию лейкоцитов периферической крови. К 80 мкл клеток добавляли 10 мкл эндоморфина и 10 мкл суспензии FITC-меченного *St. aureus* в конечной концентрации  $10^8$  кл/мл, пробы инкубировали 30 мин при 37 °С. Затем к клеткам добавляли лизирующий раствор (0,15M NH<sub>4</sub>Cl; 0,01M NaHCO<sub>3</sub>; 0,0001M ЭДТА, pH = 7,2) и после 5 мин инкубации центрифугировали 5 мин при 250 г с охлаждением 4 °С. После убирания супернатант, добавляли PBS-0,02% ЭДТА и снова центрифугировали 5 мин при 250 г с охлаждением 4 °С. Далее удаляли супернатант, добавляли 400 мкл PBS-0,02% ЭДТА. После этого пробы анализировали на проточно-лазерном цитометре BDFACSCalibur.

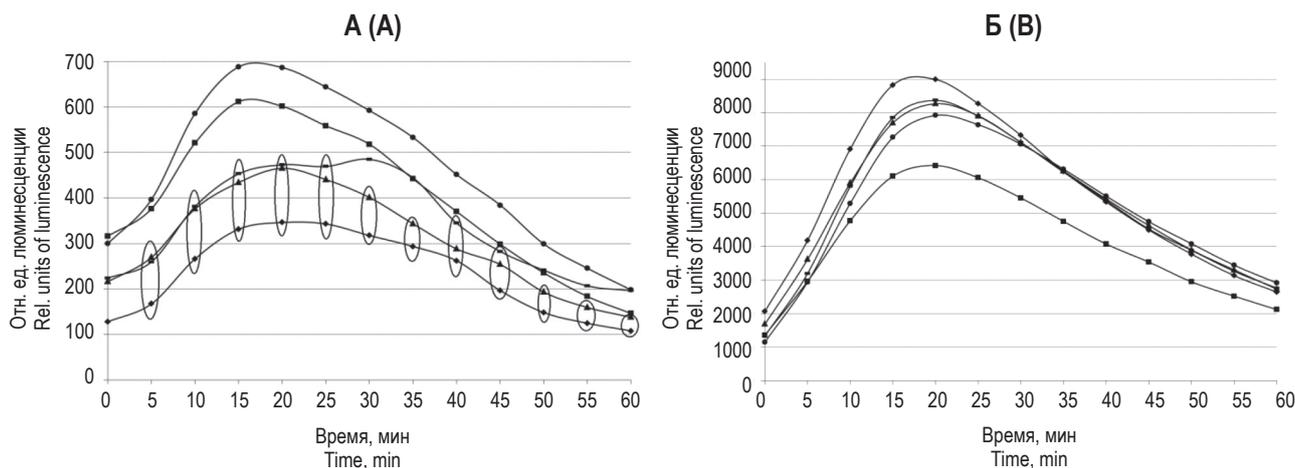
Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 6.0. Для статистической обработки использовали однофакторный дисперсионный анализ и парный LSD-критерий для post-hoc сравнения.

## Результаты и обсуждение

При оценке влияния эндоморфина-1 на продукцию кислородных радикалов фракцией лейкоцитов установлено, что пептид в течение первых 30 мин наблюдений существенно угнетал образование АФК в нестимулированных пробах в концентрациях  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  М. В концентрации  $10^{-6}$  М эндоморфин-1 на спонтанную продукцию АФК лейкоцитами влияния не оказывал. На стимулированную зимозаном продукцию АФК эндоморфин-1 статистически значимо не влиял (рис. 1).

В дальнейшем нами оценивалось влияние эндоморфина-1 на микробицидную активность фракции нейтрофилов. Пептид не влиял на спонтанную и угнетал индуцированную зимозаном продукцию АФК нейтрофилами в концентрациях  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  М (рис. 2).

При оценке влияния эндоморфина-1 на поглотительную активность клеток периферической крови методом проточной цитометрии было установлено, что пептид не влиял на поглотительную нейтрофилов, однако повышал

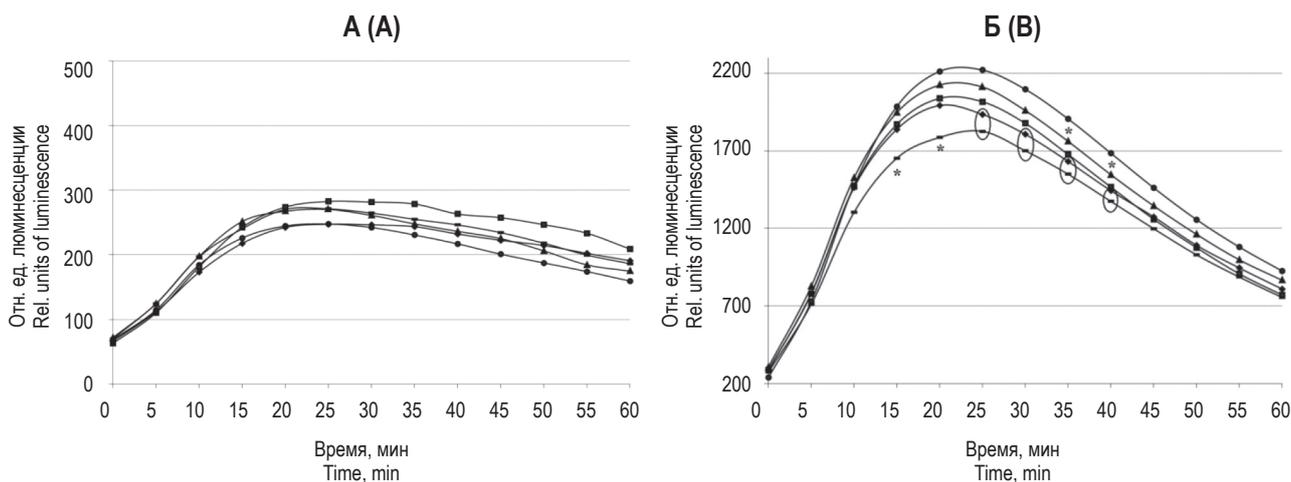


**Рисунок 1. Влияние эндоморфина-1 на спонтанную (А) и стимулированную (Б) продукцию активных форм кислорода фракцией лейкоцитов периферической крови**

Прмечание. ● – контроль; ■ –  $10^{-6}$  М; ▲ –  $10^{-8}$  М; ▾ –  $10^{-10}$  М; ◆ –  $10^{-12}$  М;  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Figure 1. Effect of endomorphin-1 on spontaneous (A) and stimulated (B) production of reactive oxygen species by the peripheral blood leukocyte fraction

Note. ●, control; ■,  $10^{-6}$  M; ▲,  $10^{-8}$  M; ▾,  $10^{-10}$  M; ◆,  $10^{-12}$  M;  $p < 0.05$  compared with control.



**Рисунок 2. Влияние эндоморфина-1 на спонтанную (А) и стимулированную (Б) продукцию активных форм кислорода фракцией нейтрофилов периферической крови**

Примечание. ● – контроль; ■ –  $10^{-6}$  М; ▲ –  $10^{-8}$  М; ▾ –  $10^{-10}$  М; ◆ –  $10^{-12}$  М;  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Figure 2. Effect of endomorphin-1 on spontaneous (A) and stimulated (B) production of reactive oxygen species by the fraction of peripheral blood neutrophils

Note. ●, control; ■,  $10^{-6}$  M; ▲,  $10^{-8}$  M; ▾,  $10^{-10}$  M; ◆,  $10^{-12}$  M;  $p < 0.05$  compared with control.

процент фагоцитоза моноцитов в концентрациях  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  М (табл. 1). Помимо этого, пептид в концентрациях  $10^{-6}$ ,  $10^{-12}$  М усиливал спонтанную продукцию IL-1 $\beta$  мононуклеарами. На выработку IL-1 $\beta$  моноцитами эндоморфин-1 существенного влияния не оказывал (табл. 2).

Таким образом, эндоморфин-1 оказывает разнонаправленное действие на различные показатели врожденного иммунитета. Пептид угнетал продукцию АФК фракцией лейкоцитов и нейтрофилов, стимулировал фагоцитоз моноцитов и продукцию IL-1 $\beta$  мононуклеарами. Как это свой-

ственно и другим группам регуляторных пептидов, направленность эффектов эндоморфинов зависит от состава клеточной фракции и присутствия стимулирующего сигнала. Ранее нами было показано наличие аналогичного влияния у эндогенного  $\mu$ -агониста  $\nu$ -эндорфина, который угнетал продукцию АФК и стимулировал секрецию IL-1 $\beta$  *in vitro* [2, 4]. Эффекты эндоморфина-1 имеют много общего с эффектами  $\nu$ -эндорфина, которые можно считать протекторным для организма, поскольку продукция АФК может оказывать двоякое действие на организм: с одной сто-

**ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ЭНДОМОРФИНА-1 НА ПОГЛОТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

TABLE 1. EFFECT OF ENDOMORPHINE-1 ON THE ABSORPTION ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES

Концентрация пептида Peptide concentration	% Phagocytosis percentage
<b>Нейтрофилы / Neutrophils</b>	
Контроль / Control	54,62
10 <sup>-6</sup> М	60,97
10 <sup>-8</sup> М	57,77
10 <sup>-10</sup> М	57,05
10 <sup>-12</sup> М	57,13
<b>Моноциты / Monocytes</b>	
Контроль / Control	47,30
10 <sup>-6</sup> М	54,64*
10 <sup>-8</sup> М	52,97*
10 <sup>-10</sup> М	51,51
10 <sup>-12</sup> М	49,85

Примечание. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем по парному t-критерию.

Note. \*,  $p < 0.05$  compared with the control according to the paired t-test.

**ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ЭНДОМОРФИНА 1 НА СПОНТАННЫЙ И СТИМУЛИРОВАННЫЙ ЗИМОЗАНОМ СИНТЕЗ IL-1 $\beta$  МОНОНУКЛЕАРАМИ И МОНОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

TABLE 2. EFFECT OF ENDOMORPHIN 1 ON SPONTANEOUS AND ZYMOZAN-STIMULATED SYNTHESIS OF IL-1 $\beta$  BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEARS AND MONOCYTES

Концентрация пептида Peptide concentration	пг/мл pg/ml			
	Мононуклеары / Mononuclear cells		Моноциты / Monocytes	
	Безиндуктора Without the inductor	С индуктором опсонизированный зимозан With the inductor opsonized zymosan	Без индуктора Without the inductor	С индуктором опсонизированный зимозан With the inductor opsonized zymosan
Контроль / Control	203,79175	313,59375	123,124875	267,4455
10 <sup>-6</sup> М	262,03125*	314,18	158,693625	266,780125
10 <sup>-12</sup> М	232,592375*	304,0425	148,721875	275,97775

Примечание. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем по парному t-критерию.

Note. \*,  $p < 0.05$  compared with the control according to the paired t-test.

роны – усиливается микробицидный потенциал клеток врожденного иммунитета, с другой – повышенная продукция АФК может оказывать повреждающее действие на липидные мембраны клеток и угнетать иммунный ответ [6].

## Выводы

1. Установлено, что эндоморфин-1 снижал спонтанную продукцию активных форм кисло-

рода и не влиял на стимулированную продукцию кислородных радикалов лейкоцитами. Во фракции нейтрофилов эндоморфин-1 не влиял на спонтанную кислородзависимую микробицидность и снижал интенсивность респираторного взрыва в стимулированных нейтрофилах.

2. Пептид повышал процент фагоцитоза моноцитов и усиливал спонтанную продукцию IL-1 $\beta$  мононуклеарами.

## Список литературы / References

1. Гейн С.В., Баева Т.А. Эндогенные опиоидные пептиды в регуляции функций клеток врожденного иммунитета // Биохимия, 2011. Т. 76, № 3. С. 379-390. [Gein S.V., Baeva T.A. Endogenous opioid peptides in regulation of innate immune cells functions. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2011, Vol. 76, no. 3, pp. 379-390. (In Russ.)]
2. Гейн С.В., Гилева С.Г., Чижова Е.Г. Влияние β-эндорфина на микробицидную активность лейкоцитов у мужчин и женщин различных возрастных групп // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 2 (1). С. 772-773. [Gein S.V., Gileva S.G., Chizhova E.G. Effect of β-endorphin on the microbicidal activity of leukocytes in men and women of different age groups. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Immunological Journal*, 2015, Vol. 9 (18), no. 2 (1), pp. 772-773. (In Russ.)]
3. Bodnar R.J. Endogenous opiates and behavior: 2017. *Peptides*, 2020, Vol. 124, 170223. doi: 10.1016/j.peptides.2019.170223.
4. Gein S.V., Gorshkova K.G., Tendryakova S.P. Regulation of interleukin-1beta and interleukin-8 production by agonists of mu and delta opiate receptors *in vitro*. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2009, Vol. 39, no. 6, pp. 591-595.
5. Mizusawa K. Endomorphin. In: Takei Y., Ando H., Tsutsui K., ed. Handbook of hormones: comparative endocrinology for basic and clinical research. Oxford: Academic Press; 2016. pp. 62-63.
6. Riquelme P., Tomiuk S., Kammler A., et al. Molecular therapy. *J. Am. Soc. Gene Ther.*, 2013, Vol. 21, no. 2, pp. 409-422.

---

### Авторы:

**Гейн С.В.** — д.м.н., профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет; заместитель директора, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

**Кадочникова Я.А.** — студент магистратуры биологического факультета ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет; сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

### Authors:

**Gein S.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University; Deputy Director, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Kadochnikova Ya.A.**, Undergraduate Student, Faculty of Biology, Perm State National Research University; Laboratory of Biochemistry of Development of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

---

Поступила 26.06.2020  
Принята к печати 28.07.2020

---

Received 26.06.2020  
Accepted 28.07.2020

# ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ГЕЛЕВОГО МЕТАБИОТИКА НА ФАКТОРЫ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГОВ КОЖИ

**Забокрицкий Н.А.**

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,  
г. Екатеринбург, Россия

**Резюме.** На экспериментальной модели термического ожога кожных покровов у лабораторных животных показано иммуностропное действие на факторы клеточного и гуморального иммунитета нового гелевого метабактериоцида, представляющий собой комплекс биологически активных веществ, продуцируемых штаммом ВКПМ *Bacillus subtilis B-3679* в составе трех гелевых транскутаных основ: тизоля, эфтидерма и кремнийтитанорганического глицерогидрогеля. Цель исследования — оценка иммуностропной активности нового гелевого метабактериоцида на факторы клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном моделировании термических ожогов кожи. Экспериментальное исследование проведено на 60 белых лабораторных крысах линии Wistar, массой 180-220 г. Объектом исследования был метабактериоцид, представляющий собой комплекс биологически активных веществ, продуцируемых штаммом ВКПМ *Bacillus subtilis B-3679* в составе трех гелевых транскутаных основ: тизоля, эфтидерма и кремнийтитанорганического глицерогидрогеля (КТГГ). В качестве контроля использовали зарегистрированную, стандартизированную противомикробную и ранозаживляющую мазь левосин. Полученные экспериментальные данные подтверждают эффективность использования исследуемых препаратов для лечения термических ожогов первой и второй степени, что выражается более быстрым уменьшением площади пораженного участка, по сравнению с подопытными животными, лечеными левосином. При оценке терапевтической эффективности экспериментальных образцов гелевых препаратов на основе метабактериоцида изучали их влияние на различные факторы клеточного и гуморального иммунитета на модели термического ожога кожи. Исследовали такие показатели, как фагоцитарная активность нейтрофилов крови и перитонеальных макрофагов, количественное содержание Т- и В-лимфоцитов, антителобразующих клеток и иммуноглобулинов различных классов. Было установлено, что у экспериментальных животных с воспроизведенными моделями травматических повреждений кожи наблюдается повышение уровня всех изучаемых показателей гуморального иммунитета. В большей степени возрастала концентрация иммуноглобулина М, цирку-

## Адрес для переписки:

Забокрицкий Николай Александрович  
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»  
Уральского отделения Российской академии наук  
620049, Россия, г. Екатеринбург,  
ул. Первомайская, 106.  
Тел.: 8 (922) 110-11-14.  
E-mail: pharmusma@rambler.ru

## Address for correspondence:

Zabokritskiy Nikolai A.  
Institute of immunology and Physiology, Ural Branch, Russian  
Academy of Sciences  
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,  
Pervomayskaya str., 106.  
Phone: 7 (922) 110-11-14.  
E-mail: pharmusma@rambler.ru

## Образец цитирования:

Н.А. Забокрицкий «Фармакологическая оценка иммуностропной активности нового гелевого метабактериоцида на факторы клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном моделировании термических ожогов кожи» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 125-132.  
doi: 10.46235/1028-7221-314-PAO

© Забокрицкий Н.А., 2020

## For citation:

Zabokritskiy N.A. "Pharmacological assessment of immunotropic activity of new gel metabiotic on cellular and humoral immunity in experimentally modeled thermal skin burns", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 125-132.  
doi: 10.46235/1028-7221-314-PAO

DOI: 10.46235/1028-7221-314-PAO

лирующих иммунных комплексов и иммуноглобулина Е, а также исследуемых цитокинов. Увеличился уровень  $\alpha$ -интерферона и рецепторного антагониста интерлейкина-1.

Таким образом, исследование гуморального статуса у подопытных животных, получавших испытуемые гелевые препараты на основе метабактериоцида при моделировании термических ожогов кожи, позволяет сделать заключение об их существенном влиянии на различные звенья как клеточного, так и гуморального иммунитета.

Более выраженные эффекты отмечены для препаратов на основе метабактериоцида, содержащих тизоль и КТГГ.

В целом, на основании полученных экспериментальных данных, можно сделать вывод о сравнительно высокой терапевтической эффективности исследуемых препаратов при лечении термических ожоговых ран кожных покровов у подопытных животных. Применение этих препаратов обеспечивало более раннее отторжение некротических масс, ускорение процессов регенерации, предупреждало развитие вторичной раневой инфекции при ожогах.

*Ключевые слова: метабактериоцид, гелевая форма, иммуномодулятор, термический ожог, лечение, клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет*

## PHARMACOLOGICAL ASSESSMENT OF IMMUNOTROPIC ACTIVITY OF NEW GEL METABACTERIOCIDIC ON CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN EXPERIMENTALLY MODELED THERMAL SKIN BURNS

Zabokritskiy N.A.

*Institute of immunology and physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation*

**Abstract.** Thermal skin burns were experimentally modeled in laboratory animals revealed immunotropic effects of new gel metabacteriocidal consisting of complex biological active substances produced by *Bacillus subtilis B-3679* strain as part of three gel transcutaneous bases: tizol, eftiderm and organosilicon glycerohydrogel on cellular and humoral immunity. The aim of the study was to evaluate immunotropic activity of a new gel metabacteriocidal on cellular and humoral immunity in experimentally modeled thermal skin burns in 60 white laboratory Wistar rats, weighed 180-220 g, for metabacteriocidal consisting of a complex biologically active substances produced by *Bacillus subtilis B-3679* strain containing the three gel transcutaneous bases: tizol, ephiderm and organosilicon glycerohydrogel (KTGG). Registered, standardized antimicrobial and wound-healing ointment levosin was used as a control. The experimental data obtained confirm the effectiveness of using the drugs studied for treatment of first and second degree thermal burns revealed by faster decreased area of affected area compared to experimental animals treated with levosin. While evaluating therapeutic effectiveness of experimental samples of metabacteriocidal-based gel preparations, their influence on various parameters of cellular and humoral immunity in modeled thermal skin burn was examined. We assessed phagocytic activity of blood neutrophils and peritoneal macrophages, quantified T and B lymphocytes, as well as antibody-forming cells and immunoglobulins of various classes. It was found that in experimental animals reproducing models of traumatic skin injuries, there is an increase in the level of all the studied parameters of humoral immunity. Concentration of immunoglobulin M, circulating immune complexes and immunoglobulin E, as well as various cytokines, increased larger. The level of  $\alpha$ -interferon and the receptor antagonist interleukin-1 was elevated. Thus, the study of the humoral status of experimental animals that received test metabacteriocidal-based gel preparations in modeled thermal skin burns, allows to conclude that they significantly influenced various arms both cellular and humoral immunity. More marked effects were observed for metabacteriocidal-based drugs containing tizol and KTGG. In general, based on the experimental data we can conclude that the relatively high therapeutic effectiveness of examined drugs in the treatment of thermal skin burn wounds in experimental animals, use of which provided earlier removal of necrotic masses, accelerated regeneration processes, and prevented development of secondary wound infection in burns.

*Keywords: metabacteriocidal, gel form, immunomodulator, thermal burn, treatment, cellular immunity, humoral immunity*

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1.

## Введение

На сегодняшний день разработка новых фармакологических препаратов и лекарственных кандидатов, изучение специфических механизмов их действия на различных биологических моделях, экстраполяция фармакологических параметров на человека, доклиническое изучение безопасности созданных экспериментальных образцов являются актуальными задачами современного здравоохранения.

По данным отечественных и зарубежных авторов, весьма перспективной областью исследования представляется поиск новых биологически активных фармакологических веществ и выделенных метаболитических соединений на основе пробиотических микроорганизмов, определение путей их практического применения для лечения ряда таких значимых заболеваний, как инфекционные и травматические поражения кожных покровов [1, 7].

Наметилась отчетливая тенденция снижения терапевтической эффективности многих противомикробных средств, особенно антибиотиков, за счет широкого распространения лекарственной устойчивости среди различных видов возбудителей, а также появления патогенных штаммов, обладающих полирезистентностью не только к традиционным, но и вновь синтезируемым антибиотическим препаратам. Все это значительно снижает эффективность лечения заболеваний инфекционного генеза.

В настоящее время все большую значимость приобретает проблема борьбы с воспалительными и гнойными заболеваниями кожных покровов и слизистых. По данным ряда авторов, неудовлетворительные результаты лечения таких поражений существенно возросли [2].

В этой связи целесообразным представлялось использование для лечения травматических и ожоговых поражений кожных покровов метабиотических препаратов на основе биологически активных веществ пробиотических штаммов, которые в настоящее время считаются наиболее адекватными и эффективными профилактическими и лекарственными средствами [1, 2, 3, 4].

**Цель исследования** – оценка иммунотропной активности нового гелевого метабиотика на факторы клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном моделировании термических ожогов кожи.

## Материалы и методы

Экспериментальное исследование проведено на 60 белых лабораторных крысах линии Wistar, массой 180-220 г. Объектом исследования был метабиотик, представляющий собой комплекс биологически активных веществ, продуцируемых штаммом ВКПМ *Bacillus subtilis B-3679* в составе трех гелевых транскутаных основ: тизоля, эфтидерма и кремнийтитанорганического глицерогидрогеля (КТГГ). В качестве контроля использовали зарегистрированную, стандартизованную противомикробную и ранозаживляющую мазь левосин.

Метабиотик был получен на основе биологически активных веществ (метаболиты) *Bacillus subtilis* штамма ВКПМ В-3679. Комплекс биологически активных веществ получали в лабораторных условиях по имеющимся в настоящее время в научной литературе рекомендациям [5].

Метаболиты выделяли из культуральной жидкости бактериальной культуры *Bacillus subtilis*, штамм ВКПМ В-3679, при его глубинном культивировании в среде, состоящей из соляно-кислотного гидролизата соевой муки или панкреатического гидролизата казеина. Культура в это время находилась в конце экспоненциальной фазы роста (16-18 часов культивирования).

Качественное и количественное содержание метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделение проводили при комнатной температуре с использованием колонки Supelcosil™ LC-18 (250 × 4,6 мм, размер частиц – 5 мкм).

Химический состав выделяемых БАВ в среднем характеризовался следующими показателями: белково-полисахаридный комплекс – 250-300 мг/г<sup>-1</sup>; (общее количество белка) свободные аминокислоты – 120-140 мг/г<sup>-1</sup>; гексозамин – 40-50 мг/г<sup>-1</sup>; пуриновые и пиримидиновые основания: аденин – 16-17 мг/г<sup>-1</sup>, гуанин – 2-3 мг/г<sup>-1</sup>, цитозин – 2-4 мг/г<sup>-1</sup>, тиамин – 3-5 мг/г<sup>-1</sup>, урацил – 12-14 мг/г<sup>-1</sup>; водорастворимые витамины: пиридоксин (В<sub>6</sub>) – 1,5 мг/г<sup>-1</sup>, рибофлавин (В<sub>2</sub>) – 1,7 мг/г<sup>-1</sup>; ферментативный комплекс: активность протеолитических ферментов – 900-950 ед/г<sup>-1</sup>, активность амилолитических ферментов – 1000-1100 ед/г<sup>-1</sup>; антибиотики и антибиотикоподобные соединения – 0,1-0,5%; другие соединения – менее 5%.

Экспериментальный образец метабиотика содержал в своем составе метаболиты пробиотических бактериальных клеток сенной палочки – 3/5 масс % и гелевые основы – тизоль, эфтидерм,

кремнийтитанорганический глицерогидрогель (КТГГ).

Тизоль — гелевый препарат на основе глицеро-сольвата титана «тетракопан гидроксотетракис (окси-3,4-дигидроксипропил) титана с декан-1,2,3-тригидроксипропаном»:  $Ti(C_3H_7O_3)_4 \times 10 C_3H_8O_3 \times 40H_2O$ . Тизоль характеризуется широким спектром терапевтического действия, обладает противовоспалительным, противоотечным, противозудным, антисептическим действием; стимулирует регенерацию тканей и локальный кровоток. Для тизоля установлена высокая способность транскутанного проведения различных веществ через кожу и слизистые. Он хорошо сочетается со многими лекарственными средствами, повышает их активность и облегчает их транспортировку к патологическому очагу.

Эфтидерм — водно-глицериновый комплекс (2,3-диоксипропил)-ортотитаната гидрохлорид:  $20Ti[C_3H_7O_3]_4 \times 160 C_3H_8O_3 \times 940 H_2O \times 9 HCl$ .

Представляет собой гель с сероватым или желтоватым оттенком со слабым специфическим запахом. Является проводником лекарственных средств через кожу и слизистые оболочки, обладает противовоспалительной, антиоксидантной и цитопротекторной активностью.

КТГГ — кремнийтитанорганический глицерогидрогель на основе глицератов кремния, состав которых отвечает формуле  $2Si(C_3H_7O_3)_4 \times Ti(C_3H_7O_3)_4 \times 3H_8O_3 \times y H_2O$ . Способствует нормальному развитию эпителиальных и соединительных тканей, биосинтезу коллагена, стимулирует метаболические процессы в коже, слизистых и костной ткани, обладает хорошо выраженными транскутантными свойствами. Гель серовато-белого цвета с бежевым оттенком [6].

С использованием лиофильно высушенного биокомпонента (бактериальных культур вышеприведенного штамма) и трех гелевых основ: тизоля, эфтидерма и кремнийтитанорганического глицерогидрогеля, а также с учетом существующих рекомендаций были получены экспериментальные образцы гелевых метабиотических препаратов.

Для изучения терапевтической эффективности экспериментальных образцов в качестве препарата сравнения использовали левосин. Левосин представляет собой мазь для наружного применения, содержащую левомецетин, сульфадиметоксин, метилурацил, тримекаин, полиэтиленоксид. Оказывает противомикробное, местноанестезирующее, противовоспалительное и стимулирующее регенеративное действие. Препарат широко применяется в современной ме-

дицинской практике для лечения инфицированных ран кожи и слизистых различной этиологии (ожоги, раны, трудно заживающие язвы).

Экспериментальное изучение ранозаживляющих свойств экспериментальных образцов проводили на белых мышах в соответствии с требованиями методических указаний.

Для экспериментального воспроизведения модели термического ожога использовали инфракрасный нагреватель паяльной станции марки YaXunYX865D, который размещали на расстоянии 15 мм от кожи животного для формирования ожога II степени. Все манипуляции у животных проводили под эфирным наркозом.

Для оценки активности клеточных факторов неспецифического иммунитета экспериментальных животных получали клетки перитонеального экссудата белых мышей путем промывания брюшной полости забуференным изотоническим раствором объемом 8,0 см<sup>3</sup>. Полученный экссудат собирали в силиконизированные пробирки и дважды проводили отмывание клеток. Предварительно подсчитывали число макрофагов в камере Горяева, а также оценивали их жизнеспособность с помощью раствора метиленового синего.

Обогащение макрофагальной фракции перитонеального экссудата осуществляли посредством адгезии этих клеток на стеклянной поверхности. С этой целью клеточные суспензии разводили до концентрации  $2 \times 10^6$  клеток в 1,0 см<sup>3</sup> забуференным физиологическим раствором с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки и 0,03 %-ной глютаминной кислоты. Затем клетки культивировали на предметных стеклах в объеме 0,1 см<sup>3</sup> при  $(36 \pm 1)^\circ C$  в течение 50 мин. После культивирования неприлипшие клетки осторожно смывали изотоническим раствором. С помощью данного метода получали достаточно высокие концентрации макрофагов среди адгезированных клеток (до 90%).

Метаболическую активность фагоцитов определяли в НСТ-тесте [5]. В лунку плоского планшета вносили по 0,1 см<sup>3</sup> клеточной суспензии и 0,05 см<sup>3</sup> паранитросинего тетразолия в концентрации 2,0 мг  $\times$  см<sup>-3</sup>. После внесения всех реагентов смесь инкубировали при температуре  $(36 \pm 1)^\circ C$  в течение 20 мин, промывали забуференным физиологическим раствором и дважды абсолютным этанолом, затем клетки разрушали внесением в каждую лунку 0,14 см<sup>3</sup> раствора диметилсульфоксида. Полученные растворы фотометрировали на многоканальном спектрофотометре при длине волны 620 нм. Данные представляли в единицах оптической плотности.

Исследование фагоцитарной активности (ФА) нейтрофилов и моноцитов периферической крови, перитонеальных макрофагов (PM) осуществляли путем спектрофотометрии клеточной суспензии с добавлением соответствующих красителей (конго красный, нейтральный красный). Активность фагоцитов выражали в единицах оптической плотности.

Определение количества Т- и В-лимфоцитов периферической крови проводили в реакции розеткообразования с отмытыми эритроцитами ба-рана.

Процесс образования В-лимфоцитами анти-тел *in vivo* и *in vitro* исследовали в реакции локального гемолиза с последующим вычислением количества антителообразующих клеток (АFC) в селезенке по методу Каннигема и Эрне [5].

Гуморальный статус у экспериментальных групп животных при оценке терапевтической эффективности испытуемых препаратов определяли путем исследования следующих количественных показателей сыворотки крови: титр иммуноглобулинов М,  $\text{мг} \times \text{см}^{-3}$ ; титр иммуноглобулинов G,  $\text{мг} \times \text{см}^{-3}$ ; титр иммуноглобулинов А,  $\text{мг} \times \text{см}^{-3}$ ; титр иммуноглобулинов Е,  $\text{мг} \times \text{см}^{-3}$ ; титр  $\alpha$ -интерферона (IFN $\alpha$ ),  $\text{пг} \times \text{см}^{-3}$ ; титр рецепторного антагониста интерлейкина-1 (РА IL-1),  $\text{пг} \times \text{см}^{-3}$ ; концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (СIC), опт. ед.

Количественное определение иммуноглобулинов IgM, IgG, IgA, IgE, IFN $\alpha$  и рецепторного антагониста IL-1 в сыворотке крови проводили с помощью тест-систем, основанных на классическом твердофазном методе иммуноферментного анализа на микропланшетах.

Количественное определение концентрации CIC проводили при помощи метода преципитации 3,5%-ным раствором полиэтиленгликоля. Количественное определение иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA, IgE), IFN- $\alpha$  и рецепторного антагониста IL-1 в сыворотке крови проводили с помощью иммуноферментного анализа на микропланшетах. Забор материала для исследований (сыворотка крови) проводили на 1-е и 7-е сутки после начала лечения экспериментальными образцами испытуемых препаратов.

Статистическую обработку осуществляли с помощью пакетов компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 6.0. Использовали метод дисперсионного анализа (ANOVA). Оценку нормальности распределения полученных данных проводили по методу Колмогорова-Смирнова. Для оценки достоверности межгрупповых различий использовали параметрический

F-критерий Фишера в зависимости от нормальности распределения данных. Проверку статистических гипотез осуществляли при критическом уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

Полученные результаты исследований показывают, что фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов (ФА PM) у животных контрольной группы (без лечения), в отличие от ФА PM, возросла в 2 раза по сравнению с интактной группой. В подопытных группах с применением препаратов метабиотик и тизоль, метабиотик и эфтидерм, а также левосин фагоцитарная активность была незначительной. В подопытной группе животных, где применялся препарат метабиотик и КТГГ, фагоцитарная активность PM возросла примерно в 2 раза по сравнению с контрольной группой без лечения и в 3 раза – по сравнению с интактной группой.

При определении НСТ-теста у животных всех исследуемых групп также наблюдали в целом повышение фагоцитарной активности во всех случаях, в сравнении с контролем.

Полученные данные показали значительное снижение содержания Т- и В-лимфоцитов у животных контрольной группы, не получавших лечение испытуемыми препаратами, по сравнению с интактной группой (в 1,5-4,0 раза). Напротив, в крови опытных групп животных отмечалось повышение содержания Т- и В-лимфоцитов: при применении препаратов метабиотик и тизоль и метабиотик и эфтидерм – в 1,8 раза, при применении препарата метабиотик и КТГГ – в 3 раза. В группе животных, получавших препарат левосин, отмечалось первоначальное повышение содержания Т и В (в 1,8 раза) по сравнению с интактной группой, с дальнейшим снижением до нормальных пределов.

При оценке количества антителообразующих клеток (АFC) были получены следующие данные. На 7-е сутки наблюдения как в контрольной группе животных (без лечения), так и у интактных животных было отмечено незначительное повышение концентрации АFC. В опытных группах животных, получавших исследуемые препараты метабиотик и тизоль, метабиотик и КТГГ, содержание АFC повысилось менее значительно, чем в группе экспериментальных животных, для лечения которых использовали с применением метабиотик и эфтидерм. В опытной группе с применением препарата сравнения содержание АFC в крови животных снижалось.

Полученные данные свидетельствуют, что в контрольной группе животных (без лечения) с воспроизведенной моделью термических ожогов кожи, по сравнению с интактной группой животных, на 1-е сутки отмечалось повышение всех изучаемых показателей гуморального иммунитета. Так, концентрация IgM увеличилась в 2 раза, IgE – в 3,5 раза, IFN $\alpha$  – в 1,5 раза, рецепторного антагониста интерлейкина-1 – в 3 раза, С1С – в 2 раза. Титр IgA и IgG увеличился незначительно.

На 7-е сутки наблюдения в контрольной группе животных с термическими ожогами кожи (без лечения) отмечалось увеличение титра IgA в 2,5 раза на фоне снижения концентраций IgM и С1С до нормальных величин. Показатели титров IgG и исследуемых цитокинов оставались на уровне значений, определенных на 1-е сутки после воспроизведения модели термических ожогов кожи в контрольной группе животных, не получавших лечение.

На 1-е сутки после начала лечения испытуемыми образцами на основе метабиотика наблюдали увеличение титра IgM во всех группах подопытных животных в 2,5-3 раза. Так, в группе подопытных животных, получавших препарат метабиотик и тизоль, концентрация IgM была наибольшей –  $5,78 \pm 0,22$  мг  $\times$  см $^{-3}$ , а в группе подопытных животных, получавших препарат метабиотик и эфтидерм, наименьшей –  $5,60 \pm 0,34$  мг  $\times$  см $^{-3}$ . В группе животных, получавших препарат сравнения левосин, титр IgM определяли на уровне  $5,44 \pm 0,26$  мг  $\times$  см $^{-3}$ , что значительно ниже, чем в других экспериментальных группах.

Увеличение содержания циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови подопытных животных совпадало с увеличением титра IgM. Наибольшая концентрация С1С была отмечена в группе животных, получавших препарат метабиотик и тизоль –  $0,33 \pm 0,02$  опт. ед., а наименьшая – в группе подопытных животных, получавших препарат метабиотик и эфтидерм –  $0,28 \pm 0,02$  опт. ед.

Полученные экспериментальные данные влияния лечения испытуемыми препаратами на количественное изменение показателей гуморального иммунитета при моделировании термических ожогов кожи у экспериментальных животных свидетельствуют, что на 1-е сутки после начала лечения при воспроизведении модели термических ожогов кожи у подопытных групп животных, получавших испытуемые препараты, титр IgA оставался практически равным нормальным значениям, а титр IgG увеличился не-

значительно. Титр IgE во всех подопытных группах животных увеличился в 2 раза (до величины  $0,22 \pm 0,04$  мг  $\times$  см $^{-3}$ ).

Исследование количественного содержания цитокинов в сыворотке крови подопытных животных на 1-е сутки от начала аппликации испытуемых препаратов показало высокие значения титра IFN $\alpha$  во всех без исключения группах подопытных животных. Наиболее высокий показатель концентрации IFN $\alpha$  был определен в группе, получавшей препарат метабиотик и тизоль ( $39,3 \pm 1,4$  пг  $\times$  см $^{-3}$ ), менее выраженное увеличение титра IFN $\alpha$  наблюдалось в группе подопытных животных, получавших препарат метабиотик и КТГГ ( $33,3 \pm 1,4$  пг  $\times$  см $^{-3}$ ). В группе подопытных животных, получавших левосин, определяли титр IFN $\alpha$ , равный  $37,3 \pm 1,4$  пг  $\times$  см $^{-3}$ . Концентрация рецепторного антагониста IL-1 была увеличена в большей степени в группе подопытных животных, получавших препарат метабиотик и тизоль ( $5,7 \pm 1,2$  пг  $\times$  см $^{-3}$ ), и в меньшей степени – в группе животных, получавших препарат метабиотик и КТГГ ( $5,2 \pm 1,2$  пг  $\times$  см $^{-3}$ ). Величина титра рецепторного антагониста IL-1 в группе подопытных животных, получавших левосин, была выше, чем в группах животных, получавших препараты на основе метабиотика, –  $5,9 \pm 1,2$  пг  $\times$  см $^{-3}$ .

Через 7 суток после начала аппликации испытуемых образцов препаратов наблюдалось снижение титра иммуноглобулина М и ЦИК до нормальных величин во всех группах экспериментальных животных, а также повышение в сыворотке крови концентрации IgA в 1,5-2 раза (в большей степени в группе животных, получавших препарат метабиотик и тизоль, –  $1,68 \pm 0,14$  мг  $\times$  см $^{-3}$ , и в меньшей степени в группе животных, получавших препарат метабиотик и КТГГ, –  $1,49 \pm 0,15$  мг  $\times$  см $^{-3}$ ). В группах подопытных животных, получавших левосин и метабиотик и эфтидерм, концентрация сывороточного IgA была примерно одинаковой –  $1,54 \pm 0,12$  мг  $\times$  см $^{-3}$  и  $1,52 \pm 0,12$  мг  $\times$  см $^{-3}$  соответственно.

На 7-е сутки от начала лечения концентрация IgG во всех группах подопытных животных имела тенденцию к снижению до нормальных величин, но оставалась достаточно высокой в группах животных, получавших препараты метабиотик и тизоль ( $9,6 \pm 1,3$  мг  $\times$  см $^{-3}$ ), и в группе животных, получавших препарат метабиотик и КТГГ ( $9,2 \pm 1,2$  мг  $\times$  см $^{-3}$ ).

Титр IgE в группах экспериментальных животных имел тенденцию к нарастанию – увеличивался в 3 раза, по сравнению с нормальными показателями, до величины  $0,38 \pm 0,03$  мг  $\times$  см $^{-3}$ ,

что ниже определенного титра IgE в контрольной группе животных, не получавших лечение, —  $0,46 \pm 0,03 \text{ мг} \times \text{см}^{-3}$ .

Титр исследуемых цитокинов в группах подопытных животных, леченных гелевыми метабиотическими препаратами, и в группе животных, леченных левосином, на 7-е сутки наблюдения имел тенденцию к снижению.

## Обсуждение

Экспериментальные данные подтверждают эффективность использования исследуемых препаратов для лечения термических ожогов первой и второй степени, что выражается более быстрым уменьшением площади пораженного участка по сравнению с подопытными животными, лечеными левосином.

При оценке терапевтической эффективности гелевых препаратов на модели термических ожогов кожи изучали их влияние на различные факторы клеточного и гуморального иммунитета. Исследовали такие показатели, как фагоцитарная активность нейтрофилов крови и перитонеальных макрофагов, количественное содержание Т- и В-лимфоцитов, антителобразующих клеток и иммуноглобулинов различных классов.

Было установлено, что у экспериментальных животных с воспроизведенными моделями травматических повреждений кожи наблюдается повышение уровня всех изучаемых показателей гуморального иммунитета. В большей степени возрастала концентрация IgM, циркулирующих иммунных комплексов и IgE, а также исследуемых цитокинов. Увеличивался титр IFN $\alpha$  и рецепторного антагониста IL-1.

## Заключение

Исследование гуморального статуса подопытных животных, получавших испытываемые препараты при воспроизведении у лабораторных животных модели термических ожогов кожи, позволяет сделать заключение о наличии у них иммуномодулирующего воздействия.

Более выраженные эффекты отмечены для препаратов на основе метабиотика, содержащих тизоль и КТГГ, что выявлено также при их сравнении с препаратом левосином.

Таким образом, полученные результаты экспериментальных исследований свидетельствуют об иммуномодулирующей эффективности исследуемых препаратов и подтверждают возможность их использования для лечения термических ожогов кожных покровов у подопытных животных.

## Список литературы / References

1. Ардатская М.Д., Столярова Л.Г., Архипова Е.В., Филимонова О.Ю. Метабиотики как естественное развитие пробиотической концепции // Рецепт, 2019. Т. 2, № 22. С. 291-298. [Ardatskaya M.D., Stolyarova L.G., Arkhipova E.V., Filimonova O.Yu. Metabiotics as a natural development of the probiotic concept. *Retsept = Prescription*, 2019, Vol. 2, no. 22, pp. 291-298. (In Russ.)]
2. Забокрицкий Н.А. Оценка иммуностропного действия пробиотика бацилакт в составе трансдермальных терапевтических систем // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 2. С. 126-129. [Zabokritskiy N.A. Preclinical evaluation of immunotropic action of probiotics bacilact transdermal therapeutic system. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 2, pp. 126-129. (In Russ.)]
3. Забокрицкий Н.А. Принципиальные направления научных исследований по обоснованию и разработке новых иммунобиологических препаратов // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2018, Т. 81. С. 85-86. [Zabokritskiy N.A. Principal directions of scientific research on the justification and development of new immunobiological drugs. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, 2018, Vol. 81, pp. 85-86. (In Russ.)]
4. Забокрицкий Н.А., Сарапульцев П.А. Экспериментальное обоснование возможности создания нового метаболического препарата // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 3, № 12. С. 295-300. [Zabokritskiy N.A., Sarapultsev P.A. Experimental substantiation of the possibility of creating a new metabolic drug. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 3, no. 12, pp. 295-300. (In Russ.)]
5. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С., Булаева Г.В., Вертиев Ю.В., Винокуров А.Е., Горобец О.Б., Дарбева О.С., Жиленьков Е.Л., Зверьков Д.А., Иванова С.М., Иванова Т.С., Корн М.Я., Кривопалова Н.С., Лукин И.Н., Мельникова В.А., Нехорошева А.Г., Романова Ю.М., Сидоренко С.В., Скаженник В.Ю., Скала Л.З., Трухина Г.М. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. СПб.: Лань, 2016. 588 с. [Labinskaya A.S., Blinkova L.P., Eshina A.S., Bulaeva G.V., Vertiev Yu.V., Vinokurov A.E., Gorobets O.B., Darbeeva O.S., Zhilenkov E.L., Zverkov D.A., Ivanova S.M., Ivanova T.S.,

Korn M.Ya., Krivopalova N.S., Lukin I.N., Melnikova V.A., Nekhorosheva A.G., Romanova Yu.M., Sidorenko S.V., Skazenik V.Yu., Skala L.Z., Trukhina G.M. General and sanitary microbiology with the technique of microbiological research. St. Petersburg: Lan, 2016. 588 p.]

6. Khonina T.G., Ivanenko M.V., Shadrina E.V., Chupakhin O.N., Safronov A.P. Features of silicon- and titanium-polyethylene glycol precursors in sol-gel syntesis of new hydrogels. *J. Mater. Chem. B*, 2015, Vol. 3, no. 27, pp. 5490-5500.

7. Lee N.K., Paik H.D., Kim W.S. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Sci. Biotechnol.*, 2019, Vol. 28, no. 5, pp. 1297-1305.

---

**Автор:**

*Забокрицкий Н.А. — д.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия*

**Author:**

*Zabokritskiy N.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation*

*Поступила 08.06.2020*

*Принята к печати 01.07.2020*

*Received 08.06.2020*

*Accepted 01.07.2020*

## РОЛЬ МОРФОГЕННЫХ БЕЛКОВ WNT-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ (СКЛЕРОСТИНА И $\beta$ -КАТЕНИНА) В АДИПОГЕНЕЗЕ

Кулакова А.С.<sup>1</sup>, Снимщикова И.А.<sup>2</sup>, Плотникова М.О.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГАУЗ «Брянская областная больница № 1», г. Брянск, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», г. Орел, Россия

**Резюме.** Механизм адипогенеза является сложным и многообразным, так как на него оказывают влияние многочисленные факторы, в том числе компоненты WNT-сигнального пути. Поиск возможных маркеров развития метаболических заболеваний, связанных с ожирением, обусловил интерес к изучению морфогенных белков склеростина и  $\beta$ -катенина. Целью исследования явилась оценка активности WNT-сигнального пути у пациентов с ожирением путем определения уровня белков склеростина и  $\beta$ -катенина в сыворотке крови.

В исследование были включены 32 пациента с метаболическим синдромом, имеющие прогрессирующие формы ожирения I-III степени при отсутствии сахарного диабета. Концентрацию склеростина и  $\beta$ -катенина в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа. Данные представлены в виде абсолютного и относительного (%) числа больных; среднего арифметического; медианы, 1-й и 3-й квартилей – Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ).

У пациентов, страдающих ожирением, в сыворотке крови выявлено повышение уровня склеростина (260 (230-308,75) пг/мл) на 13,5% по сравнению со здоровыми лицами (225 (220-230) пг/мл, ( $p < 0,001$ )); была отмечена тенденция к увеличению склеростина в зависимости от степени ожирения, чаще всего на фоне снижения  $\beta$ -катенина, что согласуется с данными литературы и может рассматриваться в качестве прогностического критерия течения патологического процесса при ожирении.

*Ключевые слова:* ожирение, склеростин,  $\beta$ -катенин, WNT-сигнальный путь

## ROLE OF WNT SIGNALING MORPHOGENIC PROTEINS (SCLEROSTIN AND $\beta$ -CATENIN) IN ADIPOGENESIS

Kulakova A.S.<sup>a</sup>, Snimshchikova I.A.<sup>b</sup>, Plotnikova M.O.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Bryansk Regional Hospital No. 1, Bryansk, Russian Federation

<sup>b</sup> I. Turgenev Oryol State University, Oryol, Russian Federation

**Abstract.** Adipogenesis relies on complex and multi-faceted mechanism, as it is influenced by multiple cues, including the components from the WNT signaling pathway. The search for possible markers of developing metabolic

### Адрес для переписки:

Кулакова Анастасия Сергеевна  
ГАУЗ «Брянская областная больница № 1»  
241033, Россия, г. Брянск, пр. Станке Димитрова, 86.  
Тел.: 8 (980) 310-12-33.  
E-mail: Kulakovaas@mail.ru

### Address for correspondence:

Kulakova Anastasiia S.  
Bryansk Regional Hospital No. 1  
41033, Russian Federation, Bryansk,  
Stanke Dimitrov ave., 86.  
Phone: 7 (980) 310-12-33.  
E-mail: Kulakovaas@mail.ru

### Образец цитирования:

А.С. Кулакова, И.А. Снимщикова, М.О. Плотникова  
«Роль морфогенных белков WNT-сигнального  
пути (склеростина и  $\beta$ -катенина) в адипогенезе»  
// Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23,  
№ 2. С. 133-138.  
doi: 10.46235/1028-7221-326-ROW  
© Кулакова А.С. и соавт., 2020

### For citation:

A.S. Kulakova, I.A. Snimshchikova, M.O. Plotnikova  
“Role of WNT signaling morphogenic proteins (sclerostin and  
 $\beta$ -catenin) in adipogenesis”, Russian Journal of Immunology/  
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2,  
pp. 133-138.  
doi: 10.46235/1028-7221-326-ROW  
DOI: 10.46235/1028-7221-326-ROW

diseases associated with obesity accounted for an interest to study the morphogenic proteins sclerostin and  $\beta$ -catenin. The aim of the study was to evaluate activity of the WNT signaling pathway in obese patients by measuring level of serum sclerostin and  $\beta$ -catenin proteins. Materials and Methods. There were enrolled 32 patients with metabolic syndrome featured with progressive forms of obesity (class I-III) lacking diabetes mellitus. Concentration of serum sclerostin and  $\beta$ -catenin was measured by using enzyme-linked immunosorbent assay. Data were presented as absolute and relative (%) number of patients; arithmetic mean; medians, 1 and 3 quartiles – Me ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ ). In obese patients, serum sclerostin level (260 (230-308.75) pg/ml) was increased by 13.5% compared with healthy individuals (225 (220-230) pg/ml, ( $p < 0.001$ )); concentration of serum sclerostin tended to increase depending on obesity class, most in parallel with decreased  $\beta$ -catenin level, being in agreement with previous studies that might be considered as a prognostic criterion for assessing course of pathological process in obesity.

*Keywords: obesity, sclerostin,  $\beta$ -catenin, WNT signaling pathway*

## Введение

В современном мире наблюдается резкое увеличение количества людей с избыточным весом. Лица, страдающие ожирением, имеют повышенный риск развития сахарного диабета 2 типа (СД 2), сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваний опорно-двигательного аппарата, онкологических заболеваний и психологических расстройств.

Участие WNT-сигнального пути в физиологическом, эмбриональном и постнатальном развитии, поддержании клеточного гомеостаза, механизмах роста, пролиферативной активности и дифференцировки клеток, в процессах апоптоза указывает на его активную биологическую роль [2, 8, 9, 10, 11, 12, 14]. Передача сигналов WNT является важным регулятором развития и прогрессирования роста органов и клеток. Результаты экспериментов некоторых авторов [4, 6, 7, 10, 13] *in vivo* и *in vitro* показали, что компоненты пути WNT участвуют в пролиферации  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, липидном метаболизме и индуцированной глюкозой секреции инсулина. Передача сигналов WNT/ $\beta$ -catenin регулирует дифференцировку МСК (мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки). Активация передачи сигналов WNT способствует дифференцировке МСК в миобласты и остеобласты, но ингибирует дифференцировку в преадипоциты, поддерживая баланс между адипогенезом, миогенезом и остеогенезом [4, 7].

Известно, что к антагонистам WNT-сигнального пути относится склеростин. На сегодняшний день имеются сообщения о корреляционных связях склеростина с полом, возрастом, индексом массы тела (ИМТ) и наличием сахарного диабета 2 типа (СД 2) [1]. Роль склеростина достаточно хорошо изучена в патогенезе остеогенеза в качестве ингибитора пролиферации костной ткани [2, 3, 10, 12], однако представляется перспективным изучение склеростина как наиболее специфического антагониста WNT-сигнального пути и

при ожирении, т.к. учеными было обнаружено, что передача сигналов WNT блокирует адипогенез посредством подавления ССАТ/энхансер-связывающего белка- $\alpha$  (С/ЕВР $\alpha$ ) и рецептор-активирующего пролифератора пероксисом- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). Следовательно, склеростин участвует в стимуляции адипогенеза. В исследованиях авторов [3, 4, 7, 11, 13] отмечалась положительная корреляция между циркулирующим склеростином и процентным содержанием жировой массы. Также было установлено, что склеростин может частично объяснить потерю костной массы и ухудшение структуры кости у пожилых людей с ожирением [1, 2, 6, 13].

Целью настоящего исследования явилась оценка активности WNT-сигнального пути путем определения уровня белков склеростина и  $\beta$ -катенина в сыворотке крови у пациентов с ожирением.

## Материалы и методы

В исследование были включены 32 пациента с метаболическим синдромом, имеющие прогрессирующие формы ожирения I-III степени при отсутствии сахарного диабета. Возраст больных составил  $40 \pm 10$  лет. Для определения показателей концентрации склеростина и  $\beta$ -катенина в сыворотке крови, условно принимаемых за физиологическую норму, были обследованы 20 здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с больными контрольной группы.

Индекс массы тела рассчитывался по формуле Кетле: ИМТ = масса тела (кг) / рост ( $m^2$ ). В работе был применен комплекс иммунологических и общеклинических методов исследования. Концентрацию склеростина и  $\beta$ -катенина в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием наборов “Human beta catenin”, “SOST/Sclerostin” (Sunlongbiotech, Китай).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного комплекса

Microsoft Excel. Данные представлены в виде абсолютного и относительного (%) числа больных; среднего арифметического; медианы, 1-й и 3-й квартилей — Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). Различия между группами по количественным признакам, рассчитанные с использованием U-критерия Манна-Уитни, считались значимыми при  $p < 0,05$ . Критериями исключения из проводимого исследования служили: возраст пациентов меньше 18 и старше 65 лет, сопутствующие соматические заболевания в стадии обострения или декомпенсации, наличие на момент исследования острых респираторных инфекций, беременности, сепсиса, иммуносупрессия вследствие новообразований или ВИЧ-инфекции, активный вирусный гепатит, отказ больного от проводимого исследования. Исследование после получения информированного согласия от каждого пациента проводилось в соответствии со стандартами клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации, протокол его проведения одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева».

## Результаты и обсуждение

В результате обследования пациентов, страдающих ожирением, выявлено, что 18 из них (56,25%) имеют ожирение 1-й степени, 12 лиц (37,5%) — 2-й степени, 2 пациента (6,25%) — 3-й степени. При анализе антропометрических данных средние показатели роста составили  $170 \pm 15$  см, веса —  $95 \pm 15$  кг соответственно. По данным общеклинических, лабораторных и инструментальных исследований установлено, что в общем анализе крови у 2 (6,25%) пациентов выявлено ускорение СОЭ и эозинофилия, у одного человека (3,125%) — повышенное содержание лейкоцитов; у 2 (6,25%) — отклонения в общем анализе мочи в виде повышения количества лейкоцитов, наличия бактерий и солей; в биохимическом

анализе крови у 6 (18,75%) наблюдалось повышение уровня общего холестерина, у 4 пациентов (12,5%) — повышение уровня билирубина в крови, у троих пациентов (9,38%) выявлено повышение уровня трансаминаз (АЛТ, АСТ).

У пациентов с жалобами на боли в эпигастрии (14 человек) проводилась ФГДС, по результатам которой наличие хронического гастрита подтверждено у 14 (43,75%) обследуемых. При этом бактерия *Helicobacter pylori* была обнаружена у 6 (18,75%) пациентов (тест-система Хелпил для инвазивной экспресс-диагностики инфекции *Helicobacter pylori* по уреазной активности биоптата, полученного в ходе эндоскопического исследования слизистой оболочки желудка). По данным УЗИ органов брюшной полости, у 13 (40,625%) пациентов подтвержден жировой гепатоз, у 5 (15,625%) дискинезия желчевыводящих путей. Также по данным анамнеза, у части обследуемых имеет место наличие сопутствующих хронических заболеваний: хронический бронхит — у 2 (6,25%), желчнокаменная болезнь — у 1 (3,125%), остеохондроз — у 5 (15,625%); хронический аутоиммунный тиреоидит — у 3 (9,375%); хронический тонзиллит — у 2 (6,25%), артериальная гипертензия — у 2 (6,25%), пиелит и мочекаменная болезнь — у 2 (8,33%); аллергические реакции в анамнезе имелись у половины пациентов (16 человек; 50,0%).

Как обсуждалось выше, адипогенез зависит от активности и цикличности WNT-сигнального пути, который функционирует посредством белков, в том числе  $\beta$ -катенина и склеростина. Многофакторный анализ в исследованиях некоторых авторов [4, 6, 13] показал, что уровень склеростина в сыворотке крови значительно коррелировал с уровнями липопротеинов низкой плотности и гомоцистеина.

Нами было проведено сравнение уровня склеростина у пациентов с ожирением (32 человека) и у здоровых лиц с нормальной массой тела (20

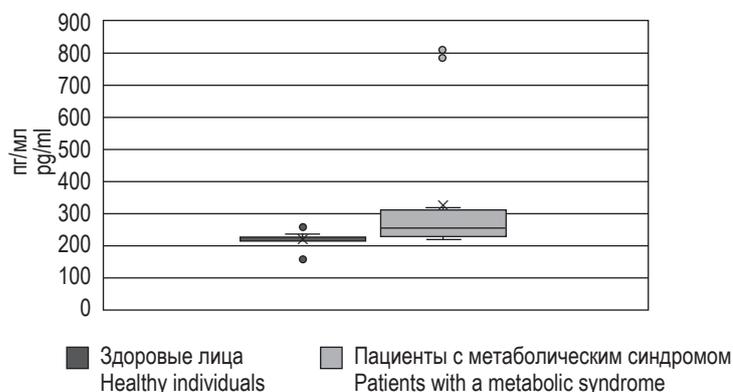


Рисунок 1. Концентрация склеростина в сыворотке крови (пг/мл)

Figure 1. Sclerostin concentration in blood serum (pg/ml)

**ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ СКЛЕРОСТИНА И β-КАТЕНИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ОЖИРЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ (пг/мл)**

TABLE 1. SCLEROSTIN AND β-CATENIN CONCENTRATION IN BLOOD SERUM DEPENDING ON THE PATIENTS DEGREE OF OBESITY (pg/ml)

Белок Protein (m)		Исследуемые группы по степени ожирения Study groups by degree of obesity		p
		I степень I degree	II степень II degree	
Склеростин Sclerostin		249,06	366,0	0,003
β-катенин β-catenin		168,78	126,25	0,004
Кол-во пациентов Number of patients	n	18	12	
	%	56,25	37,5	
Белок Protein (m)		I степень I degree	III степень III degree	p
Склеростин Sclerostin		249,06	811,0	0,019
β-катенин β-catenin		168,78	130,0	0,205
Кол-во пациентов Number of patients	n	18	2	
	%	56,25	6,25	
Белок Protein (m)		II степень II degree	III степень III degree	p
Склеростин Sclerostin		366,0	811,0	0,026
β-катенин β-catenin		126,25	130,0	0,455
Кол-во пациентов Number of patients	n	12	2	
	%	37,5	6,25	

Примечание. p – достоверность различий между показателями рассчитана согласно непараметрическому U-критерию Манна–Уитни; различия считали достоверными и статистически значимыми при  $p < 0,05$ ; m – среднее арифметическое концентрации склеростина и β-катенина (пг/мл).

Note. p, significance of differences between indicators is calculated according to the nonparametric Mann–Whitney U test; the differences are considered reliable and statistically significant when  $p < 0.05$ ; m, a sclerostin and β-catenin concentration mean (pg/ml).

человек), условно принимаемых за физиологическую норму, сопоставимых по полу и возрасту с больными исследуемой группы. Методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови у па-

циентов определяли концентрацию склеростина (рис. 1). Выявлены достоверные изменения: повышение уровня склеростина у лиц с метаболическим синдромом (260 (230–308,75) пг/мл) на

13,5% по сравнению со здоровыми лицами (225 (220-230) пг/мл, ( $p < 0,001$ )), что согласуется с источниками литературы [4, 6, 7, 13].

Учитывая важную роль  $\beta$ -катенина в регуляции адипогенеза, для нас также представляла интерес оценка его продукции у пациентов с ожирением. По результатам исследований у пациентов с метаболическим синдромом (141 (128,5-185) пг/мл) и у здоровых лиц (66,0 (59,5-125)) была установлена широкая вариабельность значений концентрации  $\beta$ -катенина в сыворотке крови,  $p < 0,001$ .

Согласно современным представлениям [1, 4, 6, 8, 13], передача сигналов WNT/ $\beta$ -catenin ингибирует адипогенез. Нарушение передачи сигналов WNT/ $\beta$ -catenin приводит к спонтанному адипогенезу, что указывает на то, что эндогенные WNT сдерживают дифференцировку преадипоцитов. В совокупности описанные ранее исследования [1, 3, 4, 6, 13] предоставляют убедительные доказательства того, что передача сигналов WNT/ $\beta$ -catenin сдерживает мезенхимных предшественников от дифференцировки в адипоциты, одновременно стимулируя остеобластогенез и миогенез. В связи с этим представляло интерес оценить содержание белков склеростина и  $\beta$ -катенина в сыворотке крови у пациентов с разной степенью ожирения. В таблице 1 представлен уровень концентрации склеростина и  $\beta$ -катенина в зависимости от степени ожирения.

В ходе исследования установлено, что у пациентов с ожирением II степени наблюдалось повышение уровня склеростина ( $p = 0,003$ ) одновременно со снижением концентрации  $\beta$ -катенина в зоне достоверных различий ( $p = 0,004$ ). У лиц с ожирением III степени зарегистрировано значительное повышение уровня склеростина по сравнению с лицами I степени ( $p = 0,019$ ), также отмечено снижение концентрации  $\beta$ -катенина ( $p = 0,205$ ). У пациентов с ожирением III степени наблюдалось значительное повышение уровня склеростина ( $p = 0,026$ ) по сравнению с больными II степени и незначительные изменения концентрации  $\beta$ -катенина ( $p = 0,455$ ).

## Выводы

Таким образом, у пациентов с метаболическим синдромом отмечалась широкая вариабельность уровня склеростина с выявленной тенденцией к увеличению, в зависимости от степени ожирения. Более того, у исследуемых больных повышение уровня склеростина в сыворотке крови происходило, чаще всего, на фоне снижения  $\beta$ -катенина, что согласуется с данными литературы и может рассматриваться в качестве прогностического критерия течения патологического процесса при ожирении.

Конфликт интересов отсутствует.

## Список литературы / References

1. Amrein K., Amrein S., Drexler C., Dimai H. P., Dobnig H., Pfeifer K., Tomaschitz A., Pieber T.R., Astrid Fahrleitner-Pammer A. Sclerostin and its association with physical activity, age, gender, body composition, and bone mineral content in healthy adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2012, Vol. 97, no. 1, pp. 148-154.
2. Bodine P.V., Stauffer B., Ponce-de-Leon H., Bhat R.A. A small molecule inhibitor of the WNT antagonist secreted frizzled-related protein-1 stimulates bone formation. *Bone*, 2009, Vol. 44, no. 6, pp. 1063-1068.
3. Burgers T.A., Williams B.O. Regulation of WNT/ $\beta$ -catenin signaling within and from osteocytes. *Bone*, 2013, Vol. 54, no. 2, pp. 244-249.
4. Chen D., Xie R., Shu B., Landay A.L., Wei C. WNT signaling in bone, kidney, intestine, and adipose tissue and inter-organ interaction in aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2019, Vol. 1442, no. 1, pp. 48-60.
5. Christodoulides C., Lagathu C., Sethi J.K., Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signaling. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2009, Vol. 20, no. 1, pp. 16-24.
6. Kim S.P., Frey J.L., Li Z., Kushwaha P., Zoch M.L., Tomlinson R.E., Da H., Aja S.M., Noh H.L., Kim J.K., Hussain M., Thorek D.L.J., Wolfgang M.J., Riddle R. Sclerostin influences body composition by regulating catabolic and anabolic metabolism in adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, Vol. 114, no. 52, pp. E11238-E11247.
7. Klangjareonchai T., Nimitphong H., Saetung S., Bhirommuang N., Samittarucksak R., Sudatip R., Ongphiphadhanakul B. Circulating sclerostin and irisin are related and interact with gender to influence adiposity in adults with prediabetes. *Int. J. Endocrinol.*, 2014, Vol. 2014, 261545. doi: 10.1155/2014/261545.
8. Krause C., Korchynskyi O., Rooij K., Weidauer S.E., Gorter D.J. Distinct modes of inhibition by sclerostin on bone morphogenetic protein and WNT signaling pathways. *Biol. Chem.*, 2010, Vol. 285, no. 53, pp. 41614-41626.
9. Malinauskas T., Aricescu R., Lu W., Siebold C., Jones E.Y. Modular mechanism of WNT signaling inhibition by WNT inhibitory factor 1. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011, Vol. 18, no. 8, pp. 886-893.
10. Medeiros M.C., Rocha N., Bandeira E., Dantas I., Serum sclerostin, body composition, and sarcopenia in hemodialysis patients with diabetes. *Int. J. Nephrol.*, 2020, Vol. 2020, 4596920. doi: 10.1155/2020/4596920.
11. Ng L.F., Kaur P., Bunnag N., Suresh J., Sung I.C.H., Tan Q.H., Gruber J., Tolwinski N.S. WNT signaling in disease. *Cells*, 2019, Vol. 8, no. 8, pp. 826-857.

12. Saito-Diaz K, Chen T.W., Wang X., Thorne C.A., Wallace H.A. The way WNT works: components and mechanism. *Growth Factors*, 2013, Vol. 31, no. 1, pp. 1-31.

13. Urano T., Shiraki M., Ouchi Y., Inoue S. Association of circulating sclerostin levels with fat mass and metabolic disease: related markers in Japanese postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2012, Vol. 97, pp. 1473-1477.

14. Witte F., Dokas J., Neuendorf F., Mundlos S., Stricker S. Comprehensive expression analysis of all WNT genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *Gene Expr. Patterns*, 2009, Vol. 9, no. 4, pp. 215-223.

---

**Авторы:**

**Кулакова А.С.** — врач-гастроэнтеролог ГАУЗ «Брянская областная больница № 1», г. Брянск, Россия

**Снимщикова И.А.** — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой иммунологии и специализированных клинических дисциплин, директор Медицинского института ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», г. Орел, Россия

**Плотникова М.О.** — старший преподаватель кафедры иммунологии и специализированных клинических дисциплин Медицинского института ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», г. Орел, Россия

**Authors:**

**Kulakova A.S.**, Gastroenterologist, Bryansk Regional Hospital No. 1, Bryansk, Russian Federation

**Snimshchikova I.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology and Specialized Clinical Disciplines, Director of Medical Institute, I. Turgenev Oryol State University, Oryol, Russian Federation

**Plotnikova M.O.**, Senior Lecturer, Department of Immunology and Specialized Clinical Disciplines, I. Turgenev Oryol State University, Oryol, Russian Federation

---

Поступила 09.06.2020  
Принята к печати 28.07.2020

Received 09.06.2020  
Accepted 28.07.2020

## ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ФЛАВОНОИДЫ, НА МОДЕЛИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Михайлова И.В.<sup>1</sup>, Перунова Н.Б.<sup>2</sup>, Иванова Е.В.<sup>1,2</sup>, Чайникова И.Н.<sup>1,2</sup>, Кузьмичева Н.А.<sup>1</sup>, Филиппова Ю.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

<sup>2</sup> Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Резюме.** Существенным достоинством лекарственных препаратов растительного происхождения является их слабая токсичность для человека и совокупное действие комплекса биологически активных веществ, преимущественно полисахаридов, флавоноидов и терпеноидов. Один из механизмов влияния лекарственных растений на процессы иммунорегуляции реализуется через воздействие на продукцию определенного спектра цитокинов. В работе проведено исследование иммунорегуляторной активности водных извлечений из лекарственного растительного сырья (ЛРС), содержащего полифенольные соединения – флавоноиды (рутин, кверцетин, называемые Р-витаминами). Целью исследования явилась оценка профиля и уровня цитокинов, секретируемых мононуклеарами периферической крови человека под влиянием водных извлечений ЛРС, содержащих флавоноиды. Использованы водные извлечения ЛРС (1:10) следующих видов: листья смородины черной (*Ribes nigrum L.*), трава хвоща полевого (*Equisetum arvense L.*), трава тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium L.*), корни солодки (*Glycyrrhiza uralensis Fisch.*), цветки бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium (L.) Moench*), листья земляники лесной (*Fragaria vesca L.*), плоды черемухи обыкновенной (*Padus avium Mill.*), цветки пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare L.*) и трава овса посевного (*Avena sativa L.*), приобретенных через аптечную сеть. Продукция про- (TNF $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ ) и противовоспалительного (IL-10) цитокинов исследовалась с помощью ИФА («Цитокин», Россия) в супернатанте культуры мононуклеаров в присутствии ЛРС (опыт) и без добавления настоев (контроль). Количественное определение суммы флавоноидов в цветках и листьях проводили на основе реакции комплексообразования с алюминия хлоридом на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония). Установлено преимущественно ингибирующее влияние водных извлечений из ЛРС на уровень секреции как про- (TNF $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ ), так и противовоспалительного (IL-10) цитокинов. Выраженность супрессивного эффекта влияния водных извлечений из лекарственных растений на секрецию

### Адрес для переписки:

Михайлова Ирина Валерьевна  
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ  
460000, Россия, г. Оренбург, Парковый пр., 7.  
Тел.: 8 (905) 886-44-48.  
E-mail: michaylova74@yandex.ru

### Address for correspondence:

Mikhailova Irina V.  
Orenburg State Medical University  
460000, Russian Federation, Orenburg, Park ave., 7.  
Phone: 7 (905) 886-44-48.  
E-mail: michaylova74@yandex.ru

### Образец цитирования:

И.В. Михайлова, Н.Б. Перунова, Е.В. Иванова, И.Н. Чайникова, Н.А. Кузьмичева, Ю.В. Филиппова «Иммунорегуляторные эффекты лекарственных растений, содержащих флавоноиды, на модели мононуклеарных клеток периферической крови человека» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 139-144.  
doi: 10.46235/1028-7221-330-IEO

© Михайлова И.В. и соавт., 2020

### For citation:

I.V. Mikhailova, N.B. Perunova, E.V. Ivanova, I.N. Chaunikova, Yu.V. Filippova, N.A. Kuzmicheva "Immunoregulatory effects of flavonoid-containing medicinal herbs in human peripheral blood mononuclear cells", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 139-144.  
doi: 10.46235/1028-7221-330-IEO

DOI: 10.46235/1028-7221-330-IEO

цитокинов составляла от  $51,5 \pm 3,4$  до  $99,5 \pm 4,1\%$  в сравнении с контрольным значением ( $p < 0,05$ ). Установлено наличие прямой связи суммарного содержания флавоноидов в изученных пробах ЛРС с выраженностью их иммунорегуляторной активности по влиянию на секрецию цитокинов: для  $\text{TNF}\alpha$  ( $r = 0,65$ ), IL-8 ( $r = 0,4$ ), IL-1 $\beta$  ( $r = 0,48$ ) и IL-10 ( $r = 0,68$ ). Результаты настоящего исследования позволяют заключить, что извлечения из изученного лекарственного растительного сырья могут рассматриваться как перспективные компоненты на этапе разработки препаратов, обладающих иммунорегуляторным и антифлогогенным эффектами.

*Ключевые слова:* мононуклеары, цитокины, водные извлечения, лекарственные растения, флавоноиды

## IMMUNOREGULATORY EFFECTS OF FLAVONOID-CONTAINING MEDICINAL HERBS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

Mikhailova I.V.<sup>a</sup>, Perunova N.B.<sup>b</sup>, Ivanova E.V.<sup>a, b</sup>, Chaynikova I.N.<sup>a, b</sup>,  
Filippova Yu.V.<sup>a</sup>, Kuzmicheva N.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Abstract.** Plant-derived medicinal products provide a prominent advantage due to their low toxicity to humans and combined effects of biologically active substances, mainly presented by polysaccharides, flavonoids and terpenoids. One of the mechanisms underlying effects from medicinal plants on the immunoregulation-related events is mediated via controlled production of certain cytokines. Here we examined immunoregulatory activity of water extracts derived from medicinal plant raw materials (LRS) containing polyphenolic compounds – flavonoids (rutin, quercetin, called P-vitamins). The aim of the study was to assess profile and level of cytokines secreted by human peripheral blood mononuclear cells exposed to flavonoid-containing LRS water extracts. LRS (1:10) water extracts of the following species were used: black currant leaves (*Ribes nigrum* L.), field horsetail grass (*Equisetum arvense* L.), common yarrow grass (*Achillea millefolium* L.), licorice roots (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.), sand immortelle flowers (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench), wild strawberry leaves (*Fragaria vesca* L.), fruit common bird cherry (*Padus avium* Mill.), tansy flowers (*Tanacetum vulgare* L.) and oat grass (*Avena sativa* L.) (all purchased at the pharmacy). Production of pro – ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines was measured by using ELISA kits (“Cytokine”, Russia) in mononuclear cell culture supernatant treated with / without LRS (experiment and control group, respectively). Amount of flavonoids contained in flowers and leaves was quantified after complexation reaction with aluminum chloride on UV-3600 spectrophotometer (Shimadzu, Japan). It was found that LRS water extracts predominantly inhibited production both of pro- ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines so that magnitude of such suppressive effect ranged from  $51.5 \pm 3.4$  to  $99.5 \pm 4.1\%$  compared to untreated control samples ( $p < 0.05$ ). Total flavonoid level in the LRS samples directly correlated with intensity of related immunoregulatory activity on cytokine secretion particularly  $\text{TNF}\alpha$  ( $r = 0.65$ ), IL-8 ( $r = 0.4$ ), IL-1 $\beta$  ( $r = 0.48$ ) and IL-10 ( $r = 0.68$ ). The data of our study allow to conclude that extracts from the examined medicinal plant raw materials can be considered as promising components while developing new drugs with exhibiting immunoregulatory and antiflogogenic effects.

*Keywords:* mononuclear cells, cytokines, aqueous extract, medicinal plants, flavonoids

### Введение

Альтернативой традиционной терапевтической стратегии в отношении инфекционно-воспалительных заболеваний человека является использование лекарственных растений с иммунорегуляторной и противовоспалительной активностью. Как правило, противовоспалительной (антифлогоген-

ной) и иммунорегуляторной активностью обладают вторичные метаболиты растений – флавоноиды, алкалоиды, терпены [11, 12].

В данной работе акцентируется внимание на исследовании иммунорегуляторной активности отдельных представителей растительных антифлогистиков – флавоноидов. Флавоноиды – по-

лифенольные соединения, содержащие 15 углеродных атомов, образующих два ароматических кольца, соединенных с помощью трехуглеродного мостика. Эти соединения, являющиеся вторичными метаболитами, чаще в виде гликозидных форм, выявляются во всех частях растений, где они выполняют важные функции, определяя пигментацию, запах, вкус, рост, репродукцию и обеспечивая природный иммунитет и резистентность к различным патогенным факторам микробного происхождения [2, 4, 13].

Существенным достоинством лекарственных препаратов растительного происхождения является их, в большинстве случаев, слабая токсичность для человека, а также то, что они действуют на организм всем комплексом содержащихся в них веществ. Иммуномодулирующая активность лекарственных средств может быть обусловлена совокупным действием комплекса биологически активных веществ, преимущественно, полисахаридов, флавоноидов и терпеноидов [8, 11].

Иммуномодулирующая и противовоспалительная активность флавоноидов, связанная с воздействием на различные звенья воспалительной реакции, может реализовываться различными механизмами. Один из механизмов влияния лекарственных растений на процессы иммунорегуляции реализуется через воздействие на продукцию определенного спектра цитокинов [9, 14, 15]. Учитывая структурное разнообразие флавоноидов, представляется перспективным оценить вклад лекарственных растений, содержащих различные группы флавоноидов, в проявление иммуномодулирующей активности (индукция/супрессия продукции цитокинов) *in vitro* на модели клеток адаптивного иммунитета человека.

**Целью настоящего исследования** явилось изучение профиля и уровня цитокинов, секретируемых мононуклеарами периферической крови человека, под влиянием водных извлечений лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды.

## Материалы и методы

В работе были использованы водные извлечения (1:10) лекарственного растительного сырья (СЛР) следующих видов: листья смородины черной (*Ribes nigrum L.*), трава хвоща полевого (*Equisetum arvense L.*) (ООО «Беловодье», Россия), трава тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium L.*), корни солодки (*Glycyrrhiza uralensis Fisch.*), цветки бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium (L.) Moench*) (ООО «Кима», Россия), листья земляники лесной (*Fragaria vesca L.*) (ООО «Компания Хорст», Россия), плоды черемухи обыкновенной (*Padus avium Mill.*) (ООО «Здоровье», Россия), цвет-

ки пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare L.*) (АО «Красногорсклексредства», Россия) и трава овса посевного (*Avena sativa L.*) (ООО «НК-модель», Россия), приобретенных через аптечную сеть.

Количественное определение суммы флавоноидов в цветках и листьях проводили методом дифференциальной спектрофотометрии (спектрофотометр UV-3600, Shimadzu, Япония) на основе реакции комплексообразования с алюминия хлоридом. Расчет содержания суммы флавоноидов проводили в пересчете на доминирующий флавоноид и абсолютно сухое сырье по удельному показателю поглощения.

Иммунорегуляторную активность водных извлечений ЛРС определяли на модели мононуклеаров периферической крови (ПМК) здоровых лиц (доноров). Исследования проведены в соответствии с «Правилами лабораторной практики в РФ» (Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003). Для этого готовили настои ЛР (1:10) путем 10-минутного кипячения на водяной бане, после чего выполняли стерилизующую фильтрацию с помощью фильтров Filtropur S 0,45 (Sarstedt, Германия). Водные извлечения хранили при 6 °С не более 24-48 ч. Мононуклеарные лейкоциты выделяли из крови здоровых доноров методом градиентного центрифугирования (400 g) в градиенте плотности фиколл-верографин (Pharmacia, Швеция) плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup>. Продукция про- (TNF $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ ) и противовоспалительного (IL-10) цитокинов исследовалась в супернатанте культуры мононуклеаров при сокультивировании их с водными извлечениями ЛРС (опыт) и без добавления водных извлечений ЛРС (контроль) после 24-часовой инкубации клеток ( $2 \times 10^6$ ) при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в полной культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10%-ной инактивированной фетальной сыворотки (Sigma, США) и 80 мкг/мл гентамицина.

Исследования проводили в 3 дублях для каждого растения и каждого вида цитокинов. Уровень спонтанной продукции цитокинов в супернатанте после сокультивирования мононуклеаров с водными извлечениями ЛРС исследовали ИФА («Цитокин», Санкт-Петербург). Регистрация результатов проводилась на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия), длина волны 492 нм.

Результаты проведенных исследований обрабатывались методами вариационной статистики с использованием программы Statistica 10.0, включая методы параметрического (критерий Стьюдента), непараметрического (критерий Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни, корреляционного (коэффициент Спирмена) анализов. Различия считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Наибольшее содержание суммы флавоноидов было установлено в водных извлечениях из травы бессмертника песчаного ( $3,98 \pm 0,05$  мг/г), превышающее в 2-3 раза концентрации некоторых исследуемых извлечений ( $p \leq 0,05$ ). Минимальное содержание флавоноидов выявлено в водных извлечениях из травы овса посевного ( $0,34 \pm 0,02$  мг/г), хвоща полевого ( $0,71 \pm 0,01$  мг/г) и травы тысячелистника обыкновенного ( $0,96 \pm 0,03$  мг/г). Диапазон определяемых концентраций флавоноидов в остальных извлечениях из изученного ЛРС составил от  $2,4 \pm 0,01$  до  $3,0 \pm 0,05$  мг/г.

Анализ иммунорегуляторной активности исследуемых водных извлечений из ЛРС позволил установить, что все исследуемое ЛРС подавляло спонтанную продукцию мононуклеарами провоспалительных цитокинов – TNF $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ), а извлечения из ЛРС бессмертника, зверобоя, пижмы, черной смородины, земляники и корня солодки супрессировали продукцию IL-10 ( $p < 0,05$ ).

Выраженность ингибирующего эффекта в отношении секреции цитокинов для TNF $\alpha$  у водных извлечений из бессмертника, черной смородины, пижмы, земляники и корня солодки изменялась в пределах от  $73,6 \pm 1,2$  до  $82,6 \pm 2,3\%$ , из тысячелистника, хвоща и овса составляла в среднем  $54,3 \pm 9,5\%$  по отношению к контролю. Для IL-8 уровень супрессии изменялся в диапазоне от  $81,1 \pm 3,6\%$  у водных извлечений из черной смородины и земляники, до  $99,5 \pm 4,1\%$  – у всех остальных ЛРС, за исключением извлечения из овса, не влияющего на продукцию данного хемокина.

Все анализируемые водные извлечения ЛРС ингибировали продукцию IL-1 $\beta$ : бессмертник, зверобой, пижма на  $91,2 \pm 6,3$  –  $95,7 \pm 3,5\%$  в сравнении с контрольным значением ( $p < 0,05$ ); черная смородина, земляника, черемуха и корень солодки – на  $67,9 \pm 1,2$  –  $74,0 \pm 1,8\%$ . У водного извлечения из хвоща, тысячелистника и овса в отношении IL-1 $\beta$  ингибирующий эффект, по сравнению с контролем, был наименьшим и составлял  $51,4 \pm 2,3$  –  $56,9 \pm 1,5\%$  ( $p < 0,05$ ). В отношении IL-10 у бессмертника, зверобоя, пижмы, черной смородины, земляники и корня солодки выявлен ингибирующий эффект по сравнению с контролем в диапазоне от 66,1 до 91,4%. Уровень IL-10 в опытных пробах составил 1,5 (0,5-2,1) – 5,9 (4,5-7,6) пг/мл против 17,4 (15,9-18,4) в контроле ( $p < 0,05$ ). Не влияли на секрецию IL-10 водные извлечения из хвоща, тысячелистника и овса.

Корреляционный анализ установил прямую связь между суммарным содержанием флавоноидов в водных извлечениях из ЛРС и выраженно-

стью их иммунорегуляторной активности, оцениваемой по уровню секреции цитокинов: для TNF $\alpha$  ( $r = 0,65$ ), IL-8 ( $r = 0,4$ ), IL-1 $\beta$  ( $r = 0,48$ ) и IL-10 ( $r = 0,68$ ).

Раскрытие механизмов регулирующего влияния флавоноидов и их производных на клетки-эффекторы адаптивного иммунитета позволяет обосновать их таргетную «мишень» – направленное применение при ряде патологических состояний организма человека. Выраженный иммуномодулирующий эффект, опосредованный ограничением продукции IL-6, IL-17 и усилением секреции IL-10, показан для тритерпеноида милиацина при экспериментальной сальмонеллезной инфекции [1].

Флавоноиды и их производные *in vitro* ингибируют различные транскрипционные факторы, которые модулируют дифференцировку, пролиферацию, активацию иммунных клеток и усиливают генерацию регуляторных Т-клеток [7]. Некоторые флавоноиды оказывают противовоспалительное действие через блокаду NF- $\kappa$ B и инфламмосомы NLRP3, ингибирование продукции провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-17A, снижение секреции хемокинов и образования активных форм кислорода и азота [10].

Для отдельного ЛРС показана способность подавлять секрецию цитокинов и функцию Th17- и Th1-лимфоцитов [3], что может иметь значение в терапии аутоиммунных заболеваний. Подавление активности фактора транскрипции NF- $\kappa$ B и, как следствие, ингибция секреции провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-6 показаны для ряда лекарственных сборов, применяемых у больных ревматоидным артритом [5]. Установлено, что природные флавоноиды проявляют оптимальные иммуномодулирующие свойства в предотвращении иммуноопосредованных нарушений путем регулирования баланса Th1/Th2-цитокинов [6].

## Заключение

Очевидно, что установленное в нашей работе ингибирование секреции про- и противовоспалительных цитокинов водными извлечениями из исследуемого ЛРС обусловлено совокупным действием их компонентного состава, в том числе и флавоноидов, что подтверждается корреляционными связями уровня секреции цитокинов и суммарного содержания флавоноидов в полученных извлечениях. Результаты настоящего исследования позволяют заключить, что исследуемые растительные экстракты могут рассматриваться как перспективные компоненты на этапе разработки препаратов, обладающих иммунорегуляторным и противовоспалительным эффектами.

## Список литературы / References

1. Фролов В.А., Чайникова И.Н., Филиппова Ю.В., Смолягин А.И., Панфилова Т.В., Железнова А.Д. Механизмы реализации защитного действия милиацина при экспериментальной сальмонеллезной инфекции: влияние на эндотоксинемию и продукцию цитокинов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2014. № 5. С. 8-12. [Frolov V.A., Chaynikova I.N., Filippova Yu.V., Smolyagin A.I., Panfilova T.V., Zheleznova A.D. Mechanisms for the implementation of the protective effect of miliacin in experimental salmonella infection: effect on endotoxemia and cytokine production. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 5, pp. 8-12. (In Russ.)]
2. Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci.*, 2012, no. 196, pp. 67-76.
3. Asadi-Samani M., Bagheri N., Rafieian-Kopaei M., Shirzad H. Inhibition of Th1 and Th17 cells by medicinal plants and their derivatives: A systematic review. *Phytother. Res.*, 2017, Vol. 31, no. 8, pp. 1128-1139.
4. Biswas T., Dwivedi U.N. Plant triterpenoid saponins: biosynthesis, *in vitro* production, and pharmacological relevance. *Protoplasma*, 2019, Vol. 256, no. 6, pp. 1463-1486.
5. Farzaei M.H., Farzaei F., Abdollahi M., Abbasabadi Z., Abdolghaffari A.H., Mehraban B. A mechanistic review on medicinal plants used for rheumatoid arthritis in traditional Persian medicine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2016, Vol. 68, no. 10, pp. 1233-1248.
6. Gandhi G.R., Neta M., Sathiyabama R.G., Quintans J., de Oliveira E, Silva A.M., Araújo A., Narain N., Júnior L., Gurgel R. Q. Flavonoids as Th1/Th2 cytokines immunomodulators: A systematic review of studies on animal models. *Phytomedicine*, 2018, Vol. 44, pp. 74-84.
7. Hosseinzade A., Sadeghi O., Naghdipour Biregani A., Soukhtehzari S., Brandt G.S., Esmailzadeh A. Immunomodulatory effects of flavonoids: possible induction of T CD4<sup>+</sup> regulatory cells through suppression of mTOR pathway signaling activity. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, pp. 41-51.
8. Kumar S., Pandey A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci. World J.*, 2013, Vol. 2013, 162750. doi: 10.1155/2013/162750.
9. Leyva-López N., Gutierrez-Grijalva E.P., Ambriz-Perez D.L., Heredia J.B. Flavonoids as cytokine modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 6, 921. doi: 10.3390/ijms17060921.
10. Martínez G., Mijares M.R., de Sanctis J.B. Effects of flavonoids and its derivatives on immune cell responses. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, 2019, Vol. 13, no. 2, pp. 84-104.
11. Moses T., Papadopoulou K.K., Osbourn A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2014, Vol. 49, no. 6, pp. 439-462.
12. Silva V., Dos Santos M.H., Viegas C. Biological and chemical aspects of natural biflavonoids from plants: A brief review. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2017, Vol. 17, no. 10, pp. 834-862.
13. Shirley B.W. Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends Plant Sci.*, 1996, Vol. 1, no. 11, pp. 377-382.
14. Yi Y.S. Regulatory roles of flavonoids on inflammasome activation during inflammatory responses. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2018, Vol. 62, no 13, e1800147. doi: 10.1002/mnfr.201800147.
15. Zhang B., Wang B., Cao S., Wang Y., Wu D. Silybin attenuates LPS-induced lung injury in mice by inhibiting NF-κB signaling and NLRP3 activation. *Int. J. Mol. Med.*, 2017, Vol. 39, no. 5, pp. 1111-1118.

---

### Авторы:

**Михайлова И.В.** — д.б.н., доцент, заведующая кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

**Перунова Н.Б.** — д.м.н., профессор РАН, заведующая лабораторией биомониторинга и молекулярно-генетических исследований, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

### Authors:

**Mikhailova I.V.**, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

**Perunova N.B.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory for Biomonitoring and Molecular Genetic Research, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Иванова Е.В.** — д.м.н., доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; ведущий научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Чайникова И.Н.** — д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; ведущий научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Филиппова Ю.В.** — к.м.н., ассистент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

**Кузьмичева Н.А.** — ассистент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

**Ivanova E.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University; Leading Research Associate, Laboratory of Biomonitoring and Molecular Genetic Research, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Chaunikova I.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Normal Physiology, Orenburg State Medical University; Leading Research Associate, Laboratory of Biomonitoring and Molecular Genetic Research, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Filippova Yu.V.**, PhD (Medicine), Assistant, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

**Kuzmicheva N.A.**, Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

---

Поступила 09.06.2020  
Принята к печати 06.07.2020

Received 09.06.2020  
Accepted 06.07.2020

# ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ И МАКРОФАГОВ СЕЛЕЗЕНКИ ЖИВОТНЫХ С МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА И ИХ КОРРЕКЦИЯ АМИНОДИГИДРОФТАЛАЗИНДИОНОМ НАТРИЯ *IN VITRO*

Поздина В.А.<sup>1,2</sup>, Данилова И.Г.<sup>1</sup>, Абидов М.Т.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup> Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

<sup>3</sup> Институт иммунологии и профилактической медицины, г. Любляна, Словения

**Резюме.** Макрофаги обнаруживаются во всех тканях и органах и обладают функциональной пластичностью, которая необходима для поддержания гомеостаза, регенерации тканей и иммунитета. Фенотип макрофагов определяется сигналами микроокружения. Традиционно выделяют классически (M1) или альтернативно (M2) активированные макрофаги. В патогенезе сахарного диабета (СД1) M1-макрофаги способствуют повреждению островков Лангерганса, потере β-клеток, вызывая аутофагию, которая может привести к развитию персистирующей инфекции. Развитие инфекции увеличивает риск смерти от гриппа или пневмонии у больных СД1. Поэтому представляется интересным изучение функционального ответа резидентных макрофагов органов и тканей, не являющихся мишенями при развитии сахарного диабета, а также их ответ на стимуляцию АДФН, который в ряде работ показывал модулирующее действие на иммунокомпетентные клетки.

В работе были исследованы морфологические и функциональные характеристики культуры макрофагов различной тканевой принадлежности, выделенные у интактных животных (ИЖ) и животных с моделью сахарного диабета 1 типа (СД1) в условиях стимуляции их веществом-модулятором макрофагов аминодигидрофталазиндионом натрия (АДФН) *in vitro* в условиях 24- и 72-часового культивирования. Исследование проводили на культурах макрофагов крысы, полученных из легких и селезенки. Определяли следующие морфометрические показатели: площадь клетки, цитоплазмы и ядер, а также ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Фенотип макрофагов определяли по оптической плотности экспрессии маркера CD163 (макрофагов типа M2) и CD80 (макрофаги M1).

## Адрес для переписки:

Поздина Варвара Александровна  
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»  
Уральского отделения Российской академии наук  
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.  
Тел.: 8 (343) 374-00-70.  
E-mail: varvara.pozdina@gmail.com

## Address for correspondence:

Pozdina Varvara A.  
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian  
Academy of Sciences  
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,  
Pervomayskaya str., 106.  
Phone: 7 (343) 374-00-70.  
E-mail: varvara.pozdina@gmail.com

## Образец цитирования:

В.А. Поздина, И.Г. Данилова, М.Т. Абидов  
«Имунофенотипические особенности альвеолярных  
макрофагов и макрофагов селезенки животных с  
моделью сахарного диабета 1 типа и их коррекция  
аминодигидрофталазиндионом натрия *in vitro*»  
// Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23,  
№ 2. С. 145-152.  
doi: 10.46235/1028-7221-350-IAO

© Поздина В.А. и соавт., 2020

## For citation:

V.A. Pozdina, I.G. Danilova, M.T. Abidov  
“Immunophenotypical aspects of lung and spleen macrophages  
derived animals with the model of alloxan diabetes (type I)  
and their correction by sodium aminodiglydrophthalazindione  
*in vitro*”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 145-152.  
doi: 10.46235/1028-7221-350-IAO

DOI: 10.46235/1028-7221-350-IAO

Функциональную активность макрофагов оценивали по уровню цитокинов IL-1 $\alpha$ , IL-10 и TNF $\alpha$  в супернатантах культур. Воздействие АДФН на макрофаги животных с СД1 через 24 ч культивирования также приводило к изменению морфометрических параметров (уменьшению размеров ядра и клетки макрофагов селезенки, увеличению размеров ядра альвеолярных макрофагов, росту ЯЦО у макрофагов селезенки) и синтетической активности клеток (повышению уровня IL-1 $\alpha$  и TNF $\alpha$  практически во всех популяциях клеток). Через 72 ч культивирования уровни секреции IL-1 $\alpha$  и TNF $\alpha$  снижались у альвеолярных макрофагов, у макрофагов селезенки уровень секреции TNF $\alpha$  снижался, а IL-1 $\alpha$  увеличивался. Экспрессия поверхностноклеточных маркеров M1- и M2-фенотипов также была подвержена действию АДФН. В особенности было отмечено увеличение экспрессии CD163 у стимулированных альвеолярных макрофагов, выделенных из животных с СД1.

*Ключевые слова:* альвеолярные макрофаги, макрофаги селезенки, аминоксидигидрофтализиндион натрия

## IMMUNOPHENOTYPICAL ASPECTS OF LUNG AND SPLEEN MACROPHAGES DERIVED ANIMALS WITH THE MODEL OF ALLOXAN DIABETES (TYPE I) AND THEIR CORRECTION BY SODIUM AMINODIGYDROPH TALAZINDIONE *IN VITRO*

Pozdina V.A.<sup>a, b</sup>, Danilova I.G.<sup>a</sup>, Abidov M.T.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Ural Research Institute of Phthisiopulmonology, Branch of National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Institute of Immunology and Preventive Medicine, Ljubljana, Slovenia

**Abstract.** Macrophages are found in all tissues and organs and display functional plasticity, which is necessary to maintain homeostasis, tissue regeneration and immunity. The macrophage phenotype is determined by microenvironment signals. Macrophages are traditionally classified into subsets- such as classically (M1) or alternatively (M2) activated macrophages. In the pathogenesis of diabetes mellitus (T1DM), M1 macrophages contribute to damage to the islets of Langerhans, loss of  $\beta$ -cells, causing autophagy, which can result in development of persistent infection increasing the risk of death from influenza or pneumonia in patients with type 1 diabetes. Therefore, it seems Important to study functional response of resident macrophages in organs and tissues not targeted in development of diabetes mellitus, as well as in response to ADPH stimulation that showed modulatory effect on immunocompetent cells.

In this study morphological and functional characteristics of macrophage cell cultures obtained from different sites in intact animal (IA) and modeled type 1 diabetes mellitus (DM1) were investigated. For this, we examined macrophage cell cultures isolated from rat liver and peritoneal cavity to be stimulated *in vitro* for 24 and 72 hours with a sodium aminodigydroph talazindione. Cells, nucleus, cytoplasm area were measured and nuclear cytoplasmic ratio (NCR) were calculated. The phenotype was determined by surface expression of CD163 (M2-macrophages) and CD80 (M1-macrophages) receptors. Macrophage cytokine activity was determined by measuring IL-1 $\alpha$ , IL-10 и TNF $\alpha$  level. ADPH effects on animal macrophages with DM1 after 24 h of exposure also led to a changed morphometric parameters (decreased size of the nucleus and cells of the spleen macrophages, increased size of the nucleus of the alveolar macrophages, increased NCR in spleen macrophages) and production activity of the cells (increased levels of IL-1 $\alpha$  and TNF  $\alpha$  in almost all cell populations). After 72 h of cultivation, the levels of IL-1 $\alpha$  and TNF $\alpha$  decreased in alveolar macrophages, splenic macrophages, whereas TNF $\alpha$  level was decreased, but IL-1 $\alpha$  amount was increased. The expression of surface cell markers for M1 and M2 phenotypes was also affected by ADPH so that CD163 expression was increased in stimulated alveolar macrophages isolated from animals with type 1 diabetes.

*Keywords:* alveolar macrophages, spleen macrophages, sodium aminodigydroph talazindione

Принятые сокращения: АДФН – аминоксидогидрофталазиндион натрия; АМф – альвеолярные макрофаги; МфС – макрофаги селезенки; СД1 – сахарный диабет 1 типа; ППС – полная питательная среда; ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение; FBS – фетальная бычья сыворотка.

## Введение

Макрофаги образуют систему фагоцитирующих мононуклеаров, представленную во всех тканях и органах и обладающую функциональной пластичностью, которая необходима для поддержания гомеостаза и регенерации тканей и иммунитета против патогенных микроорганизмов [8]. Фенотип макрофагов определяется сигналами, которые они получают из широко изменяющегося микроокружения. Традиционно выделяют классически (M1) или альтернативно (M2) активированные макрофаги [5]. Макрофаги типа M1 демонстрируют повышенную фагоцитарную активность, экспрессируют провоспалительные маркеры и секретируют цитокины, в частности такие, как CD80, CD86, TNF $\alpha$  и IL-1 $\alpha$ . Макрофаги типа M2 выполняют противоположные функции, экспрессируя противовоспалительные маркеры (CD163, CD206) и секретируя цитокины (IL-10), факторы ангиогенеза и фиброгенеза (TGF- $\beta$ ), а также стимулируют прекращение воспалительной реакции, служат заживлению раны и участвуют в поддержании тканевого гомеостаза [6, 7, 10].

Гибель  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, приводящая к гипoinsулинемии, является причиной, вызывающей развитие СД1 и его многочисленных осложнений. В патогенезе СД1 макрофаги с фенотипом M1 играют существенную роль, так как они способствуют повреждению островков Лангерганса и потере  $\beta$ -клеток, вызывая аутофагию, которая может привести к развитию персистирующей инфекции. Инфекция вызывает особую обеспокоенность у пациентов с СД1, так как на фоне хронического воспалительного заболевания возрастает риск смерти от гриппа или пневмонии, поскольку пациенты с СД1 более подвержены вторичным инфекциям [12].

В наших предыдущих исследованиях в модели аллоксанового диабета (СД1) было показано, что использование модулятора макрофагов аминоксидогидрофталазиндиона натрия (АДФН) способствует пролиферации  $\beta$ -клеток островков Лангерганса, снижению уровня глюкозы, гликированного гемоглобина, увеличению содержания инсулина в крови [3]. Признание роли макрофагов в регенерации  $\beta$ -клеток дает возможность для углубления нашего понимания того, как макро-

фаги могут влиять на гомеостаз других органов и тканей, не являющихся мишенями при развитии сахарного диабета.

В связи с вышеизложенным в работе была поставлена задача подробно изучить особенности функционирования различных популяций резидентных макрофагов, выделенных из органов, не являющихся мишенями СД1, животных с моделью СД1. Кроме того, в условиях *in vitro* оценивали клеточный ответ и изменение морфофункциональных параметров макрофагов, подвергшихся стимуляции АДФН, который в ряде работ показывал модулирующее действие на иммунокомпетентные клетки [2, 3].

## Материалы и методы

В работе использовали 20 самцов крыс Wistar в возрасте 3 месяцев и весом  $210 \pm 5,16$  г. Животных, из которых получали макрофаги, делили на две группы по 10 голов: интактные животные (ИЖ) и животные с моделью СД1 (СД1). Для моделирования производили внутрибрюшинное введение аллоксана, разведенного в 0,85%-ном растворе хлорида натрия, в суммарной дозе 300 мг/кг массы тела животного по модифицированной авторской методике [1]. Через 30 суток после первого введения аллоксана развивался СД1, для верификации которого в плазме крови крыс определяли концентрацию глюкозы ( $19,78 \pm 4,8$  ммоль/л), а в цельной крови – гликированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>) ( $6,3 \pm 0,52\%$ ). Все эксперименты на животных были одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (№-d-ГМ-2016-20) и выполнены в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС.

Альвеолярные макрофаги (АМф) получали из бронхоальвеолярной жидкости методом альвеолярного лаважа теплым раствором Хэнкса в объеме 3–4 мл [12]. Получение макрофагов селезенки (МфС) производили путем фрагментирования с помощью ножниц извлеченной селезенки с небольшим количеством (5 мл) раствора Хэнкса [9]. Полученные суспензии клеток центрифугировали на холоде 5 минут при 1500 g. Клеточный осадок ресуспендировали в полной питательной среде и добавляли по 2 мл в 6-луночные планшеты с покровными стеклами. Для культивирования клеток использовали культуральную среду RPMI-1640 («Биолот», Россия) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки FBS («Биолот», Санкт-Петербург) (10% от общего объема среды), а также антибиотик гентамицин в концентрации 40 мкг/мл. Выделение макрофагов основывалось на особенностях их адгезивности (разделение на прилипающую и неприлипающую

щую фракции) [9]. Через 1 час культивирования клеточной суспензии в полной питательной среде 6-луночные планшеты промывали раствором Хэнкса. Затем в очищенную культуру макрофагов добавляли свежую ППС и культивировали в течение 24 ч при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

Через 24 часа культивирования в полученные культуры макрофагов добавляли АДФН (натриевую соль 5-амино-2,3-дигидрофалазин-1,4-диона) в дозе 10 мкг/мл на 24 и 72 ч. По истечении сроков культивирования в присутствии АДФН супернатант клеток сливали и замораживали для иммуоферментного анализа, покровные стекла с клетками в планшетах фиксировали 10%-ным раствором формалина в течение 5 минут.

В качестве морфометрических показателей определяли площадь клетки, цитоплазмы и ядра, а также ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Для определения фенотипа макрофагов клетки окрашивали иммуоцитохимически на поверхностные маркеры CD80 (MA5-16510) и CD163 (MA5-16658, ThermoFisher, США). Степень экспрессии CD80<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup> макрофагов оценивали по оптической плотности окраски. Обработку изображений производили на базе УНИИФ – филиала ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России с помощью оптического микроскопа Carl Zeiss Axio Observer D1 (Zeiss, Германия), подключенной к нему камеры AxioCam 512 (Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2.6 (Zeiss, Германия).

**ТАБЛИЦА 1. МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ (АМф) И МАКРОФАГОВ СЕЛЕЗЕНКИ (МфС), ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ (ИЖ) И ЖИВОТНЫХ С МОДЕЛЬЮ 30-СУТОЧНОГО СД1 (СД1) И КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В ОТСУТСТВИЕ (КОНТРОЛЬ, К) И В ПРИСУТСТВИИ 10 мкг/мл АДФН (АДФН) В ТЕЧЕНИЕ 24 И 72 ЧАСОВ**

**TABLE 1. MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF ALVEOLAR MACROPHAGES (AM<sub>φ</sub>) AND SPLEEN (SM<sub>φ</sub>) MACROPHAGES ISOLATED FROM INTACT ANIMALS (IA) AND ANIMALS WITH A MODEL OF 30-DAY-OLD T1DM (T1DM) AND CULTURED IN THE ABSENCE (CONTROL, C) AND IN THE PRESENCE OF 10 μg/ml ADPH (ADPH) FOR 24 AND 72 HOURS**

Мф и жив-е Mφ and An-s	Время, час Time, hour	Площадь ядра, мкм <sup>2</sup> Nucleus area, mkm <sup>2</sup>		Площадь клетки, мкм <sup>2</sup> Cell area, mkm <sup>2</sup>		ЯЦО NCR	
		К C	АДФН ADPN	К C	АДФН ADPN	К C	АДФН ADPN
АМф, ИЖ AMφ, IA	24	159,65±20,60	97,04±21,96 <sup>a</sup>	926,04±32,92	522,27±152,74 <sup>a</sup>	0,33±0,07	0,43±0,20
	72	160,25±15,55 <sup>a</sup>	177,44±10,72 <sup>a, b</sup>	534,767±135,270 <sup>a</sup>	674,92±104,35 <sup>a, b</sup>	0,69±0,06 <sup>a</sup>	0,71±0,13 <sup>a</sup>
АМф, СД1 AMφ, T1DM	24	151,76±29,62	162,00±21,07	608,33±217,48 <sup>a</sup>	693,60±145,63	0,41±0,01 <sup>b</sup>	0,45±0,04 <sup>b</sup>
	72	182,37±20,92	128,58±20,58 <sup>d</sup>	1136,75±302,10 <sup>b, c</sup>	863,83±398,04	0,45±0,16	0,31±0,05
МфС, ИЖ SMφ, IA	24	178,34±15,83	96,78±17,04 <sup>e</sup>	864,88±130,22	366,66±52,39 <sup>e</sup>	0,19±0,05	0,47±0,10
	72	100,560±2,215 <sup>e</sup>	96,12±9,51 <sup>e</sup>	442,37±5,70 <sup>e</sup>	261,76±3,39 <sup>e, f</sup>	0,33±0,12	1,06±0,27 <sup>e, f</sup>
МфС, СД1 SMφ, T1DM	24	223,19±9,23 <sup>f</sup>	79,21±59,11 <sup>g</sup>	834,57±71,58 <sup>f</sup>	434,33±210,36	0,59±0,06	0,22±0,07
	72	76,85±11,27 <sup>e, g</sup>	93,67±26,29 <sup>g</sup>	481,73±14,14	558,99±164,36	0,23±0,04 <sup>e, f</sup>	0,36±0,01

Примечание. Определяли достоверность различий между образцами стимулированных и не стимулированных клеток, принадлежащих к одной популяции и выделенных из обеих групп животных (ранговый анализ Краскела–Уоллиса). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ : <sup>a</sup> – от группы «АМф 24 ч, ИЖ»; <sup>b</sup> – от группы «АМф 72 ч, ИЖ»; <sup>c</sup> – от группы «АМф 24 ч, СД1»; <sup>d</sup> – от группы «АМф 72 ч, СД1»; <sup>e</sup> – от группы «МфС 24 ч, ИЖ»; <sup>f</sup> – от группы «МфС 72 ч, ИЖ»; <sup>g</sup> – от группы «МфС 24 ч, СД1».

Note. The significance of differences between the samples of stimulated and non-stimulated cells belonging to the same population and isolated from both groups of animals was determined (rank analysis of Kruskal-Wallis). The differences were considered significant at  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>, from "AM<sub>φ</sub> 24 h, IA"; <sup>b</sup>, from "AM<sub>φ</sub> 72 h, IA"; <sup>c</sup>, from "AM<sub>φ</sub> 24 h, T1DM"; <sup>d</sup>, from "AM<sub>φ</sub> 72 h, T1DM"; <sup>e</sup>, from "SM<sub>φ</sub> 24 h, IA"; <sup>f</sup> from "SM<sub>φ</sub> 72 h, IA"; <sup>g</sup>, from "SM<sub>φ</sub> 24 h, T1DM".

Для анализа функциональной активности макрофагов в супернатантах исследуемых образцов оценивали продукцию следующих цитокинов: IL-1 $\alpha$ , IL-10 и TNF $\alpha$ . Концентрацию цитокинов рассчитывали на основе уравнения, описывающего зависимость оптической плотности от концентрации цитокина в калибровочных образцах. Оптическую плотность измеряли на гибридном фотометре Lazurite Automated Elisa System (Dy nex Technologies Inc., США) и с помощью наборов для иммуноферментного анализа на IL-1 $\alpha$ , IL-10 и TNF $\alpha$  крысы (BMS627, BMS629T WO и BMS622 соответственно; Bioscience, Ирландия).

Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью программы STATISTICA.12. Вычисляли среднее арифметическое, ошибку среднего и стандартное отклонение. Определяли достоверность различий между образцами клеток, принадлежащих к одной популяции (ранговый анализ Краскела–Уоллиса). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Морфометрический анализ стимулированных АДФН макрофагов представлен в таблице 1, он позволил выявить следующие закономерности: АДФН действует на все исследуемые популяции макрофагов вне зависимости от группы животных, из которых были выделены макрофаги; наиболее выраженные изменения происходят в течение 24-часового культивирования в присутствии 10 мкг/мл АДФН.

При культивировании АМф, выделенных из интактных животных, с АДФН в дозе 10 мкг/мл было отмечено увеличение площади ядра к 72 часам культивирования. У АМф, выделенных из животных с СД1 и культивированных с АДФН 10 мкг/мл, к 72 часам наблюдалось уменьшение значения исследуемого параметра. У МфС, вне зависимости от группы животных, из которых были получены клетки, при культивировании с исследуемой дозой АДФН значимое уменьшение площади ядра происходило в первые 24 часа культивирования (табл. 1).

**ТАБЛИЦА 2. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ (АМф) И МАКРОФАГОВ СЕЛЕЗЕНКИ (МфС), ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ (ИЖ) И ЖИВОТНЫХ С МОДЕЛЬЮ 30-СУТОЧНОГО СД1 (СД1) И КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В ОТСУТСТВИИ (КОНТРОЛЬ, К) И В ПРИСУТСТВИИ 10 мкг/мл АДФН (АДФН) В ТЕЧЕНИЕ 24 И 72 ЧАСОВ**

TABLE 2. PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF ALVEOLAR MACROPHAGES (AM $\phi$ ) AND SPLEEN (SM $\phi$ ) MACROPHAGES ISOLATED FROM INTACT ANIMALS (IA) AND ANIMALS WITH A MODEL OF 30-DAY-OLD T1DM (T1DM) AND CULTURED IN THE ABSENCE (CONTROL, C) AND IN THE PRESENCE OF 10  $\mu$ g/ml ADPH (ADPH) FOR 24 AND 72 HOURS

МФ и жив-е M $\phi$ and An-s	Время, час Time, hour	Экспрессия маркеров фенотипа M1 и M2 (усл. ед.) Expression of markers of phenotype M1 and M2 (RVU)			
		CD80 (M1)		CD163 (M2)	
		К C	АДФН ADPN	К C	АДФН ADPN
АМф, ИЖ AM $\phi$ , IA	24	0,401 $\pm$ 0,190	0,312 $\pm$ 0,190	0,315 $\pm$ 0,160	0,158 $\pm$ 0,030 <sup>a</sup>
	72	0,509 $\pm$ 0,130	0,431 $\pm$ 0,070	0,536 $\pm$ 0,100	0,196 $\pm$ 0,040 <sup>a, b</sup>
АМф, СД1/ AM $\phi$ , T1DM	24	0,271 $\pm$ 0,130	0,346 $\pm$ 0,030	0,113 $\pm$ 0,020 <sup>a, b</sup>	0,297 $\pm$ 0,090 <sup>c</sup>
	72	0,231 $\pm$ 0,140	0,212 $\pm$ 0,100	0,536 $\pm$ 0,100	0,495 $\pm$ 0,160 <sup>c</sup>
МфС, ИЖ SM $\phi$ , IA	24	0,220 $\pm$ 0,050	0,274 $\pm$ 0,070	0,189 $\pm$ 0,030	0,174 $\pm$ 0,050
	72	0,368 $\pm$ 0,100	0,437 $\pm$ 0,030 <sup>d</sup>	0,372 $\pm$ 0,250	0,477 $\pm$ 0,050 <sup>e</sup>
МфС, СД1/ SM $\phi$ , T1DM	24	0,138 $\pm$ 0,050	0,368 $\pm$ 0,160	0,244 $\pm$ 0,060	0,314 $\pm$ 0,130
	72	0,270 $\pm$ 0,020 <sup>f</sup>	0,200 $\pm$ 0,090	0,352 $\pm$ 0,040 <sup>g</sup>	0,245 $\pm$ 0,170

Примечание. Определяли достоверность различий между образцами стимулированных и не стимулированных клеток принадлежащих к одной популяции и выделенных из обеих групп животных (ранговый анализ Краскела–Уоллиса). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ : <sup>a</sup> – от «CD163 АМф 24 ч, ИЖ»; <sup>b</sup> – от «CD163 АМф 72 ч, ИЖ»; <sup>c</sup> – от «CD163 АМф 24 ч, СД1»; <sup>d</sup> – от «CD80 МфС 24 ч, ИЖ»; <sup>e</sup> – от «CD163 МфС 24 ч, ИЖ»; <sup>f</sup> – от «CD80 МфС 24 ч, СД1»; <sup>g</sup> – от «CD163 МфС 24 ч, СД1».

Note. The significance of differences between the samples of stimulated and non-stimulated cells belonging to the same population and isolated from both groups of animals was determined (rank analysis of Kruskal-Wallis). The differences were considered significant at  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>, from “CD163 AM $\phi$  24 h, IA”; <sup>b</sup>, from “CD163 AM $\phi$  72 h, IA”; <sup>c</sup>, from “CD163 AM $\phi$  24 h, T1DM”; <sup>d</sup>, from “CD80 SM $\phi$  24 h, IA”; <sup>e</sup>, from “CD163 SM $\phi$  24 h, IA”; <sup>f</sup>, from “CD80 SM $\phi$  24 h, T1DM”; <sup>g</sup>, from “CD163 SM $\phi$  24 h, T1DM”.

**ТАБЛИЦА 3. СЕКРЕТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МФ (АМф) И МФ СЕЛЕЗЕНКИ (МфС), ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ (ИЖ) И ЖИВОТНЫХ С МОДЕЛЬЮ 30-СУТОЧНОГО СД1 (СД1) И КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В ОТСУТСТВИЕ (КОНТРОЛЬ, К) И В ПРИСУТСТВИИ 10 мкг/мл АДФН (АДФН) В ТЕЧЕНИЕ 24 И 72 ЧАСОВ**

TABLE 3. SECRETORY CHARACTERISTICS OF ALVEOLAR MACROPHAGES (AM<sub>φ</sub>) AND SPLEEN MACROPHAGES (SM<sub>φ</sub>) ISOLATED FROM INTACT ANIMALS (IA) AND ANIMALS WITH A MODEL OF 30-DAY-OLD T1DM (T1DM) AND CULTURED IN THE ABSENCE (CONTROL, C) AND IN THE PRESENCE OF 10 μg/ml ADPH (ADPH) FOR 24 AND 72 HOURS

МФ и жив-е Mφ and An-s	Время, час Time, hour	Синтез цитокинов, пкг/мл Synthesis of cytokines, pcg/ml					
		IL-1α		IL-10		TNFα	
		К C	АДФН ADPN	К C	АДФН ADPN	К C	АДФН ADPN
АМф, ИЖ AMφ, IA	24	563,33±47,18	771,67±58,47 <sup>a</sup>	144,41±59,32	240,25±37,21 <sup>a</sup>	416,75±69,03	1242,58±414,30 <sup>a</sup>
АМф, СД1 AMφ, T1DM	24	658,33±30,02	765,56±85,25	178,34±48,36	205,53±68,83	848,42±57,67 <sup>a</sup>	1545,92±318,41
	72	380,04±35,07 <sup>a, b</sup>	769,44±22,57 <sup>c</sup>	200,25±39,23	183,34±42,18	466,75±55,36 <sup>a, b</sup>	232,58±83,19 <sup>a, b, c</sup>
МфС, ИЖ SMφ, IA	24	667,78±41,17	787,78±15,56 <sup>a</sup>	130,25±41,30	185,32±24,07	360,92±64,68	547,58±78,86 <sup>a</sup>
МфС, СД1 SMφ, T1DM	24	752,22±79,93	503,33±53,57 <sup>a, b</sup>	165,74±17,02	151,38±32,47	988,42±219,58 <sup>a</sup>	1174,25±237,40 <sup>a</sup>
	72	507,22±82,80 <sup>a, b</sup>	768,33±94,23 <sup>b</sup>	106,92±27,33	144,47±28,37	955,08±406,62	466,75±227,16

Примечание. Определяли достоверность различий между образцами стимулированных и не стимулированных клеток принадлежащих к одной популяции и выделенных из обеих групп животных (ранговый анализ Краскела-Уоллиса). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ : <sup>a</sup> – от «К 24 ч, ИЖ»; <sup>b</sup> – от «К 24 ч, СД1»; <sup>c</sup> – от «К 72 ч, СД1».

Note. The significance of differences between the samples of stimulated and non-stimulated cells belonging to the same population and isolated from both groups of animals was determined (rank analysis of Kruskal-Wallis). The differences were considered significant at  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>, from “C 24 h, IA”; <sup>b</sup>, from “C 24 h, T1DM”; <sup>c</sup>, from “C 72 h, T1DM”.

У АМф, выделенных из интактных животных в период 24-часового культивирования с 10 мкг/мл АДФН, происходило уменьшение площади клеток. К 72 часам значение данного параметра увеличивалось. Площадь клетки у АМф, выделенных из животных с СД1, не изменялась относительно не стимулированного контроля. У МфС, выделенных из интактных животных, стимуляция АДФН *in vitro* приводила к уменьшению площади клеток через оба срока культивирования (табл. 1).

Наиболее выраженное действие АДФН оказал на изменение параметра ЯЦО у МфС, выделенных из интактных животных к 72 часам культивирования клеток с веществом. Данный параметр был значимо увеличен относительно не стимулированного контроля (табл. 1).

Анализ экспрессии М1- и М2-маркеров фенотипов макрофагов представлен в таблице 2.

В условиях стимуляции 10 мкг/мл АДФН АМф, выделенных из интактных животных, на-

блюдалось снижение экспрессии CD163 через оба срока культивирования клеток. У АМф, выделенных из животных с СД1, с увеличением времени культивирования с АДФН наблюдалось усиление экспрессии CD163. Действие АДФН не было обнаружено в отношении экспрессии CD80 у альвеолярных макрофагов (табл. 2).

У МфС, выделенных из интактных животных и культивируемых в присутствии АДФН, к 72 часам было отмечено усиление экспрессии CD80 и CD163 относительно не стимулированного контроля. Действия АДФН на МфС, выделенных из животных с СД1, отмечено не было (табл. 2).

Анализ секреции цитокинов IL-1α, IL-10, TNFα представлен в таблице 3.

У АМф, выделенных из интактных животных и культивированных с 10 мкг/мл АДФН в течение 24 часов, происходило увеличение синтеза всех исследуемых цитокинов. Воздействие АДФН на АМф, выделенных из животных с СД1, приводило к увеличению синтеза IL-1α и уменьшению

синтеза TNF $\alpha$  к 72 часам культивирования с веществом. Продукция IL-10 к 72 часам культивирования под действием АДФН не менялась.

Синтез IL-1 $\alpha$  и TNF $\alpha$  к 24 часам культивирования с АДФН МФС, выделенных из интактных животных, также увеличивался. Макрофаги селезенки, выделенные из животных с СД1 и культивируемые в течение 24 часов, показывали повышенные уровни цитокинов IL-1 $\alpha$  и TNF $\alpha$ . Воздействие АДФН на эти клетки в течение 24 часов культивирования приводило к снижению уровня IL-1 $\alpha$  и увеличению уровня TNF $\alpha$ , тогда как культивирование с 10 мкг/мл АДФН в течение 72 часов, наоборот, приводило к увеличению IL-1 $\alpha$  и уменьшению TNF $\alpha$ . Уровень секреции IL-10 у МФС под воздействием АДФН не изменялся.

## Обсуждение

Исследование показало влияние АДФН на секреторную активность макрофагов. Воздействие АДФН, как и в наших предыдущих исследованиях на различных моделях *in vivo*, изменяет количество медиаторов воспаления, таких как TNF $\alpha$  и IL-1 $\alpha$  до уровней, измеренных у интактных животных [3, 4]. Воздействие АДФН на макрофаги животных с СД1 через 24 часа культивирования также приводило к изменению морфометриче-

ских параметров (уменьшению размеров ядра и клетки макрофагов селезенки, увеличению размеров ядра альвеолярных макрофагов, росту ЯЦО у макрофагов селезенки) и синтетической активности клеток (повышению уровня IL-1 $\alpha$  и TNF $\alpha$  практически во всех популяциях клеток). Через 72 часа культивирования уровни IL-1 $\alpha$  и TNF $\alpha$  снижались у альвеолярных макрофагов, у макрофагов селезенки уровень TNF $\alpha$  снижался, а IL-1 $\alpha$  увеличивался.

Экспрессия поверхностноклеточных маркеров M1- и M2-фенотипов также была подвержена действию АДФН. В особенности, было отмечено увеличение экспрессии CD163 у стимулированных альвеолярных макрофагов, выделенных из животных с СД1.

Было показано, что альвеолярные макрофаги и макрофаги селезенки имеют морфометрическую, фенотипическую и синтетическую разнородность, которая зависит от состояния организма, органа выделения клеток и выполняемой этим органом функции. Необходимо отметить: краткосрочное культивирование клеток (24 часа) позволяет наиболее точно оценить цитокиновый профиль клеток, и это наблюдение должно учитываться при постановке экспериментов по репрограммированию фенотипа и цитокинового профиля макрофагов.

## Список литературы / References

1. Данилова И.Г., Гетте И.Ф., Булавинцева Т.С. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент России № 2534411, 2014. Бюл. № 33. С.1-7. [Danilova I.G., Gette I.F., Bulavintseva T.S. Method for simulating alloxan diabetes. Russian Patent No. 2534411, 2014, Bull. No. 33, pp. 1-7.]
2. Данилова И.Г., Емельянов В.В., Гетте И.Ф., Медведева С.Ю., Булавинцева Т.С., Черешнева М.В., Сидорова Л.П., Черешнев В.А. Соколова К.В. Цитокиновая регуляция регенераторных процессов в поджелудочной железе при аллоксановом сахарном диабете у крыс и его коррекции соединением ряда 1, 3, 4-тиадиазина и липоевой кислотой // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 35-44. [Danilova I.G., Emelianov V.V., Gette I.F., Medvedeva S.Y., Bulavintseva T.S., Cheresheva M.V., Sidorova L.P., Cheresheva V.A., Sokolova K.V. Cytokine regulation of regenerative processes in pancreatic gland in alloxan-diabetic rats, and its correction by 1, 3, 4-thiadiazine composition and lipoic acid. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 35-44. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-35-44.
3. Danilova I.G., Bulavintseva T.S., Gette I.F., Medvedeva S.Y. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, Vol. 95, pp. 103-110.
4. Danilova I.G., Shafigullina Z.A., Gette I.F., Sencov V.G., Medvedeva S.Y., Abidov M.T. Accelerated liver recovery after acute CCl<sub>4</sub> poisoning in rats treated with sodium phthalhydrazide. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 80, pp. 106-124.
5. Ginhoux F., Schultze J.L., Murray P.J., Ochando J., Biswas S.K. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat. Immunol.*, 2016, Vol. 17, pp. 34-40.
6. Guillermo A. D., Albert D. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, pp. 1-12.
7. Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.J., Law S.K., Moestrup S.K. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 2001, Vol. 409, pp. 198-201.
8. Murray P.J., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, pp. 723-737.

9. Ogawa K., Tsurutani M., Hashimoto A. et al. Simple propagation method for resident macrophages by co-culture and subculture, and their isolation from various organs. *BMC Immunol.*, 2019, Vol. 20, p. 34. doi: 10.1186/s12865-019-0314-z.
10. Peach R.J., Bajorath J., Naemura J., Leytze G., Greene J., Aruffo A., Linsley P.S. Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *J. Biol. Chem.*, 1995, Vol. 270, pp. 21181-21187.
11. Song J.A., Yang H.S., Lee J., et al. Standardization of bronchoalveolar lavage method based on suction frequency number and lavage fraction number using rats. *Toxicol Res.*, 2010, Vol. 26, no. 3, pp. 203-208.
12. Sunahara K.K.S., Nunes F.P.B., Baptista M.A.P., Strell C., Westerberg L.S., Martins J.O. Insulin influences autophagy response distinctively in macrophages of different compartments. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2014, Vol. 34, no. 6, pp. 2017-2026.

---

**Авторы:**

**Поздина В.А.** — младший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; младший научный сотрудник научного отдела микробиологии и доклинических исследований, Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

**Данилова И.Г.** — д.б.н., заведующая лабораторией морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

**Абидов М.Т.** — д.м.н., сотрудник Института иммунологии и профилактической медицины, Любляна, Словения

---

**Authors:**

**Pozdina V.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Junior Research Associate, Scientific Department of Microbiology and Preclinical Research, Ural Research Institute of Phthisiopulmonology, Branch of National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Yekaterinburg, Russian Federation

**Danilova I.G.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

**Abidov M.T.**, PhD, MD (Medicine), Employee, Institute of Immunology and Preventive Medicine, Ljubljana, Slovenia

---

Поступила 15.06.2020  
Принята к печати 01.07.2020

---

Received 15.06.2020  
Accepted 01.07.2020

## ОЦЕНКА АНТИМУТАГЕННОГО ЭФФЕКТА ТРИТЕРПЕНОИДА МИЛИАЦИНА У МЫШЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Сарычева Ю.А.<sup>1</sup>, Токарева А.А.<sup>1</sup>, Штиль А.А.<sup>2</sup>, Колыванова М.А.<sup>3</sup>,  
Морозов В.Н.<sup>3</sup>, Панфилова Т.В.<sup>1</sup>, Фролов Б.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

**Резюме.** В условиях воздействия ионизирующего излучения изучен антимутагенный эффект три-терпеноида милиацина для оценки его протекторных свойств при радиационной иммуносупрессии. Использованы мыши (CBAxС57Bl6)F1, разделенные на 4 группы: 1) интактные; 2) подвергнутые облучению; 3) подвергнутые облучению после предварительного введения милиацина; 4) облученные после предварительного введения растворителя для милиацина. Облучение животных проведено на рентгеновской установке «РУСТ-М1» при дозе 4 Гр и экспозиции 288 с. Тест-системой служили милокарициты, анализ которых был проведен через 24 часа после облучения. Трехкратное предварительное введение милиацина в разовой дозе 4 мг/кг ослабляло мутагенный эффект облучения как по содержанию аберрантных клеток, так и по количеству аберраций на 100 метафазных пластинок. Вместе с тем эта протекция была существенно менее выраженной, чем при ранее установленной в условиях химического мутагенеза, что свидетельствует об ограниченных возможностях милиацина в защите центрального органа системы иммунитета – красного костного мозга при лучевом воздействии.  
*Ключевые слова:* милокарициты, ионизирующее излучение, мутагенный эффект, милиацин

## EVALUATION OF TRITERPENOID MILIACIN-RELATED ANTI-MUTAGENIC EFFECT IN MICE EXPOSED TO IONISING RADIATION

Sarycheva Yu.A.<sup>a</sup>, Tokareva A.A.<sup>a</sup>, Shtil A.A.<sup>b</sup>, Kolyvanova M.A.<sup>c</sup>,  
Morozov V.N.<sup>c</sup>, Panfilova T.V.<sup>a</sup>, Frolov B.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Russian State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Triterpenoid miliacin-related anti-mutagenic effect after exposure to ionizing radiation was studied to assess its protective properties against radiation-induced immunosuppression. (CBAxС57Bl6)F1

### Адрес для переписки:

Сарычева Юлия Александровна  
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ  
460000, Россия, г. Оренбург, Парковый пр., 7.  
Тел.: 8 (922) 550-47-57.  
E-mail: djsarycheva1985@mail.ru

### Address for correspondence:

Sarycheva Yuliya A.  
Orenburg State Medical University  
460000, Russian Federation, Orenburg, Park ave., 7.  
Phone: 7 (922) 550-47-57.  
E-mail: djsarycheva1985@mail.ru

### Образец цитирования:

Ю.А. Сарычева, А.А. Токарева, А.А. Штиль, М.А. Колыванова, В.Н. Морозов, Т.В. Панфилова, Б.А. Фролов «Оценка антимутагенного эффекта три-терпеноида милиацина у мышей при воздействии ионизирующего излучения» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 153-156.  
doi: 10.46235/1028-7221-331-EOT

© Сарычева Ю.А. и соавт., 2020

### For citation:

Yu.A. Sarycheva, A.A. Tokareva, A.A. Shtil, M.A. Kolyvanova, V.N. Morozov, T.V. Panfilova, B.A. Frolov "Evaluation of triterpenoid miliacin-related anti-mutagenic effect in mice exposed to ionising radiation", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 153-156.  
doi: 10.46235/1028-7221-331-EOT

DOI: 10.46235/1028-7221-331-EOT

mice were subdivided into four groups: 1) intact mice; 2) irradiated mice; 3) miliacin-pretreated irradiated mice; and 4) miliacin-solvent-pretreated irradiated mice. Irradiation of animals was performed on the X-ray device "RUST-M1" (4 Gy; exposure time 288 sec.). Twenty four hours post irradiation myelokaryocytes were isolated for analysis. Chromosome preparations were examined by light microscopy. Injections of miliacin (4 mg/kg daily for 3 consecutive days) attenuated the irradiation-triggered mutagenic effect assessed by counting cells with chromosomal aberrations as well as number of aberrations per 100 metaphase plates. Miliacin exerted a protective effect on radiation-induced chromosomal aberrations, although degree of protection was less pronounced compared to chemically induced mutagenesis. These data indicate about limited potential for miliacin to protect central immune organs such as red bone marrow upon radiation exposure.

*Keywords: myelokaryocytes, ionizing radiation, mutagenic effect, miliacin*

## Введение

Протекция структурно-функциональных нарушений иммунной системы при воздействии различных факторов среды служит важным подходом к предупреждению/ограничению развития вторичных иммунодефицитов и связанных с ними осложнений. Не меньшую актуальность эта проблема имеет и в клинической практике, где иммуносупрессия выступает неблагоприятным побочным результатом при использовании методов химио- и лучевой терапии, существенно ограничивая возможности лечения больных вплоть до его отмены [5]. Среди разрабатываемых иммунопротекторов интерес исследователей в последнее время все больше проявляется в отношении веществ растительного происхождения в силу их определенной эффективности и высокой переносимости [1]. К числу таких веществ относится пентациклический тритерпеноид – милиацин (3-β-метокси-Δ<sup>18</sup>-олеанен), содержащийся в просяном масле. В ранее выполненных экспериментальных работах был определен защитный эффект милиацина в виде ослабления супрессии гуморального и клеточного иммунного ответа, снижения выраженности клеточного опустошения тимуса, красного костного мозга и селезенки, сокращения скорости восстановления клеточных популяций органов иммуногенеза при иммобилизационном стрессе [4], действии ксенобиотика – метотрексата [2, 3], бактериальной инфекции [8] у животных. Вместе с тем защитная способность милиацина в отношении иммунной системы при лучевом воздействии не исследовалась. Как известно, ключевой характеристикой повреждающего влияния такого воздействия является мутагенный эффект, наиболее полно реализуемый на уровне миелокариоцитов, которые служат источником различных популяций лейкоцитов, определяющих становление естественного и адаптивного иммунитета [9].

Очевидно, что нарушения генетического аппарата клеток красного костного мозга могут рассматриваться в качестве приоритетного механизма радиационной иммуносупрессии, а огра-

ничение таких нарушений – в качестве механизма иммунопротекции.

Ранее была показана способность милиацина существенно снижать относительное содержание аберрантных клеток и число aberrаций в клетках костного мозга мышей в условиях применения циклофосфана [6].

**Целью работы** является оценка антимуtagenного эффекта милиацина при действии ионизирующего излучения.

## Материалы и методы

Исследования выполнены на 40 особях мышей-самцов (СВАхС57В16) F1, массой около 20 г, разделенных на 4 группы: 1) интактные (фоновая группа); 2) подвергнутые только облучению (группа сравнения); 3) подвергнутые облучению после предварительного введения милиацина (опытная группа); 4) подвергнутые облучению после предварительного введения растворителя для милиацина – твина 21 ( $1,6 \times 10^{-7}$  моль/кг) (контроль). Милиацин вводили трехкратно, внутрибрюшинно, в разовой дозе 4 мг/кг в объеме 0,5 мл с 24-часовыми интервалами между введениями, завершавшимися за 1 сутки до облучения. По аналогичной схеме проводилось введение растворителя. Тотальное облучение мышей осуществляли однократно с помощью рентгеновской установки «РУСТ-М1». Доза облучения – 4 Гр при экспозиции 288 секунд. Животных 2-й, 3-й, 4-й групп выводили из эксперимента (дислокация шейных позвонков) через 24 часа после облучения. В эти же сроки осуществлялся забой интактных мышей.

Для фиксации хромосом в метафазе раствор колхицина (0,04%) вводили мышам внутрибрюшинно (0,1 мл / 10,0 г веса) за 1 час до забоя. Получение, обработка клеток костного мозга, изготовление препаратов и их окрашивание проводились ранее описанными методами [6]. Анализ хромосомных нарушений выполняли методом световой микроскопии (10 × 10), исследуя клетки округлой формы с видимым разбросом хромосом и модульным числом 40. В препаратах от каждого животного подсчитывали не менее 100 метафазных пластинок (МП), определяя от-

носительное количество МП (%) с абберациями и суммарное число аббераций на 100 МП. Статистическую обработку проводили методами вариационной статистики с оценкой различий между средними величинами по t-критерию Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Миелокарициты интактных мышей характеризовались низким удельным содержанием клеток с хромосомными абберациями (0,37%) при минимальном значении количества аббераций на 100 МП (0-1). Облучение оказывало резко выраженный мутагенный эффект, проявлявшийся возрастанием содержания абберантных клеток практически до абсолютных значений:  $91,6 \pm 0,9\%$  (min – 87, max – 94), при высоком количестве самих аббераций, составившим  $351,0 \pm 14,9$  (min – 293, max – 413) на 100 МП. У животных, получавших перед облучением растворитель, исследуемые параметры мутагенеза были идентичны группе сравнения, составляя, соответственно,  $93,3 \pm 0,4\%$  (min – 92, max – 95) и  $351,7 \pm 20,9$  (min – 289, max – 458) аббераций на 100 МП. Применение милиацина обеспечивало ограничение мутагенного эффекта. Показатели относительного количества абберантных клеток и суммарного количества аббераций снизились до  $80,1 \pm 0,5\%$  (min – 78, max – 82) и  $285,2 \pm 4,6$  аббераций (min – 266, max – 305) на 100 МП, что значимо ( $p < 0,05$ ) отличало эти сдвиги от соответствующих значений контроля и группы сравнения.

## Список литературы / References

1. Барияк И.Р., Исаева А.В. Антимутагенные и генопротекторные свойства препаратов растительного происхождения // Цитология и генетика, 1994. Т. 28, № 3. С. 3-17. [Barilyak I.R., Isaeva A.V. *Antimutagenic and genoprotective properties of herbal drugs. Tsitologiya i genetika = Cytology and Genetics*, 1994, Vol. 28, no. 3, pp. 3-17. (In Russ.)]
2. Железнова А.Д., Железнов Л.М., Штиль А.А., Фролов Б.А. Морфологические проявления защитного влияния милиацина в органах иммуногенеза при действии метотрексата // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2007. Т. 144, № 10. С. 458-463. [Zheleznova A.D., Zheleznov L.M., Shtil A.A., Frolov B.A. Morphological manifestations for the protective effect of miliacin in organs of immunogenesis after treatment with methotrexate. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2007, Vol. 144, no. 10, pp. 458-463. (In Russ.)]
3. Железнова А.Д., Панфилова Т.В., Смолягин А.И., Чайникова И.Н., Штиль А.А., Фролов Б.А. Влияние милиацина на дисфункцию иммунной системы у мышей при действии метотрексата // Иммунология, 2009. Т. 30, № 5. С. 298-302. [Zheleznova A.D., Panfilova T.V., Smolyagin A.I., Chainikova I.N., Shtil A.A., Frolov B.A. The influence of miliacin on dysfunction of the immune system during administration of methotrexate to mice. *Immunologiya = Immunology*, 2009, Vol. 30, no. 5, pp. 298-302. (In Russ.)]
4. Панфилова Т.В., Штиль А.А., Фролов Б.А. Тритерпеноид милиацин снижает индуцированное стрессом ПОЛ // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2006. Т. 141, № 6. С. 633-635. [Panfilova T.V., Shtil A.A., Frolov B.A. Triterpenoid miliacin inhibits stress-induced lipid peroxidation. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2006, Vol. 141, no. 6, pp. 633-635. (In Russ.)]
5. Репин М.В., Говорун Р.О., Красавин Е.А. Хромосомные нарушения в лимфоцитах человека при действии ускоренных заряженных частиц // Физика элементарных частиц и атомного ядра, 2002. Т. 33, № 3. С. 747-766. [Repin M.V., Govorun R.O., Krasavin E.A. Chromosomal abnormalities in human lymphocytes

## Обсуждение

Сопоставление результатов проведенного исследования с ранее полученными данными относительно антимутагенной активности милиацина при использовании циклофосфана [6] свидетельствуют о том, протективное действие тритерпеноида при лучевом воздействии существенно менее выражено, чем при химическом мутагенезе. При оценке этого факта следует принять во внимание два обстоятельства. Во-первых, степень мутагенного эффекта, который при ионизирующем излучении был гораздо интенсивнее, чем при применении циклофосфана, когда соответствующие показатели мутагенеза составляли  $35,5 \pm 1,5\%$  (min – 32, max – 44) абберантных клеток и  $50,1 \pm 6,3$  (min – 37, max – 88) аббераций на 100 МП. Очевидно, что столь выраженное повреждающее действие облучения могло лимитировать антимутагенный потенциал тритерпеноида. Во-вторых, особенности реализации защиты при разных воздействиях. При химическом мутагенезе такая защита связана с регуляцией проницаемости плазматической мембраны для ксенобиотиков, где мембранопротекторные свойства милиацина [7] могли играть существенную роль. При ионизирующем излучении роль данного механизма менее значима, поскольку преобладает прямое повреждение ДНК (и других макромолекул), что существенно снижает защитные возможности тритерпеноида в отношении генетических повреждений миелокарицитов и, соответственно, радиационной иммуносупрессии.

induced by accelerated charged particles. *Fizika elementarnykh chastits i atomnogo yadra = Physics of Elementary Particles and Atomic Nuclei*, 2002, Vol. 33, no. 3, pp. 747-766. (In Russ.)]

6. Сарычева Ю.А., Токарева А.А., Панфилова Т.В., Железнова А.Д., Фролов Б.А. Тритерпеноид милиацин как протектор хромосомных aberrаций, индуцированных циклофосфаном в клетках костного мозга мышей // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 2. С. 527-529. [Sarycheva Yu.A., Tokareva A.A., Panfilova T.V., Zheleznova A.D., Frolov B.A. Triterpenoid miliacin as a protector of chromosomal aberrations induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 2, pp. 527-529. (In Russ.)]

7. Фролов Б.А., Кириллова А.В. Милиацин как мембранопротектор. Защитное действие милиацина при детергент-индуцированной иммуносупрессии // Российский аллергологический журнал, 2011. Т. 4, № 1. С. 402-403. [Frolov B.A., Kirillova A.V. Miliacin as a membrane protector. The protective effect of miliacin action under detergent-induced immunosuppression. *Rossiyskiy allergologicheskii zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2011, Vol. 4, no. 1, pp. 402-403. (In Russ.)]

8. Фролов Б.А., Чайникова И.Н., Железнова А.Д., Панфилова Т.В., Медведева И.П., Филиппова Ю.В., Смолягин А.И. Защитный эффект милиацина при экспериментальной сальмонеллезной инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2013. № 6. С. 3-8. [Frolov B.A., Chainikova I.N., Zheleznova A.D., Panfilova T.V., Medvedeva I.P., Filippova Yu.V., Smolyagin A.I. Protective effect of miliacin during experimental salmonellosis infection. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 6, pp. 3-8. (In Russ.)]

9. Zhao E., Xu H., Wang L., Kryczek I., Wu K., Hu Y., Wang G., Zou W. Bone marrow and the control of immunity. *Cell. Mol. Immunol.*, 2012, Vol. 9, no. 1, pp. 11-19.

---

**Авторы:**

**Сарычева Ю.А.** — к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

**Токарева А.А.** — ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

**Штиль А.А.** — д.м.н., заведующий лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток, Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Колыванова М.А.** — заведующая отделом медицинской физики и лучевых технологий ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

**Морозов В.Н.** — научный сотрудник отдела медицинской физики и лучевых технологий ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

**Панфилова Т.В.** — к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

**Фролов Б.А.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

---

**Authors:**

**Sarycheva Yu.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

**Tokareva A.A.**, Assistant Professor, Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

**Shtil A.A.**, PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Tumor Cell Death, Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Kolyvanova M.A.**, Head, Department of Medical Physics and Radiation Technologies, Russian State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

**Morozov V.N.**, Research Associate, Department of Medical Physics and Radiation Technologies, Russian State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

**Panfilova T.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

**Frolov B.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

## ПОЛУЧЕНИЕ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ *IN VITRO*

Тимганова В.П.<sup>1</sup>, Бочкова М.С.<sup>1</sup>, Ужвиюк С.В.<sup>2</sup>, Шардина К.Ю.<sup>1</sup>,  
Заморина С.А.<sup>1,2</sup>, Раев М.Б.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Резюме.** Миелоидные супрессорные клетки (MDSC) представляют собой гетерогенную популяцию незрелых миелоидных клеток, которые в норме дифференцируются в макрофаги, гранулоциты и дендритные клетки. Однако при патологических состояниях эти клетки приобретают супрессорный фенотип, подавляя иммунный ответ. Так, уровень MDSC возрастает при многих патологических состояниях, включая воспаление, сепсис, травматический шок, аутоиммунные заболевания, онкологический процесс, а также беременность. В последние 12 лет наблюдается устойчивый рост интереса к этой популяции клеток [PUBMED: 2008 (65 статей); 2020 (> 650 статей)]. Таким образом, изучение данной субпопуляции клеток, позволит расширить наши представления о функционировании иммунной системы. У человека MDSC характеризуются экспрессией маркеров HLA-DR-CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, подразделяясь на гранулоцитарные (G-MDSC), моноцитарные (M-MDSC), а также ранние MDSC (e-MDSC) с фенотипом HLA-DR-CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD66b<sup>-</sup>. Целью данной работы являлась разработка адекватной экспериментальной модели, позволяющей оценивать дифференцировку MDSC человека из мононуклеарных клеток периферической крови при помощи цитокинов в условиях длительного культивирования *in vitro*. Объектами исследования были изолированные мононуклеарные клетки крови здоровых доноров, индуцированные в фенотип MDSC при помощи GM-CSF и IL-6 (40 или 20 нг/мл) в течение 7, 14, 21 суток. В ряде экспериментов за сутки до фенотипирования в культуры вносили липополисахарид (LPS) в концентрации 100 нг/мл. Процент живых Zombie Aqua-негативных клеток в культурах (внутри гейта клеток по FSC/SSC) колебался в пределах 90,5-93,9%. Существенных отличий между культурами выявлено не было. В наших экспериментальных условиях средний процент общей субпопуляции MDSC достигал 2-2,3% от общего количества живых клеток в культуре. Это в 9-10 раз больше процента данных клеток в свежевыделенных мононуклеарных клетках здоровых людей. По итогам проведенной экспериментальной работы мы установили, что для индукции e-MDSC из мононуклеарных клеток периферической крови человека необходимо 2 недели культивирования с 40 нг/мл IL-6 и 40 нг/мл GM-CSF. Для получения «зрелых» MDSC (M-MDSC + G-MDSC) оптимальными для нашей экспериментальной системы были следующие условия: 3 недели культивирования с 20 нг/мл IL-6 и 20 нг/мл GM-CSF с добавлением 100 нг/мл LPS за одни сутки до окончания культивирования. В целом дальнейшее изучение факторов, модулирующих дифференцировку

### Адрес для переписки:

Тимганова Валерия Павловна  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения Российской академии наук  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (902) 836-14-55.  
E-mail: timganovavp@gmail.com

### Address for correspondence:

Timganova Valeriya P.  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,  
Ural Branch, Russian Academy of Sciences  
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.  
Phone: 7 (902) 836-14-55.  
E-mail: timganovavp@gmail.com

### Образец цитирования:

В.П. Тимганова, М.С. Бочкова, С.В. Ужвиюк, К.Ю. Шардина, С.А. Заморина, М.Б. Раев «Получение миелоидных супрессорных клеток человека в экспериментальной модели *in vitro*» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 157-162. doi: 10.46235/1028-7221-352-GOH  
© Тимганова В.П. и соавт., 2020

### For citation:

V.P. Timganova, M.S. Bochkova, S.V. Uzhviyuk, K.Yu. Shardina, S.A. Zamorina, M.B. Rayev "Generation of human myeloid suppressor cells in the *in vitro* experimental model", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 157-162. doi: 10.46235/1028-7221-352-GOH  
DOI: 10.46235/1028-7221-352-GOH

MDSC, позволит выявить условия, необходимые для генерации этой популяции клеток-супрессоров, что имеет терапевтические перспективы.

*Ключевые слова:* миелоидные супрессорные клетки, ранние миелоидные супрессорные клетки, культура клеток, IL-6, GM-CSF, LPS, мононуклеары, проточная цитометрия

## GENERATION OF HUMAN MYELOID SUPPRESSOR CELLS IN THE *IN VITRO* EXPERIMENTAL MODEL

Timganova V.P.<sup>a</sup>, Bochkova M.S.<sup>a</sup>, Uzhviyuk S.V.<sup>b</sup>, Shardina K.Yu.<sup>a</sup>, Zamorina S.A.<sup>a,b</sup>, Rayev M.B.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

**Abstract.** Myeloid suppressor cells (MDSCs) are a heterogeneous population of immature myeloid cells that generally differentiate into macrophages, granulocytes, and dendritic cells. However, in pathology, these cells acquire a suppressor phenotype, blocking immune response. In particular, MDSC levels increase in many pathological conditions, including inflammation, sepsis, traumatic shock, autoimmune diseases, cancer, and pregnancy. Over the past 12 years, an interest in examining this cell population has been steadily increased [PUBMED: 2008 (65 articles); 2020 (> 650 entries)] that will expand our understanding of immune system functioning. In humans, MDSCs are characterized by HLA-DR<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> phenotype, in turn being subdivided into CD15<sup>+</sup> or CD66<sup>+</sup> granulocytic (G-MDSC), CD14<sup>+</sup> monocytic (M-MDSC), and early (e-MDSC) MDSC bearing HLA-DR<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD66b<sup>-</sup> phenotype. This work was aimed to develop an adequate experimental model allowing to evaluate cytokine-driven differentiation of human MDSCs from peripheral blood mononuclear cells in long-term *in vitro* culture system. For this, peripheral blood mononuclear cells were isolated from healthy donors induced to express MDSC phenotype with GM-CSF and IL-6 (40 or 20 ng/ml) cultured for 7, 14, 21 days. In several experiments, LPS (100 ng/ml) was added to the cultured cells 24 hours before immunophenotyping. The percentage of living Zombie Aqua-negative cells in cultures (gated on cells according to FSC/SSC) ranged from 90.5–93.9%. No significant differences were observed between cultured cells. In our experimental conditions, the mean percentage of total MDSC subpopulation reached 2–2.3% of total living cells, exceeding that one by 9–10-fold found in freshly isolated mononuclear cells from healthy subjects. Based on the results of our experimental study, we found that induction of e-MDSC derived from human peripheral blood mononuclear cells requires two weeks of co-culture with 40 ng/ml IL-6 and 40 ng/ml GM-CSF. “Mature” MDSCs (M-MDSC + G-MDSC) yield was peaked in the following conditions: co-culture for 3 weeks with 20 ng/ml IL-6 and 20 ng/ml GM-CSF added with 100 ng/ml LPS 24 hours before completing protocol. Overall, further examining factors modulating MDSC differentiation will reveal conditions necessary for generating this suppressor cell subset potentially used in clinical practice.

*Keywords:* myeloid suppressor cells, early myeloid suppressor cells, cell culture, IL-6, GM-CSF, LPS, mononuclear cells, flow cytometry

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-29-04055 мк.

### Введение

Миелоидные супрессорные клетки (myeloid derived suppressor cells, MDSC) – гетерогенная популяция, представленная незрелыми нейтрофилами, дендритными клетками и моноцитами, способными подавлять иммунный ответ, в том числе против опухолей [4]. Этим клеткам при-

писывается иерархическая вершина в регуляции иммунного ответа [11]. MDSC обнаруживаются в повышенном количестве в микроокружении солидных опухолей [7]. На данный момент очевидно, что MDSC защищают опухоль от иммунной системы, делая ее устойчивой к иммунотерапии. Также имеются данные, что MDSC участвуют в ангиогенезе и метастазировании при онкологическом процессе. Ликвидация этих клеток из микроокружения опухоли повышает выживаемость онкологических больных [12].

Однако уровень MDSC увеличивается при многих патологических состояниях, включая воспаление, сепсис, травматический шок, аутоиммунные заболевания, а также беременность [6]. Их основная функция – супрессия врожденного и адаптивного иммунного ответа. MDSC ингибируют иммунный ответ через межклеточные взаимодействия с помощью молекул, синтезируемых на поверхности клеток, а также короткоживущих медиаторов [9]. Основные механизмы иммуносупрессорной активности MDSC связаны с экспрессией ряда поверхностных маркеров (CD73, ADAM17, PD-L1), внутриклеточной экспрессией аргиназы 1 (Arg 1), iNO-синтазы (индуцибельная синтаза оксида азота, iNOS), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) и продукцией ряда цитокинов (IL-10, TGF- $\beta$ 1) [1,2].

В данном исследовании мы разрабатывали экспериментальную модель, связанную с работой с очень малой субпопуляцией клеток. У здоровых людей незрелые миелоидные клетки с фенотипом MDSC составляют менее 1%, их количество увеличивается в несколько раз при различных состояниях [2]. У человека MDSC характеризуются экспрессией маркеров HLA-DR-CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, с подразделением на гранулоцитарную (G-MDSC) и моноцитарную (M-MDSC) субпопуляции MDSC [5]. На данный момент существует единственная возможность изучать данную субпопуляцию на клетках человека в культуре – это направленная индукция мононуклеарных клеток в фенотип MDSC при помощи цитокинов в условиях длительного культивирования *in vitro*. Целью данной работы являлась разработка адекватной экспериментальной модели, позволяющей оценивать дифференцировку MDSC человека.

## Материалы и методы

Исследование проводилось согласно Хельсинкской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 30.08.2019. В работе использовали фракционированные мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) практически здоровых доноров (n = 3). МПК получали центрифугированием в градиенте плотности (1,077 г/см<sup>3</sup>, Diacoll, «Диаэм», Россия).

### Разработка адекватной экспериментальной модели получения MDSC *in vitro*

Оптимальная модель получения MDSC разрабатывалась для генерации нужной популяции клеток из мононуклеаров периферической крови. Нам было необходимо разработать собственную модель для 96 или 48-луночных планшетов с целью получения достаточного количества кле-

ток при минимальных расходах. Для разработки экспериментальной модели была проведена серия пилотных экспериментов, чтобы определить необходимые концентрации цитокинов и общую длительность культивирования.

### Выбор общего времени культивирования и концентраций IL-6 и GM-CSF

#### Зависимость количества MDSC от присутствия LPS

Для выбора времени культивирования и оптимальных концентраций IL-6 и GM-CSF провели несколько пилотных экспериментов (n = 3). Клетки культивировали в 96-луночных планшетах в концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл в полной питательной среде (ППС), (культуральная среда RPMI-1640, 10% ЭТС, 10 мМ Hepes, 2 мМ L-глутамин (ICN Ph., США), 100 мкл на 10 мл среды пенициллина–стрептомицина–амфотерицина (BI, Израиль)) с добавлением 20 нг/мл IL-6 и GM-CSF или 40 нг/мл IL-6 и GM-CSF в течение 7, 14 и 21 суток [10]. Помимо этого, за одни сутки до окончания культивирования в часть культур вносили липополисахарид (LPS, Sigma Aldrich) до конечной концентрации 100 нг/мл для оценки его влияния на количество «зрелых» MDSC. Замену среды производили один раз в 7 дней.

После 7, 14 или 21 дня культивирования при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> клетки переносили в пробирки для проточной цитометрии, обработав лунки реагентом “Accutase” (Caricorn Scientific, Германия) для полного снятия оставшихся клеток со дна планшета. Затем производили окрашивание клеток на жизнеспособность суправитальным красителем для проточной цитометрии Zombie Aqua (ZA) (Biolegend, США) согласно протоколу производителя. После отмывки клетки инкубировали с мечеными флуорохромами антителами для определения фенотипа MDSC на проточном цитометре. Использовали следующие антитела: anti HLA-DR-Alexa Fluor 750, anti CD33-APC, anti CD11b-Alexa Fluor 405, anti CD66b-PE, anti CD14-PerCP (R&D Systems, США). В качестве контролей, определяющих негативные популяции, использовали FMO (fluorescence minus one)-пробы. В работе использовали проточный цитометр “CytoFLEX S” (Beckman Coulter, США).

Гейтирование осуществляли согласно характеристикам светорассеяния, затем выделяли живые клетки, не окрасившиеся суправитальным красителем Zombie Aqua (ZA), далее гейтировали HLA-DR<sup>+</sup> клетки, которые, в свою очередь, отображали на двухпараметрическом графике CD33-APC против CD11b-Alexa Fluor 405. Гейтированные таким образом живые HLA-DR<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> клетки отображали на двухпараметрическом графике CD66b-PE против CD14-PerCP, определяя

таким образом М- и G-субпопуляции клеток MDSC. В итоге за М-MDSC считали клетки с фенотипом HLA-DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD66<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>, а за G-MDSC — с фенотипом HLA-DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD66b<sup>+</sup>. Процент живых ZA<sup>-</sup> клеток в культурах (внутри гейта клеток по FSC/SSC) колебался в пределах 90,5-93,9%. Существенных отличий между культурами выявлено не было.

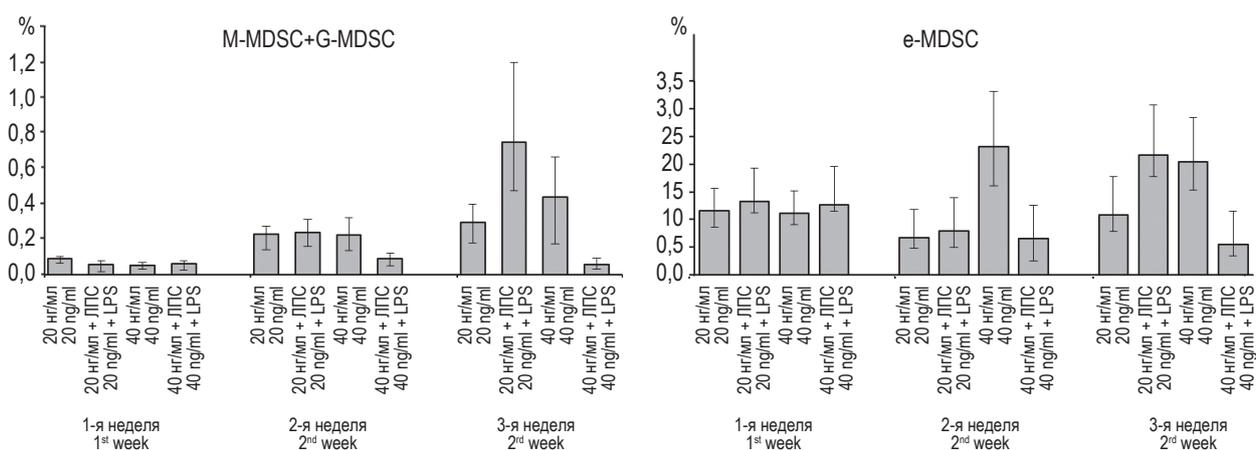
## Результаты и обсуждение

Миелоидные супрессоры представляют собой гетерогенную популяцию клеток, включающую в себя не только М-MDSC и G-MDSC, но и так называемые ранние MDSC (Im- или e-MDSC от слов “immature” — незрелые или “early” — ранние). Имеющиеся данные говорят о том, что e-MDSC, хотя и не несут на себе ни маркеров клеток моноцитарного ряда, таких как CD14, ни гранулоцитарных (CD15), все же обладают супрессорной активностью [3, 13].

Учитывая тот факт, что e-MDSC в культуре клеток человека практически не изучены, представляют интерес любые новые данные, касающиеся этой субпопуляции. В нашем исследовании мы определяли e-MDSC как клетки с фенотипом HLA-DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD66b<sup>-</sup>. Процент условно зрелых, то есть несущих моноцитарные и нейтрофильные маркеры MDSC, определяли следующим образом: складывали количество М-MDSC (HLA-DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) и G-MDSC (HLA-DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>) клеток в культуре и вычисляли их процент от общего количества живых клеток. На рисунке 1 пред-

ставлено изменение процента ранних e-MDSC и «зрелых» MDSC в зависимости от длительности культивирования, концентраций цитокинов и добавления LPS. Показано, что при использовании высокой концентрации цитокинов (40 нг/мл) уровень e-MDSC повышался на 2-й и 3-й неделе культивирования, в то время как присутствие LPS не оказывало видимого эффекта. Однако для получения зрелых MDSC необходимо 3 недели, а также высокая концентрация цитокинов (40 нг/мл) или сочетаний цитокинов (20 нг/мл) с LPS. Таким образом, оптимальным временем культивирования для получения зрелых MDSC в культуре мононуклеарных клеток можно считать 3 недели, так как процент этих клеток достиг своего максимума в нашей экспериментальной системе. Оптимальным сочетанием концентраций цитокинов и внесения LPS можно считать 20 нг/мл IL-6 + 20 нг/мл GM-CSF с добавлением 100 нг/мл LPS за одни сутки до окончания культивирования. В отношении e-MDSC показано, что оптимальными для нашей экспериментальной системы являются следующие условия: 2 недели культивирования с 40 нг/мл IL-6 и 40 нг/мл GM-CSF.

В наших экспериментальных условиях средний процент общей субпопуляции MDSC достигал 2-2,3% от общего количества живых клеток в культуре (табл. 1). Это в 9-10 раз больше процента данных клеток в свежeweделенных мононуклеарах здоровых людей [8]. Однако получение достаточного количества индуцированных MDSC из мононуклеарных клеток здоровых доноров оказалось довольно сложной задачей. Стандартные рекомендации предполагают оценку MDSC



**Рисунок 1. Влияние длительности культивирования, концентраций IL-6 и GM-CSF и добавления LPS на процент e-MDSC (HLA-DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD66b<sup>-</sup>) и «зрелых» MDSC (HLA-DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> + HLA-DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>) в культурах мононуклеаров периферической крови, M±m, n = 3**

Figure 1. Effect of cultivation duration, IL-6 and GM-CSF concentrations, and LPS addition on the percentage of e-MDSC (HLA-DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD66b<sup>-</sup>) and “mature” MDSC (HLA-DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> + HLA-DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>) in cultures of peripheral blood mononuclear cells, M±m, n = 3

**ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПРОЦЕНТ ОБЩЕЙ СУБПОПУЛЯЦИИ MDSC (HLA-DR<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>), M±m, n = 3**

TABLE 1. EFFECT OF TIME AND CULTURE CONDITIONS ON THE PERCENTAGE OF THE TOTAL MDSC SUBPOPULATION (HLA-DR<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>), M±m, n = 3

Время/условия культивирования Time/culture conditions	IL-6 + GM-CSF (20 нг/мл) IL-6 + GM-CSF (20 ng/ml)	IL-6 + GM-CSF (20 нг/мл) + LPS (100 нг/мл) IL-6 + GM-CSF (20 ng/ml) + LPS (100 ng/ml)	IL-6 + GM-CSF (40 нг/мл) IL-6 + GM-CSF (40 ng/ml)	IL-6 + GM-CSF (40 нг/мл) + LPS (100 нг/мл) IL-6 + GM-CSF (40 ng/ml) + LPS (100 ng/ml)
1-я неделя 1 <sup>st</sup> week	1,158±0,476	1,325±0,761	1,112±0,659	1,258±0,875
2-я недели 2 <sup>nd</sup> weeks	0,677±0,258	0,797±0,476	2,313±1,114	0,650±0,355
3-я недели 3 <sup>rd</sup> weeks	1,079±0,536	2,166±0,654	2,035±0,872	0,551±0,254

в периферической крови, и это довольно просто сделать. Но для решения массы задач, связанных с модуляцией активности этих клеток, необходимы эксперименты *in vitro*. На данном этапе мы связываем низкий уровень MDSC в культурах с тем фактом, что наши здоровые доноры изначально имели низкий уровень этих клеток в крови. Помимо этого, лимфоциты в культуре за 3 недели культивирования без активации TCR не способны активно пролиферировать и синтезировать цитокины.

## Заключение

Таким образом, по итогам проведенной экспериментальной работы мы установили, что для

индукции e-MDSC из мононуклеарных клеток периферической крови человека необходимо 2 недели культивирования с 40 нг/мл IL-6 и 40 нг/мл GM-CSF. Для получения «зрелых» MDSC оптимальными для нашей экспериментальной системы были следующие условия: 3 недели культивирования с 20 нг/мл IL-6 и 20 нг/мл GM-CSF с добавлением 100 нг/мл LPS за одни сутки до окончания культивирования. В целом дальнейшее изучение факторов, модулирующих дифференцировку MDSC, позволит выявить условия, необходимые для генерации этой популяции клеток-супрессоров, что имеет терапевтические перспективы.

## Список литературы / References

1. Атретханы К.-С.Н., Друцкая М.С. Миелоидные супрессорные клетки и провоспалительные цитокины как мишени терапии рака // Биохимия, 2016. Т. 81, № 11. С. 1520-1529. [Atretkhany K.-S.N., Drutskaya M.S. Myeloid-derived suppressor cells and proinflammatory cytokines as targets for cancer therapy *Biokhimiya = Biochemistry*, 2016, Vol. 81, no. 11, pp. 1520-1529. (In Russ.)]
2. Пономарев А.В. Миелоидные супрессорные клетки: общая характеристика // Иммунология, 2016. Т. 37, № 1. С. 47-50. [Ponomarev A.V. Myeloid suppressor cells: general characteristics. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 1, pp. 47-50. (In Russ.)]
3. Dumitru C.A., Moses K., Trellakis S., Lang S., Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 8, pp. 1155-1167.
4. Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 9, pp. 162-174.
5. Gabrilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 4, pp. 253-268.
6. Goedegebuure P., Mitchem J.B., Porembka M.R., Tan M.C.B., Belt B.A., Wang-Gillam A., et al. Myeloid-derived suppressor cells: general characteristics and relevance to clinical management of pancreatic cancer. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2011, Vol. 11, no. 6, pp. 734-751.
7. Greten T.F., Manns M.P., Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int. Immunopharmacol.*, 2011, Vol. 11, no. 7, pp. 802-807.
8. Kotsakis A., Harasymczuk M., Schilling B., Georgoulas V., Argiris A., Whiteside T.L. Myeloid-derived suppressor cell measurements in fresh and cryopreserved blood samples. *J. Immunol. Methods*, 2012, Vol. 381, pp. 14-22.

9. Kumar V., Patel S., Tcyganov E., Gabrilovich D.I. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.*, 2016, Vol. 37, pp. 208-220.
10. Lechner M.G., Liebertz D.J., Epstein A.L. Characterization of cytokine-induced myeloid derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 4, pp. 2273-2284.
11. Pak V.N. Selective targeting of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients through AFP-binding receptors. *Future Sci. OA*, 2018, Vol. 5, no. 1. doi: 10.4155/fsoa-2018-0029.
12. Tesi R.J. MDSC; The most important cell you have never heard of. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2019, Vol. 40, no. 1, pp. 4-7.
13. Veglia F., Perego M., Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.*, 2018, Vol. 19, no. 2, pp. 108-119.

---

**Авторы:**

**Тимганова В.П.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

**Бочкова М.С.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

**Шардина К.Ю.** — аспирант лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

**Ужвинок С.В.** — магистрант кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Заморина С.А.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Раев М.Б.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Authors:**

**Timganova V.P.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Bochkova M.S.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Shardina K. Yu.**, Graduate Student, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Uzhviyuk S.V.**, Student, Microbiology and Immunology Department, Faculty of Biology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

**Zamorina S.A.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Microbiology and Immunology Department, Faculty of Biology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

**Rayev M.B.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Microbiology and Immunology Department, Faculty of Biology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩИХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ИМЕЮЩИХ И НЕ ИМЕЮЩИХ ГЕН БЕЛКА А, ПРИ ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

Файзуллина А.И., Зурочка А.В.

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

**Резюме.** В работе приведены результаты исследования супернатантов суточных бульонных культур *Staphylococcus aureus*, продуцирующих и не продуцирующих цитокиноподобные вещества, имеющих различия по наличию генов белка А стафилококка, по определению неспецифической активности при проведении иммуноферментного анализа с применением наборов АО «Вектор-Бест» (Новосибирск), а также тест-систем ООО «ХЕМА» (Москва) для диагностики некоторых инфекций и уровня содержания гормонов. Установлено, что в супернатантах штаммов *Staphylococcus aureus*, продуцирующих цитокиноподобные вещества, тождественные человеческим, иммуноферментным методом было достоверно определено отсутствие неспецифической перекрестной активности у всех тест-систем, кроме НВsAg. Это может свидетельствовать о высокой специфичности остальных изученных тест-систем и косвенно подтверждает предположение о том, что стафилококки способны секретировать белки, специфически реагирующие в основном с антителами против цитокинов человека, а также могут давать перекрестные реакции с другими антигенами, но не с антителами. Цитокиноподобная или неспецифическая активность не зависит от наличия или отсутствия белка А у изученных штаммов стафилококков.

**Ключевые слова:** цитокины, цитокиноподобные вещества, иммуноферментный анализ, *S. aureus*, белок А, антигены, антитела

## ELISA-BASED COMPARATIVE ANALYSIS OF NON-SPECIFIC ACTIVITY FOR CYTOKINE-PRODUCING PROTEIN A GENE-POSITIVE AND NEGATIVE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS

Fayzullina A.I., Zurochka A.V.

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** Here we present the data on examining protein A-gene-positive and -negative *Staphylococcus aureus* daily broth culture supernatants for production of cytokine-like substances to determine non-specific activity

### Адрес для переписки:

Файзуллина Анастасия Ирековна  
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»  
Уральского отделения Российской академии наук  
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.  
Тел.: 8 (900) 091-88-39.  
E-mail: anafaz@mail.ru

### Address for correspondence:

Fayzullina Anastasia I.  
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,  
Russian Academy of Sciences,  
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,  
Pervomayskaya str., 106.  
Phone: 7 (900) 091-88-39.  
E-mail: anafaz@mail.ru

### Образец цитирования:

А.И. Файзуллина, А.В. Зурочка «Сравнительная оценка неспецифической активности цитокинпродуцирующих штаммов *Staphylococcus aureus*, имеющих и не имеющих ген белка А, при иммуноферментном анализе» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 163-168.  
doi: 10.46235/1028-7221-270-ECA

© Файзуллина А.И., Зурочка А.В., 2020

### For citation:

A.I. Fayzullina, A.V. Zurochka "ELISA-based comparative analysis of non-specific activity for cytokine-producing protein a gene-positive and negative *Staphylococcus aureus* strains", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 163-168.  
doi: 10.46235/1028-7221-270-ECA

DOI: 10.46235/1028-7221-270-ECA

by using enzyme-linked immunosorbent assay with specific kits (JSC "Vector-Best", Novosibirsk; LLC "HEMA" (Moscow) to diagnose infections and hormone levels. We found no non-specific cross-activity in all test ELISA kits assessing various *Staphylococcus aureus* strain supernatants, producing cytokine-like substances identical to human ones, except for HBsAg kit. It may evidence about high specificity for remaining test kits examined and indirectly confirm an assumption that staphylococci are able to secrete proteins specifically reacting mainly with antibodies against human cytokines, and can cross-react with other antigens, but not with antibodies. Cytokine-like or non-specific activity does not depend on presence or absence of the protein A in *Staphylococcus* strains examined by us.

*Keywords: cytokines, cytokine-like substances, enzyme immunoassay, S. aureus, protein A, antigens, immunoglobulins*

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1, и теме из Плана НИР ИКВС УрО РАН, № гос. регистрации 116021510075.

## Введение

В последние годы появляется все больше данных о том, что цитокины и вещества, подобные цитокинам, являются не только прерогативой высших животных, но и могут иметь более древнее происхождение. Цитокиноподобные вещества (близкие по антигенному составу, но не всегда по функциям) были обнаружены у низших многоклеточных, растений и у ряда бактерий [12]. Так, Legas E. с группой ученых описали наличие IL-1- и IL-2-подобных молекул на аксиальных клетках органов морских звезд, а также установили, что клетки морской звезды экспрессируют структуры, сходные с человеческими рецепторами для IL-1, IL-2, IL-6 и IFN $\gamma$ , тем самым подтвердив наличие цитокиновой сети у беспозвоночных [12]. При этом, если растения и низшие животные соприкасаются с организмом человека в основном только в качестве пищевых продуктов, то бактерии присутствуют в организме человека практически повсеместно (ротовая полость, кишечник, урогенитальный тракт и т.д.), а при развитии воспаления, формировании гнойных очагов (сепсис, пиемические очаги, септицемия и т.д.) их концентрация может достигать до миллиардов и более бактерий в мл ткани или жидкости [1, 6].

При оценке состояния функциональной активности органов иммунной системы, при патологии иммунной системы имеет большое значение исследование цитокинового статуса, выявляемого в крови и секретах слизистых. При проведении различных видов анализа, в том числе и иммуноферментного анализа (ИФА), важно учитывать характер биологического материала для исследования и степень его обсемененности бактериями. В крови и секретах слизистых в норме и при развитии гнойной патологии (септицемия, бактериальный менингит, условно патогенная флора слизистых) бактерии могут находиться в очень высоких концентрациях. Это создает ус-

ловия для появления ложноположительных или завышенных результатов уровней концентраций биологических веществ из-за перекрестно реагирующих антигенных эпитопов микробов и белков человека и животных, что согласуется данными Javed N. и соавт. [11], где было показано, что супернатанты отдельных клинических изолятов *S. aureus* в ИФА обнаруживают перекрестную реакцию с антителами к мышинным цитокинам IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  [11]. Об этом же свидетельствуют и данные, полученные нами, что при использовании различных тест-систем определения цитокинов человека ИФА (ООО «Цитокин», г. Санкт-Петербург) и мультиплексного анализа (BioRAD и Multiplex, США) в супернатантах суточных культур бактерий разных видов микроорганизмов определялись цитокиноподобные вещества (ЦПВ), более выраженные как по спектру, так и по уровню ЦПВ определялись в супернатантах суточных культур бактерий вида *S. aureus* [1, 2, 3, 4, 9, 10]. Ранее было высказано предположение, о том, что связывание структур стафилококков с антителами против цитокинов (ЦПВ активность) могут быть связаны с неспецифическим действием белка А стафилококков, хотя это не объясняет цитокиноподобную активность бактерий, вообще не имеющих белка А, например, других видов стафилококков или грамотрицательных бактерий) [4]. Проведенные нами исследования на стафилококках, имеющих Spa-ген и не имеющих такового, показали, что цитокиноподобная активность не зависела от наличия или отсутствия данного гена у *S. aureus* [5]. Учитывая эти данные, было важно проверить, есть ли зависимость от наличия гена Spa или его отсутствия при взаимодействии супернатантов стафилококков, секретирующих ЦПВ, с другими тест-системами (на определение антител или антигенов достаточно далеких от детерминант белка А стафилококков).

Применение ИФА в диагностических целях при проведении лабораторных исследований пациентов также требует выявления и изучения причин различных неспецифических реакций в материалах, обсемененных бактериальной флорой, а также поиск возможностей их устранения.

С учетом выше изложенного, наибольший интерес представляет выявление неспецифических реакций отдельных клинических изолятов

*S. aureus*, имеющих ген белка А или не имеющих его, но при этом проявляющих цитокиноподобную активность, при определении некоторых гормонов, антигенов и иммуноглобулинов к различным инфекциям методом иммуноферментного анализа, а также сравнение этих характеристик с параметрами интенсивности бактериальной цитокиноподобной продукции.

**Целью настоящего исследования** явилось сравнительное изучение неспецифической активности у клинических и музейных штаммов *S. aureus*, детерминированных по белку А, при использовании тест-систем для иммуноферментного анализа.

## Материалы и методы

Исследования проведены на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург), Оренбургского федерального научного центра УрО РАН в филиале Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (г. Оренбург).

В анализ для сравнительной оценки неспецифической активности бактерий, демонстрировавших ранее цитокиноподобную активность, были взяты результаты исследования следующих 10 штаммов *S. aureus*, не имеющих ген *Spa*: 33, 34, 37, 43, ОЛ 1, ОЛ 3, ПЦ 8, ПЦ 9, ПЦ 13, ПЦ 14 и 10 штаммов *S. aureus*, имеющих ген *Spa*: 39, 44, 48, 51, 52, 53, 60, 61, ОЛ 2, ПЦ 7 из музея культур Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН (ОФИЦ УрО РАН).

Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 24 ч при 37 °С, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин и отбирали фильтрат надосадочной жидкости (супернатант).

Проверку неспецифических эффектов супернатантов бактерий проводили методом иммуноферментного анализа на приборе Multiscan (США) с использованием тест-систем АО «Вектор-Бест» (Новосибирск) для определения австралийского антигена: HBsAg-ИФА-БЕСТ, (кат. № (ref) D-0544, серия (lot) 78 до 31.10.2020) и для определения ферритина: Ферритин-ИФА-Бест (кат. № (ref) T-8552, серия (lot) 100 до 06.11.2020); также были использованы тест-системы ООО «ХЕМА» (Москва) для определения иммуноглобулинов: Rubella IgG-ИФА, (кат. № (ref) K-102, серия (lot) 9032 до 05.2021), общего IgE-ИФА, (кат. № (ref) K200, серия (lot) 910 до 06.2021) и для определения гормонов с помощью 17-ОН-прогестерон-ИФА (кат. № (ref) K-217, серия (lot) 810 до 07.2020), Эстрадиол-ИФА (кат. № (ref) K-208, серия (lot) 901 до 09.2020). Выбор тест-систем был связан с максимальной удаленностью антигенных

детерминант стафилококка (в том числе и белка А) от антигенов и антител, для определения которых предназначены данные тест-системы (в доступной нам литературе данных за гомологию к данным видам тест-систем у стафилококков выявлено не было).

Опыты проводили в двух повторах; анализировали результаты измерения оптической плотности (ОП) проб. Во всех случаях контролем служил мясо-пептонный бульон (МПБ) без бактерий и контрольный положительный или отрицательный образец соответствующей тест-системы.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics версия 23.0. Результаты данных описывались при помощи среднеарифметического значения (М) и стандартной ошибки среднего (m). Достоверность отличий определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни (различия считали достоверными при  $p < 0,05$ ) [7] для независимых совокупностей.

## Результаты

Полученные данные, отображенные в таблице 1, свидетельствуют о том, что в супернатантах суточных культур *S. aureus*, у которых ранее была выявлена цитокиноподобная активность, но при этом имеющих различия по наличию гена *Spa*, определялась степень специфического или неспецифического связывания методом ИФА антигенных структур в супернатантах с тест-системами для определения HBsAg, ферритина, Rubella IgG, общего IgE, эстрадиола и 17-ОН прогестерона. При этом статистически значимые различия были установлены между показателями МПБ (контроль среды) и средним уровнем оптической плотности образца во всей выборке штаммов ( $p < 0,05$ ) только при определении HBsAg. С другими тест-системами неспецифического действия супернатантов стафилококков выявлено не было. При этом важно отметить, что не было получено различий независимо от наличия или отсутствия генов *Spa*.

## Обсуждение

В проведенном исследовании установлено, что методом иммуноферментного анализа в супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus*, как имеющих ген *Spa*, так и не имеющих его, определяется неспецифическая активность в отношении тест-системы для определения HBsAg. Учитывая, что в анализ брали стафилококки как с высокой ЦПВ активностью, так и с низкой [9, 10], а тест-система реагировала на все стафилококки одинаково, напрашивается вывод о том, что в супернатантах различных штаммов *S. aureus* присутствуют какие-то другие антигенные детер-

**ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩИХ СУТОЧНЫХ КУЛЬТУР S. AUREUS, ИМЕЮЩИХ ГЕН Spa\* (ШТАММЫ: 39, 44, 48, 51, 52, 53, 60, 61, ОП 2, ПЦ 7) И НЕ ИМЕЮЩИХ ГЕН Spa (ШТАММЫ: 33, 34, 37, 39, 43, ОП 1, ОП 3, ПЦ 8, ПЦ 9, ПЦ 13, ПЦ 14), ОТНОСИТЕЛЬНО КОНТРОЛЯ СРЕДЫ – МИБ ИФА МЕТОДОМ, n = 10, о. е.**

**TABLE 1. COMPARISON FOR THE NONSPECIFIC ACTIVITY OF CYTOKINE-PRODUCING DIURNAL CULTURES OF S. AUREUS GENE Spa\* (STRAINS: 39, 44, 48, 51, 52, 53, 60, 61, OL 2, PC 7) AND GEN Spa (STRAINS: 33, 34, 37, 43, OL 2, OL, PC 8, PC 9, PC 13, PC 14), REGARDING BROTH CONTROL – MIB IN ELISA METHOD, n = 10, r. u.**

Наименование тест-системы Name of the kit	Контроль (положительный контроль для всех, кроме HBsAg-ИФА), оптическая плотность образца Control (positive control for all except HBsAg-ELISA), optical density of the sample n = 10	Средний уровень МИБ (контроль среды), оптическая плотность образца Mean MIB (broth control), optical density of the sample, n = 10	Spa		Spa*		Средний уровень оптической плотности образца во всей выборке штаммов Average level of optical density of the sample (M±m) in the entire sample of strains n = 10
			Диапазон (min-max) оптической плотности образца во всей выборке штаммов Range (min-max) of optical density of the sample in the entire sample of strains n = 10	Средний уровень оптической плотности образца во всей выборке штаммов Average level of optical density of the sample (M±m) in the entire sample of strains n = 10	Диапазон (min-max) оптической плотности образца во всей выборке штаммов Range (min-max) of optical density of the sample in the entire sample of strains n = 10	Средний уровень оптической плотности образца во всей выборке штаммов Average level of optical density of the sample (M±m) in the entire sample of strains n = 10	
<b>Rubella IgG-ИФА, ООО «ХЕМА» (Москва)</b> Rubella IgG-IEA, LLC "HEMA" (Moscow)	1,081	0,012±0,001	0,009-0,017	0,012±0,001	0,011-0,024	0,014±0,001	
<b>17-ОН-прогестерон-ИФА, ООО «ХЕМА» (Москва)</b> 17-OH-progesterone-IEA LLC "HEMA" (Moscow)	1,629	2,623±0,013	2,383-2,597	2,523±0,024	2,392-2,607	2,517±0,021	
<b>IgE-ИФА, ООО «ХЕМА» (Москва)</b> IgE-IEA, LLC "HEMA" (Moscow)	0,581	0,018±0,001	0,018-0,171	0,066±0,020	0,018-0,211	0,089±0,024	
<b>Ферритин-ИФА-БЕСТ, АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск)</b> Ferritin-IEA-BEST, JSC "Vector-Best" (Novosibirsk)	0,547	0,004±0,001	0,004-0,063	0,025±0,008	0,005-0,067	0,035±0,009	
<b>Эстрадиол-ИФА, ООО «ХЕМА» (Москва)</b> Estradio-IEA, LLC "HEMA" (Moscow)	1,740	0,711±0,009	0,682-0,759	0,725±0,008	0,707-0,753	0,728±0,004	
<b>HBsAg-ИФА-БЕСТ, АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск)</b> HBsAg-IEA-BEST, JSC "Vector-Best" (Novosibirsk)	(отр К) 0,078	0,216±0,006	0,167-0,748	0,382±0,073*	0,137-0,661	0,404±0,072*	

Примечание. \* – статистически значимые различия между показателями МИБ (контроль среды) и средним уровнем оптической плотности образца во всей выборке штаммов (p < 0,05).

Note. \*, statistically significant differences between the performance of the MIB (broth control) and the average optical density of the sample in the entire combination of strains (p < 0.05).

минанты, напрямую не связанные с ЦПВ активностью и с наличием или отсутствием белка А.

Очень важно отметить отсутствие взаимодействия стафилококков с тест-системами для определения иммуноглобулинов: если бы было выявлено такое взаимодействие, то его можно было бы связать с неспецифическим взаимодействием с белком А стафилококков, а по нашим данным такого эффекта получено не было.

Суммируя полученные данные, можно предположить важную гипотезу эволюционного происхождения цитокинов: появление цитокиноподобных веществ у бактерий антигенной структуры, имеющих важные свойства, но пока досконально еще не изученные, для прокариотов – формирование цитокиноподобной активности, но уже имеющей свойства цитокиновой регуляторной сети у низших многоклеточных и растений – развитие ее у первых многоклеточных хордовых организмов – формирование раз-

ветвленной многосоставной цитокиновой сети регуляции иммунной и других систем организма у высших животных и человека.

## Выводы

1. В супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus* независимо от наличия или отсутствия гена Spa (белка А стафилококков) иммуноферментными тест-системами различных фирм-производителей выявляется неспецифическая активность антигенных детерминант стафилококков в отношении тест-системы для определения HBsAg.

2. Тест-системы на определение иммуноглобулинов и ряд гормонов не взаимодействовали с суточными культурами различных штаммов *S. aureus* и не зависели от наличия или отсутствия гена Spa (белка А стафилококков) у этих бактерий.

## Список литературы / References

1. Гриценко В.А., Аминин Д.Л., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Иванов Ю.Б. Некоторые биологические эффекты иммуномодуляторов естественного и синтетического происхождения *in vitro* как основа создания новых лекарственных средств для борьбы с эндогенными инфекциями // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2012. Т. 3. С. 1-17. [Gritsenko V.A., Aminin D.L., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Ivanov Yu.B. Some biological effects immunomodulation by natural and synthetic origin *in vitro* as a basis for development of new drugs to combat the endogenous infections. *Bulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of UB RAS*, 2012, Vol. 3, pp. 1-17. (In Russ.)]
2. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. Бактерии как продуценты цитокиноподобных веществ // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 3. С. 374-376. [Zurochka A.V., Dukardt V.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Tyapayeva Ya.V., Gritsenko V.A. Bacteria as producers of cytokine-like substances. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 3, pp. 374-376. (In Russ.)]
3. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. Стафилококки как продуценты цитокиноподобных веществ // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 2. С. 134-136. [Zurochka A.V., Dukardt V.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Tyapayeva Ya.V., Gritsenko V.A. Staphylococcus as producers of cytokine-like substances. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 2, pp. 134-136. (In Russ.)]
4. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Фомина Л.О., Файзуллина А.И., Добрынина М.А., Гриценко В.А. Оценка цитокиноподобной активности *Staphylococcus aureus* в зависимости от наличия генетических детерминант стафилококкового белка А // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 3. С. 1163-1167. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Fomina L.O., Fayzullina A.I., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A. Estimation of cytokine-like activity of *Staphylococcus aureus* depending on the availability of genetic determinant of staphylococcal protein A. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 3, pp. 1163-1167. (In Russ.)]
5. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Фомина Л.О., Файзуллина А.И., Добрынина М.А., Гриценко В.А. Детекция цитокиноподобных веществ с помощью тест-системы для определения цитокинов мышей у *Staphylococcus aureus*, оппозитных по гену SPA // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 3. С. 1168-1172. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Fomina L.O., Fayzullina A.I., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A. Detection of cytokine-like substances with the help of a test system for the determination of cytokines in a mouse in *Staphylococcus aureus*, opposite for spa gene. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 3, pp. 1168-1172. (In Russ.)]
6. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Дукардт В.В., Гриценко В.А., Тяпаева Я.В., Черешнев В.А. Феномен наличия уникальной комбинации иммунобиологических свойств у синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМКФ) // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2016. Т. 2. 30 с. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Dukardt V.V., Gritsenko V.A., Tyapayeva Ya.V., Chereshev V.A. The

phenomenon of the presence of a unique combination of immunobiological properties of the synthetic analogue of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center UB RAS*, 2016, Vol. 2, 30 p. [Electronic resource]. Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>.]

7. Медик В.А., Токмачев М.С., Фишман Б.Б. Статистика в медицине и биологии. «Теоретическая статистика». Под ред. Комарова Ю.М. М.: Медицина, 2000. 412 с. [Medik V.A., Tokmachev M.S., Fishman B.B. *Statistika in medicine and biology*. "Theoretical statistics". Ed. by Yu. M. Komarov]. Moscow: Medicine, 2000. 412 p.

8. Суслов А.П., Коноплева М.В., Третьяков О.Ю. Фундаментальная иммунология провоспалительных цитокинов и MIF // Медицинская иммунология, 2006. Т. 8, № 1. С. 5-22. [Suslov A.P., Konopleva M.V., Tretyakov O.Yu. *Fundamental Immunobiology of pro-inflammatory cytokines and MIF*. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 1, pp. 5-22. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2006-1-5-22.

9. Фомина Л.О., Зурочка В.А., Симбирцев А.С., Гриценко В.А. Влияние времени культивирования *Staphylococcus aureus* на продукцию ими цитокино-подобных веществ, детектируемых методом иммуноферментного анализа // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), №3. С. 454-459. [Fomina L.O., Zurochka V.A., Simbirtsev A.S., Gritsenko V.A. Influence of time of cultivation of *Staphylococcus aureus* on the production of cytokine-like substances that detected by ELISA. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12 (21), no. 3, pp. 454-459. (In Russ.)]

10. Фомина Л.О., Файзуллина А.И., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Симбирцев А.С., Гриценко В.А. Сравнительная оценка цитокиноподобной активности *Staphylococcus aureus* мультиплексным и иммуноферментным анализом // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 460-465. [Fomina L.O., Fayzullina A.I., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Simbirtsev A.S., Gritsenko V.A. Comparative evaluation cytokine-like activity of *Staphylococcus aureus* by methods multiplex and ELISA. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12 (21), no. 3, pp. 460-465. (In Russ.)]

11. Javed N., Xue G., Lu A., Xing Y., Iwakura Y., Xiao H., Lecoeur H., Späth G.F., Meng G. Cross reactivity of *S. aureus* to murine cytokine assays: A source of discrepancy. *Cytokine*, 2016, Vol. 81, pp. 101-108.

12. Legac E., Vaugier G.-L., Bousquet F., Bajelan M., Leclerc M. Primitive cytokines and cytokine receptors in invertebrates: the Sea star *asterias rubens* as a model of study. *Scand. J. Immunol.*, 1996, Vol. 44, Iss. 4, pp. 375-380.

---

**Авторы:**

**Файзуллина А.И.** – аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия  
**Зурочка А.В.** – д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

**Authors:**

**Fayzullina A.I.**, Postgraduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation  
**Zurochka A.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

---

Поступила 03.06.2020  
Принята к печати 01.07.2020

Received 03.06.2020  
Accepted 01.07.2020

## ОЦЕНКА НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ПРОДУЦИРУЮЩИХ И НЕ ПРОДУЦИРУЮЩИХ ЦИТОКИНОПОДОБНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ПРИ ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

Фомина Л.О.<sup>1</sup>, Зурочка В.А.<sup>1</sup>, Добрынина М.А.<sup>1</sup>, Гриценко В.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» — филиал ФГБУН «Оренбургский федеральный научный центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Резюме.** Оценка цитокинового профиля, а именно определение содержания цитокинов в различных биологических жидкостях, имеет большое значение при иммунологической диагностике, изучении характеристик и состояния функциональной активности органов иммунной системы. При использовании иммуноферментного анализа (ИФА), как одного из наиболее распространенных методов диагностики, стоит учитывать характер биологического материала для исследования. В работе приведены результаты исследования супернатантов суточных бульонных культур *Staphylococcus aureus*, продуцирующих и не продуцирующих цитокиноподобные вещества, по определению неспецифической активности при проведении иммуноферментного анализа с применением наборов АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), а также тест-системы ООО «ХЕМА» (Москва) для диагностики некоторых инфекций и содержания уровня гормонов. С учетом выше изложенного, наибольший интерес представляет выявление неспецифических реакций отдельных клинических изолятов *S. aureus*, проявляющих цитокиноподобную активность, при определении методом иммуноферментного анализа некоторых гормонов, антигенов и иммуноглобулинов к различным инфекциям, а также сравнение этих характеристик с параметрами интенсивности бактериальной цитокиноподобной продукции. Установлено, что в супернатантах некоторых штаммов *Staphylococcus aureus*, продуцирующих цитокиноподобные вещества, тождественные человеческим, иммуноферментным методом было достоверно установлено отсутствие неспецифической перекрестной активности, кроме тест системы на HBsAg, что может свидетельствовать о высокой специфичности остальных изученных тест-систем и косвенно подтверждает предположение о том, что стафилококки секретируют белки, специфически реагирующие в основном с антителами против цитокинов человека, но могут давать перекрестные реакции с другими антигенами, но не антителами.

**Ключевые слова:** цитокины, цитокиноподобные вещества, иммуноферментный анализ, *S. aureus*, гормоны, антигены, иммуноглобулины

### Адрес для переписки:

Фомина Людмила Олеговна  
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»  
Уральского отделения Российской академии наук  
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.  
Тел.: 8 (900) 091-88-39.  
E-mail: fomina454@yandex.ru

### Address for correspondence:

Fomina Lyudmila O.  
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,  
Russian Academy of Sciences  
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,  
Pervomayskaya str., 106.  
Phone: 7 (900) 091-88-39.  
E-mail: fomina454@yandex.ru

### Образец цитирования:

Л.О. Фомина, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, В.А. Гриценко «Оценка неспецифической активности штаммов *Staphylococcus aureus*, продуцирующих и не продуцирующих цитокиноподобные вещества, при иммуноферментном анализе» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 169-174.  
doi: 10.46235/1028-7221-340-NAO

© Фомина Л.О. и соавт., 2020

### For citation:

L.O. Fomina, V.A. Zurochka, M.A. Dobrynina, V.A. Gritsenko  
“Non-specific activity of *Staphylococcus aureus* strains producing and not producing cytokine-like substances assessed by immuno-enzyme analysis”, *Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 169-174.  
doi: 10.46235/1028-7221-340-NAO

DOI: 10.46235/1028-7221-340-NAO

# NON-SPECIFIC ACTIVITY OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS PRODUCING AND NOT PRODUCING CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES ASSESSED BY IMMUNO-ENZYME ANALYSIS

Fomina L.O.<sup>a</sup>, Zurochka V.A.<sup>a</sup>, Dobrynina M.A.<sup>a</sup>, Gritsenko V.A.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** A cytokine profile covering cytokine level in various biological fluids is of great importance in immunology-based diagnostics, examining parameters and stated functional activity of immune system organs. While using ELISA as one of the most common diagnostics tools, it is worth taking into account origin of biological samples. Daily *Staphylococcus aureus* broth culture supernatants, positive and negative for cytokine-like substances, were used to determine non-specific activity by using enzyme immunoassay using kits purchased from the JSC "Vector-Best" (Novosibirsk) as well as kits of LLC "HEMA" (Moscow) to diagnose some infections and hormone levels. We found that in supernatants from some *Staphylococcus aureus* strain producing cytokine-like substances identical to human, the absence of non-specific cross-activity assessed by ELISA was documented except for the HBsAg test kit, which may indicate high specificity of the other kits studied and indirectly confirm an assumption that staphylococci secrete proteins specifically reacting mainly with antibodies against human cytokines, but can also cross-react with other antigens, but not antibodies.

**Keywords:** cytokines, cytokine-like substances, enzyme immunoassay, *S. aureus*, hormones, antigens, immunoglobulins

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1 и теме из Плана НИР ИКВС УрО РАН, № гос. регистрации 116021510075.

## Введение

Оценка цитокинового профиля, а именно определение содержания цитокинов в различных биологических жидкостях, имеет большое значение при иммунологической диагностике, изучении характеристик и состояния функциональной активности органов иммунной системы. При использовании иммуноферментного анализа (ИФА), как одного из наиболее распространенных методов диагностики, стоит учитывать характер биологического материала для исследования. Так, в отдельных случаях при контаминации биологических жидкостей бактериальными инфекционными агентами (септицемия, бактериальный менингит, условно-патогенная микробиота слизистых оболочек организма), возможно наличие ложноположительных или завышенных результатов из-за перекрестно реагирующих антигенных эпитопов микробов, что согласуется с недавно опубликованными результатами исследований зарубежных авторов Javed N. и соавт. [10], где было показано, что супернатанты отдельных

клинических изолятов *S. aureus* при ИФА обнаруживают перекрестную реакцию с антителами к мышинным цитокинам IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  [10].

Стоит отметить, что вне зависимости от вида детекции, как ранее нами было показано, при использовании тест-систем как для иммуноферментного (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург), так и для мультиплексного анализа (BioRAD и Multiplex, США) в супернатантах суточных культур бактерий разных видов микроорганизмов определялись цитокиноподобные вещества (ЦПВ), аналогичные цитокинам человека, и особенно это было характерно для *S. aureus*, для которого было показано широкое разнообразие как по спектру определяемых ЦПВ, так и по их концентрации в супернатантах суточных культур бактерий [1, 2, 3, 4, 5, 8, 9].

Подобная детекция цитокинов также может быть связана не только с перекрестной реактивностью, но и с наличием в структуре специфических белковых молекул высоко консервативных участков первичной формы белка, сформировавшихся в ходе эволюции, что укладывается в теорию существования примитивных цитокинов беспозвоночных и бактерий. Еще в 1996 году Legas E. и соавт. установили, что аксиальные клетки морской звезды экспрессируют структуры, сходные с человеческими рецепторами для

IL-1, IL-2, IL-6 и  $IFN\gamma$ , тем самым подтвердив наличие цитокиновой сети у беспозвоночных [11].

Логика данного фундаментального направления прослеживается в ряде научных исследований, посвященных изучению цитокинов, например, у Сулова А.П. и соавт., которые обнаружили эволюционно общие высоко консервативные по первичной структуре гомологи MIF у растений и бактерий, но при этом отметили гомологию уникальной третичной структуры лишь с низшими животными, то есть до появления адаптивной и врожденной иммунной системы [7].

Применение ИФА в диагностических целях также требует выявления и изучения причин неспецифических реакций, а также поиск возможностей их устранения.

С учетом вышеизложенного, наибольший интерес представляет выявление неспецифических реакций отдельных клинических изолятов *S. aureus*, проявляющих цитокиноподобную активность, при определении методом иммуноферментного анализа некоторых гормонов, антигенов и иммуноглобулинов к различным инфекциям, а также сравнение этих характеристик с параметрами интенсивности бактериальной цитокиноподобной продукции.

**Целью настоящего исследования** явилось изучение неспецифической активности у клинических и музейных штаммов *S. aureus* при использовании тест-систем для иммуноферментного анализа.

## Материалы и методы

Исследования проведены на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург) Оренбургского федерального научного центра УрО РАН в филиале Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (г. Оренбург).

В анализ для сравнительной оценки неспецифической активности бактерий, демонстрировавших ранее цитокиноподобную активность, были взяты результаты исследования следующих 20 штаммов *S. aureus*: 33, 34, 37, 39, 44, 43, 48, 51, 52, 53, 60, 61, ОЛ 1, ОЛ 2, ОЛ 3, ПЦ 7, ПЦ 8, ПЦ 9, ПЦ 13, ПЦ 14 из музея культур ОФИЦ УрО РАН (ИКВС УрО РАН).

Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 24 ч при 37 °С, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин и препаративно отбирали фильтрат надосадочной жидкости (супернатант).

Наличие возможного перекрестного неспецифического отклика в супернатантах бактерий, продуцирующих цитокиноподобные вещества (ЦПВ), определяли методом иммуноферментного анализа на приборе Multiscan (США) с ис-

пользованием тест-систем АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) для определения НВsAg-ИФА-БЕСТ, (кат. № (ref) D-0544, серия (lot) 78 до 31.10.2020) и для определения ферритина ИФА-Бест (кат. № (ref) T-8552, серия (lot) 100 до 06.11.2020), также были использованы тест-системы ООО «ХЕМА» (Москва) для определения иммуноглобулинов: Rubella IgG-ИФА, (кат. № (ref) K-102, серия (lot) 9032 до 05.2021), общего IgE-ИФА, (кат. № (ref) K200, серия (lot) 910 до 06.2021) и для определения гормонов с помощью 17-ОН-прогестерон-ИФА, (кат. № (ref) K-217, серия (lot) 810 до 07.2020), Эстрадиол-ИФА (кат. № (ref) K-208, серия (lot) 901 до 09.2020). Выбор тест-систем был связан с максимальной удаленностью антигенных детерминант стафилококка от антигенов и антител, для определения которых предназначены данные тест-системы (в доступной нам литературе данных за гомологию к выбранным тест-системам у стафилококков выявлено не было).

Опыты проводили в двух повторах; анализировали результаты измерения оптической плотности (ОП) проб. Во всех случаях контролем служил мясо-пептонный бульон (МПБ) без бактерий и контрольный положительный или отрицательный образец соответствующей тест-системы.

### Статистика

Анализ и систематизация исходных данных, а также визуализация, полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2013. Данные по оптической плотности выражали при помощи среднеарифметического значения группы и его стандартного отклонения. Результаты данных описывались при помощи среднеарифметического значения (М) и стандартной ошибки среднего (m). Достоверность отличий определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни (различия считали достоверными при  $p < 0,05$ ) [6] для независимых совокупностей с помощью программы IBM SPSS Statistics версия 23.0.

## Результаты

Полученные данные, суммированные в таблице 1, свидетельствуют о том, что в супернатантах суточных культур *S. aureus*, у которых ранее выявлялась или не выявлялась цитокиноподобная активность [5, 8, 9], определялась степень специфического или неспецифического связывания методом ИФА структур микробного компонента супернатанта с тест-системами для определения НВsAg, ферритина, Rubella IgG, общего IgE, Эстрадиол и 17-ОН прогестерона, при этом статистически значимые различия были установлены между показателями МПБ (контроль среды) и средним уровнем оптической плотности образца во всей выборке штаммов ( $p < 0,05$ ) при опреде-

**ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩИХ СУТОЧНЫХ КУЛЬТУР S. AUREUS (ШТАММЫ: 33, 34, 37, 39, 44, 43, 48, 51, 52, 53, 60, 61, ОЛ 1, ОЛ 2, ОЛ 3, ПЦ 7, ПЦ 8, ПЦ 9, ПЦ 13, ПЦ 14), ОТНОСИТЕЛЬНО КОНТРОЛЯ СРЕДЫ – МПБ ИФА МЕТОДОМ, n = 10, о. е.**

TABLE 1. COMPARISON FOR THE NONSPECIFIC ACTIVITY OF CYTOKINE-PRODUCING DIURNAL CULTURES OF S. AUREUS (STRAINS: 33, 34, 37, 39, 44, 43, 48, 51, 52, 53, 60, 61, OL 1, OL 2, OL 3, PC 7, PC 8, PC 9, PC 13, PC 14), REGARDING BROTH CONTROL – MIB IN ELISA METHOD, n = 10, r. u.

Наименование тест-системы Name of the kit	Контроль (положительный контроль для всех, кроме HBsAg- ИФА), оптическая плотность образца, n = 10, о. е. Control (positive control for all except HBsAg- ELISA), optical density of the sample, n = 10, r. u.	МПБ (контроль среды), оптическая плотность образца, n = 10, о. е. MIB (broth control), optical density of the sample, n = 10, r. u.	n = 20		Наличие неспецифических реакций (качественная оценка превышения порога оптической плотности образца относительно контроля среды) Presence of non-specific reactions (qualitative assessment of exceeding the threshold of optical density of the sample relative to the broth control)
			Диапазон (min- max) Оптической плотности образца, во всей выборке штаммов, n = 10, о. е. Range (min-max) of Optical density of the sample, in the entire sample of strains, n = 10, r. u.	Средний уровень Оптической плотности образца, (M±m) во всей выборке штаммов, n = 10, о. е. Average level of Optical density of the sample, (M±m) in the entire sample of strains, n = 10, r. u.	
<b>Rubella IgG-ИФА, ООО «ХЕМА»</b> (Москва) Rubella IgG-IEA, LLC "HEMA" (Moscow)	1,081	0,012±0,001	0,009-0,024	0,013±0,001	<b>нет</b> negative
<b>17-ОН-ИФА, ООО «ХЕМА» (Москва)</b> 17-OH-progesterone-IEA LLC "HEMA", (Moscow)	1,629	2,623±0,013	2,383-2,607	2,526±0,015	<b>нет</b> negative
<b>IgE-ИФА, ООО «ХЕМА» (Москва)</b> IgE-IEA, LLC "HEMA" (Moscow)	0,581	0,018±0,001	0,018-0,211	0,075±0,014	<b>нет</b> negative
<b>Ферритин- ИФА-БЕСТ, АО «Вектор-Бест»</b> (г. Новосибирск) Ferritin-IEA-BEST, JSC "Vector-best" (Novosibirsk)	0,547	0,004±0,001	0,004-0,064	0,029±0,006	<b>нет</b> negative
<b>Эстрадиол- ИФА, ООО «ХЕМА»</b> (Москва) Estradiol-IEA, LLC "HEMA", (Moscow)	1,740	0,711±0,009	0,682-0,759	0,727±0,004	<b>нет</b> negative
<b>HBsAg-ИФА-БЕСТ, АО «Вектор-Бест»</b> (г. Новосибирск) HBsAg-IEA-BEST, JSC "Vector-best" (Novosibirsk)	<b>(К отр) 0,078</b> (K neg)	0,216±0,006	0,137-0,748	0,385±0,046*	<b>есть</b> positive

Примечание. \* – статистически значимые различия между показателями МПБ (контроль среды) и средним уровнем оптической плотности образца во всей выборке штаммов (p < 0,05).

Note. \*, statistically significant differences between the performance of the MIB (broth control) and the average optical density of the sample in the entire combination of strains (p < 0.05).

лении HBsAg. С другими тест-системами (гормоны и антитела) неспецифического действия супернатантов стафилококков выявлено не было.

## Обсуждение

В проведенном исследовании установлено, что методами иммуноферментного анализа в супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus* определяется неспецифическая активность в отношении только тест системы для определения HBsAg. Учитывая, что в анализ брали стафилококки как с высокой ЦПВ активностью, так и с низкой [8, 9], а тест-система реагировала на все стафилококки одинаково, напрашивается вывод о том, что в супернатантах различных штаммов *S. aureus* присутствуют какие-то другие антигенные детерминанты, напрямую не связанные с ЦПВ активностью.

В то же время согласно данным Сулова А.П. и соавт. MIF проявляет свойства суперлиганда, связываясь со множеством биологически важных молекул, а также HBsAg могут активировать таутомеразную активность рекомбинантного MIF [7]. Возможно, в силу подобных особенно-

стей и наблюдается неспецифическая реакция супернатантов культур *S. aureus* со структурами тест-системы для определения HBsAg.

Очень важно отметить отсутствие взаимодействия тест-систем для определения иммуноглобулинов - если бы было выявлено такое взаимодействие, то его можно было бы связать с неспецифическим взаимодействием с белком А стафилококков, для уточнения же данного вопроса необходимо провести идентичное исследование со стафилококками, имеющими и не имеющими ген Spa.

## Выводы

1. В супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus* иммуноферментными тест-системами различных фирм производителей выявляется неспецифическая активность антигенных детерминант стафилококков в отношении тест-системы для определения HBsAg.

2. Тест-системы на определение иммуноглобулинов и ряда гормонов не взаимодействовали с суточными культурами различных штаммов *S. aureus*.

## Список литературы / References

1. Гриценко В.А., Аминин Д.Л., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Иванов Ю.Б. Некоторые биологические эффекты иммуномодуляторов естественного и синтетического происхождения *in vitro* как основа создания новых лекарственных средств для борьбы с эндогенными инфекциями // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2012. Т. 3. С. 1-17. [Gritsenko V.A., Aminin D.L., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Ivanov Yu.B. Some biological effects immunomodulation by natural and synthetic origin *in vitro* as a basis for development of new drugs to combat the endogenous infections. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of UB RAS*, 2012, Vol. 3, pp. 1-17. (In Russ.)]
2. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Дукардт В.В., Гриценко В.А., Тяпаева Я.В., Черешнев В.А. Феномен наличия уникальной комбинации иммунобиологических свойств у синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2016. Т. 2. 30 с. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Dukardt V.V., Gritsenko V. A., Tyapaeva Ya.V., Chereshev V.A. The phenomenon of the presence of a unique combination of immunobiological properties of the synthetic analogue of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center UB RAS*, 2016, Vol. 2, 30 p. (In Russ.)]
3. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. Бактерии как продуценты цитокиноподобных веществ // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 3. С. 374-376. [Zurochka A.V., Dukardt V.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zuyeva E.B., Tyapaeva Ya.V., Gritsenko V.A. Bacteria as producers of cytokine-like substances. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 3, pp. 374-376. (In Russ.)]
4. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Дукардт В.В., Гриценко В.А. Цитокиновая и антицитокиновая активность стафилококков. Методические особенности // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 4. С. 707-709. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zuyeva E.B., Tyapaeva Ya.V., Dukardt V.V., Gritsenko V.A. Cytokine and anti-cytokine activity of staphylococci. Methodical features. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 4, pp. 707-709. (In Russ.)]
5. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. Стафилококки как продуценты цитокиноподобных веществ // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 2. С. 134-136. [Zurochka A.V., Dukardt V.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zuyeva E.B., Tyapaeva Ya.V., Gritsenko V.A. Staphylococcus as producers of cytokine-like substances. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 2, pp. 134-136. (In Russ.)]

6. Медик В.А., Токмачев М.С., Фишман Б.Б. Статистика в медицине и биологии. «Теоретическая статистика». Под ред. Комарова Ю.М. М.: Медицина, 2000. 412 с. [Medik V.A., Tokmachev M.S., Fishman B.B. Statistika in medicine and biology. «Theoretical statistics». Ed. by Yu.M. Komarov]. Moscow: Medicine, 2000. 412 p.
7. Суслов А.П., Коноплева М.В., Третьяков О.Ю. Фундаментальная иммунобиология провоспалительных цитокинов и MIF // Медицинская иммунология, 2006. Т. 8, № 1. С. 5-22. [Suslov A.P., Konopleva M.V., Tretyakov O.Yu. Fundamental Immunobiology of pro-inflammatory cytokines and MIF. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 1, pp. 5-22. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2006-1-5-22.
8. Фомина Л.О., Зурочка В.А., Симбирцев А.С., Гриценко В.А. Влияние времени культивирования *Staphylococcus aureus* на продукцию ими цитокино-подобных веществ, детектируемых методом иммуноферментного анализа // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 454-459. [Fomina L.O., Zurochka V.A. Simbirtsev A.S., Gritsenko V.A. Influence of time of cultivation of *Staphylococcus aureus* on the production of cytokine-like substances that detected by ELISA. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12 (21), no. 3, pp. 454-459. (In Russ.)]
9. Фомина Л.О., Файзуллина А.И., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Симбирцев А.С., Гриценко В.А. Сравнительная оценка цитокиноподобной активности *Staphylococcus aureus* мультиплексным и иммуноферментным анализом // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 460-465. [Fomina L.O., Fayzullina A.I., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Simbirtsev A.S., Gritsenko V.A. Comparative evaluation cytokine-like activity of *Staphylococcus aureus* by methods multiplex and ELISA. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12 (21), no. 3, pp. 460-465. (In Russ.)]
10. Javed N., Xue G., Lu A., Xing Y., Iwakura Y., Xiao H., Lecoeur H., Späth G.F., Meng G. Cross reactivity of *S. aureus* to murine cytokine assays: A source of discrepancy. *Cytokine*, 2016, Vol. 81, pp. 101-108.
11. Legac E., Vaugier G.-L., Bousquet F., Bajelan M., Leclerc M. Primitive cytokines and cytokine receptors in invertebrates: the sea star *asterias rubens* as a model of study. *Scand. J. Immunol.*, 1996, Vol. 44, Iss. 4, pp. 375-380.

---

**Авторы:**

**Фомина Л.О.** — аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

**Зурочка В.А.** — д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

**Добрынина М.А.** — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

**Гриценко В.А.** — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» — филиал ФГБУН «Оренбургский федеральный научный центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Authors:**

**Fomina L.O.**, Graduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

**Zurochka V.A.**, PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

**Dobrynina M.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Immunology of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

**Gritsenko V.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

---

Поступила 09.06.2020  
Принята к печати 01.07.2020

Received 09.06.2020  
Accepted 01.07.2020

## **ВЛИЯНИЕ БЕТА-ЭНДОРФИНА И ДИНОРФИНА А НА АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO***

**Южанинова С.В., Гилёва С.Г.**

ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» Уральского отделения Российской академии наук,  
г. Пермь, Россия

**Резюме.** Наряду с функционированием в ткани нервной системы эндогенные опиоидные пептиды — агонисты мю-, дельта- и каппа-опиоидных рецепторов — оказывают разнообразное регулирующее влияние на клетки иммунной системы. Кроме того, существуют экспериментальные доказательства того, что экзогенный агонист мю-опиоидных рецепторов — морфин — оказывает влияние на жизнеспособность клеток иммунной системы. Данные эффекты обнаружены в экспериментах как с клеточными культурами, так и на лабораторных животных. Поэтому мы исследовали влияние эндогенных опиатов — динорфина А и бета-эндорфина — на жизнеспособность мононуклеаров периферической крови человека. В наших экспериментах была использована периферическая венозная кровь 14 условно здоровых добровольцев, каждый из которых перед забором биоматериала подписывал информированное согласие и имел возможность задать все интересующие его вопросы. Мононуклеарные клетки получали из гепаринизированной венозной крови методом разделения на градиенте плотности по стандартной методике. Для оценки пролиферации мононуклеары культивировали во влажной атмосфере в течение 72 часов. За 18 часов до окончания культивирования в каждую лунку вносили по 2 мкКи <sup>3</sup>H-метилтимидина. Радиоактивность проб определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике “Guardian” (Wallac, Финляндия) и выражали в имп/мин. Для оценки развития апоптоза клетки культивировали в течение суток в тех же условиях, за исключением добавления радиоактивной метки. Затем клетки окрашивали с помощью реагентов Annexin V-FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, США) согласно инструкции производителя и регистрировали апоптоз лимфоцитов методом проточной цитометрии. Исследование апоптоза клеток проводили на проточных цитофлюориметрах BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США) или CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Гейт лимфоцитов (гейтировали по параметрам прямого и бокового светорассеяния) отображали на гистограмме Annexin V-FITC/7-AAD и подсчитывали долю (в процентах) живых клеток, связывающих аннексин (Annexin V-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>). Статистическую обработку результатов проводили с использованием парного t-критерия Стьюдента. Было установлено, что агонисты мю- и каппа-опиоидных рецепторов бета-эндорфин и динорфин соответственно в физиологических концентрациях

### **Адрес для переписки:**

Южанинова Светлана Вадимовна  
ФГБУН «Институт экологии и генетики  
микроорганизмов» Уральского отделения Российской  
академии наук  
614002, Россия, г. Пермь, ул. Ленина, 11.  
Тел.: 8 (902) 806-44-82.  
Факс: 8 (342) 280-92-11.  
E-mail: ecolimmlab@yandex.ru

### **Address for correspondence:**

Yuzhaninova Svetlana V.  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,  
Ural Branch, Russian Academy of Sciences  
614002, Russian Federation, Perm, Lenin str., 11.  
Phone: 7 (902) 806-44-82.  
Fax: 7 (342) 280-92-11.  
E-mail: ecolimmlab@yandex.ru

### **Образец цитирования:**

С.В. Южанинова, С.Г. Гилёва «Влияние бета-эндорфина и динорфина А на апоптоз лимфоцитов периферической крови человека *in vitro*» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 175-180.  
doi: 10.46235/1028-7221-318-EOB  
© Южанинова С.В., Гилёва С.Г., 2020

### **For citation:**

S.V. Yuzhaninova, S.G. Gileva “Effects of beta-endorphin and dynorphin A on *in vitro* apoptosis in human peripheral blood lymphocytes”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 175-180.  
doi: 10.46235/1028-7221-318-EOB  
DOI: 10.46235/1028-7221-318-EOB

( $10^{-10}$ М и  $10^{-8}$ М) оказывают разнонаправленное влияние на пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови человека. Так, динорфин А стимулирует спонтанную пролиферацию и пролиферацию, вызванную субоптимальным воздействием митогена. Бета-эндорфин усиливает эффект субоптимальной концентрации митогена и значительно угнетает пролиферацию при максимальной активации клеток. Модулирующие эффекты бета-эндорфина и динорфина А *in vitro* на пролиферацию не связаны с усилением гибели клеток путем апоптоза.

*Ключевые слова:* бета-эндорфин, динорфин А, пролиферация, апоптоз, опиоидные пептиды, лимфоциты

## EFFECTS OF BETA-ENDORPHIN AND DYNORPHIN A ON IN VITRO APOPTOSIS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

Yuzhaninova S.V., Gileva S.G.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

**Abstract.** Along with functioning in the nerve system, the endogenous opioid peptides as the ligands of mu-, delta-, and kappa-opioid receptors exert multiple effects on immune cells. Moreover, experimental evidence showed that morphine as an exogenous agonist of mu-opioid receptors affects immune cell viability. Such effects were discovered in experiments with cultured cells and laboratory animals. Hence, we studied effects of endogenous opioid peptides dynorphin A and beta-endorphin on viability of human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. For this, we used samples of peripheral blood cells collected from the fourteen healthy volunteers, who provided with signed informed consent and might request any information regarding the research. Mononuclear cells were collected from the heparinized blood samples according to standard protocol and cultivated in the humid atmosphere for 72 hours. Two  $\mu$ Ci  $^3$ H-Methyl-thymidine was added into each test tube at 18 hours before the end of the cultivation period. Scintillation counting was performed by using Guardian liquid scintillation analyzer (Wallac, Finland) expressing the data as count per minute. To assess apoptosis, the cells were cultured for 24 hours in similar conditions except for adding radioactive probe. Next, the cells were stained with Annexin V-FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, USA) according to the manufacturer's instructions for further recording apoptotic cells in flow cytometers BD FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) or CytoFLEX S (Beckman Coulter, USA). The lymphocyte gate set by light scatter parameters was shown in typical Annexin V-FITC vs 7-AAD plot followed by counting Annexin V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup> cells. All data were expressed as means  $\pm$  S.E. Statistical significance was assessed by using Student's t-test. It was found that physiologic concentrations of mu- and kappa-opioid receptor agonists beta-endorphin and dynorphin A exerted multidirectional effects on proliferation of human peripheral blood lymphocytes. In particular, dynorphin A increased basal proliferation and proliferation in response to suboptimal mitogen stimulation. Moreover, beta-endorphin enhanced effects of mitogen stimulation at suboptimal concentration but profoundly suppressed proliferation in maximally activated cells. The modulating effects of beta-endorphin and dynorphin A on *in vitro* proliferation are not associated with augmented cell apoptosis.

*Keywords:* beta-endorphin, dynorphin A, proliferation, apoptosis, opioid peptides, lymphocytes

Исследования проведены в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы № АААА-А19-119112290007-7.

### Введение

Эндогенные опиоидные пептиды — это небольшие по размеру (в среднем 10-30 аминокис-

лот) молекулы, которые являются лигандами  $\mu$ -,  $\delta$ - и  $\kappa$ -опиатных рецепторов и функционируют в центральной и периферической нервной системе. Помимо этого, опиоидные пептиды оказывают регуляторное влияние на клетки иммунной системы, затрагивая почти все известные стороны их функционирования: пролиферацию, диф-

ференцировку, синтез и секрецию цитокинов, цитотоксичность, фагоцитоз и другие эффектор-ные реакции. Иммуномодулирующие эффекты опиоидных пептидов главным образом рассма-триваются в рамках нервной регуляции функций иммунной системы при стрессе [1, 2].

Известно, что хронический стресс вызывает угнетение иммунных реакций [8]. С этим утверж-дением хорошо согласуется факт наличия апопто-зиндуцирующего влияния на клетки иммунной системы у агониста мю-опиоидных рецепторов – морфина [4, 5, 6, 7, 9, 10]. Однако морфин – это экзогенная молекула. А данных, указывающих на наличие апоптозиндуцирующего влияния у эн-догенных опиоидных пептидов крайне мало [7]. Учитывая, что системный ответ на хронический стресс (в виде секреции кортикостерона) зависит от стимуляции каппа- и мю-, но не дельта-опио-идных рецепторов (Wang, 2002), мы исследовали прямое апоптозиндуцирующее влияние соот-ветствующих агонистов – динорфина А и бета-эндорфина – на лимфоциты периферической крови человека. Тестирование апоптозиндуци-рующих свойств выбранных пептидов проводили на фоне поликлональной стимуляции лимфоци-тов как модели иммунного ответа *in vitro*.

## Материалы и методы

В исследованиях была использована перифе-рическая венозная кровь 14 условно здоровых добровольцев (3 мужчин и 11 женщин), средний возраст 22-45 лет. Перед забором крови с каждым донором заключался письменный договор о со-гласии на забор биоматериала. Затем 10 мл кро-ви, полученной путем венепункции, смешивали с 25 ЕД/мл гепарина («Эльфа Лабораториз», Ин-дия) и немедленно использовали в эксперименте.

### Выделение и культивирование клеток

Мононуклеарные клетки получали из гепари-низированной венозной крови методом разделе-ния на градиенте плотности 1,077 г/см<sup>3</sup> фиколла («ДИАЭМ», Россия) по стандартной методике [3]. Для оценки пролиферации мононуклеары куль-тивировали в 96-луночных круглодонных план-шетах. Каждая культура содержала 2 · 10<sup>5</sup> клеток в 0,2 мл полной питательной среды, которую гото-вили на основе среды RPMI-1640 с добавлением 10 mM HEPES (Sigma, США), 2 mM L-глутамина (Sigma, США), 100 мкг/мл гентамицина (KRKA, Словения) и 10% эмбриональной телячьей сыво-ротки (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, США). Культивирование осуществляли во влажной ат-мосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С в течение 72 часов в присутствии различных концентраций фито-гемагглютиниана (ФГА). За 18 часов до оконча-

ния культивирования в каждую лунку вносили по 2 мкКи <sup>3</sup>H-метилтимидина в объеме 10 мкл. Радиоактивность проб определяли на жидкост-ном сцинтилляционном счетчике “Guardian” (Wallac, Финляндия). β-эндорфин (Sigma, США) и динорфин А (Sigma, США) использовали в ко-нечных концентрациях 10<sup>-10</sup> и 10<sup>-8</sup> М, наиболее соответствующих физиологическим, и вносили в культуры сразу с момента их постановки.

### Оценка апоптоза

После суточной инкубации клетки однократ-но отмывали раствором DPBS (Sigma, США) и окрашивали с помощью реагентов Annexin V-FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, США) со-гласно инструкции производителя и регистри-ровали апоптоз лимфоцитов методом проточной цитометрии.

Исследование апоптоза клеток проводили на проточных цитофлюориметрах BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США) или CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Для оценки развития апоптоза лимфоциты гейтировали по параме-трам прямого и бокового светорассеяния. Гейт лимфоцитов отображали на гистограмме Annexin V-FITC/7-AAD и подсчитывали долю живых кле-ток, связывающих аннексин (Annexin V-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>). Доля некротизированных клеток была по-стоянна (данные не представлены).

Статистическая обработка результатов прово-дилась в программе Excel с использованием пар-ного t-критерия Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Данные о влиянии пептидов на пролифера-тивный ответ мононуклеарных клеток перифе-рической крови человека приведены в таблице 1. Обнаружено, что динорфин А оказывает стиму-лирующее влияние на спонтанную пролифера-цию, так как увеличение захвата радиоактив-ной метки интактными клетками произошло в присутствии обеих концентраций динорфина А (p < 0,05). Также можно отметить некоторую тен-денцию к увеличению радиоактивности культур с ростом концентрации пептида.

Стимулирующее влияние динорфина А про-должается на фоне слабой митогенной активаци-и. Однако статистически значимый эффект достигается только при большой (10<sup>-8</sup>М) концен-трации пептида (табл. 1). При дальнейшем уси-лении митогенной активации стимулирующий эффект пептида исчезает.

Таким образом, динорфин в целом усили-вает пролиферацию мононуклеаров человека, действуя на интактные и слабо активированные клетки.

**ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ДИНОРФИНА А И β-ЭНДОРФИНА НА ВКЛЮЧЕНИЕ <sup>3</sup>H-МЕТИЛТИМИДИНА\* В ЛИМФОЦИТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, СТИМУЛИРОВАННЫЕ ФГА**

**TABLE 1. EFFECTS OF DYNORPHIN A AND β-ENDORPHIN ON THE INCORPORATION OF <sup>3</sup>H-METHYL THYMIDINE\* INTO HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES STIMULATED BY PHA**

Концентрация пептида Peptide concentration	Концентрация ФГА (мкг/мл) PHA concentration (mkg/ml)		
	Без митогена No mitogen	2,5	20
Контроль Control	175,5±31,2	3860,7±1298,8	32076,0±8091,0
Динорфин А 10 <sup>-10</sup> М Dynorphin A 10 <sup>-10</sup> M	294,7±44,0**	5081,3±1601,0	29908,8±8681,3
Динорфин А 10 <sup>-8</sup> М Dynorphin A 10 <sup>-8</sup> M	352,9±98,5**	5913,0±1712,4**	29320,5±7982,8
Контроль Control	833,4±134,8	3412,2±751,3	19326,9±3928,8
β-эндорфин 10 <sup>-10</sup> М β-Endorphin 10 <sup>-10</sup> M	1188,0±290,9	3803,5±838,2	7175,9±1585,8**
β-эндорфин 10 <sup>-8</sup> М β-Endorphin 10 <sup>-8</sup> M	1306,7±375,3	6796,1±1974,0**	17401,9±4837,5

Примечание. \* – приведены значения М±m для значений имп/мин; \*\* – p < 0,05 по сравнению с контролем по парному t-критерию.

Note. \*, M±m values for imp/min values are given; \*\*, p < 0.05 compared with control by paired t-test.

**ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ДИНОРФИНА А И β-ЭНДОРФИНА НА ДОЛЮ (В ПРОЦЕНТАХ) ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, СВЯЗЫВАЮЩИХ АННЕКСИН\* И СТИМУЛИРОВАННЫХ ФГА**

**TABLE 2. EFFECTS OF DYNORPHIN A AND β-ENDORPHIN ON THE PROPORTION OF ANNEXIN BINDING HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES\* STIMULATED BY PHA**

Концентрация пептида Peptide concentration	Концентрация ФГА (мкг/мл) PHA concentration (mkg/ml)		
	Без митогена No mitogen	2,5	20
Контроль Control	30,5±1,9	34,0±2,6	60,7±3,4
Динорфин А 10 <sup>-10</sup> М Dynorphin A 10 <sup>-10</sup> M	31,0±2,2	33,2±2,3	61,5±3,4
Динорфин А 10 <sup>-8</sup> М Dynorphin A 10 <sup>-8</sup> M	31,4±2,2	32,9±2,3	61,5±3,3
β-эндорфин 10 <sup>-10</sup> М β-Endorphin 10 <sup>-10</sup> M	32,6±2,6	33,3±2,2	61,1±2,9
β-эндорфин 10 <sup>-8</sup> М β-Endorphin 10 <sup>-8</sup> M	32,9±2,4	33,0±2,3	59,0±2,8

Примечание. \* – приведены значения М±m.

Note. \*, M±m values are given.

Несколько по-иному пролиферацию мононуклеарных клеток человека модулирует бета-эндорфин (табл. 1). Во-первых, пептид проявляет активность только в отношении стимулированных клеток. Во-вторых, его эффекты имеют разную направленность. Так, подобно динорфину А, бета-эндорфин усиливает пролиферацию на фоне слабой митогенной стимуляции. Но при ее усилении пептид обнаруживает противоположное действие: в присутствии небольшой концентрации бета-эндорфина происходит почти трехкратное угнетение пролиферации. Однако этот эффект исчезает с ростом концентрации пептида.

Таким образом, бета-эндорфин оказывает разнонаправленное модулирующее влияние на пролиферацию, вектор которого зависит от интенсивности стимулирующего фактора и концентрации самого пептида.

Чтобы определить, не связано ли ингибирующее действие бета-эндорфина с усилением гибели клеток, мы оценили один из признаков апоптоза – экспрессию фосфатидилсерина на внешней стороне плазматической мембраны клеток.

Как следует из таблицы 2, бета-эндорфин (в обоих использованных концентрациях, а равно и динорфин А) не оказал влияния на долю мононуклеарных клеток, связывающих аннексин и, соответственно, не влиял на процессы апоптоза в лимфоцитах.

Результаты нашей работы показывают, что в отношении лимфоцитов крови человека динорфин и бета-эндорфин обладают иммуномодулирующими эффектами, которые носят индивидуальный характер. В частности, динорфин А преимущественно поддерживает, тогда как бета-эндорфин поддерживает слабую и угнетает

выраженную пролиферацию клеток. Также нам удалось обнаружить, что оба пептида лишены апоптозиндуцирующего действия *in vitro*. Это дает основания утверждать, что у естественных агонистов мю- и каппа-опиоидных рецепторов отсутствует прямое апоптозиндуцирующее действие на лимфоциты человека.

Такое утверждение в отношении бета-эндорфина не согласуется с данными, полученными при исследовании свойств другого агониста мю-опиоидных рецепторов [4, 9, 10] – морфина. Инкубируя тот же объект исследования, что и в наших экспериментах, с морфином, авторы обнаружили появление у мононуклеаров надежных признаков апоптоза: фрагментации ДНК [4] и экспрессии Fas [9]. Морфин также индуцирует апоптоз у других клеток иммунной системы – макрофагов [7]. Однако в этом случае его влияние гораздо сильнее по сравнению с бета-эндорфином [7]. Суммируя данные литературы и собственные результаты, можно предположить, что апоптозиндуцирующее влияние бета-эндорфина на клетки иммунной системы выражено слабо по сравнению с морфином и проявляется избирательно.

Сведения об отсутствии у динорфина А прямого апоптозиндуцирующего действия в отношении лимфоцитов человека получены впервые.

1. Бета-эндорфин и динорфин А в зависимости от концентрации и интенсивности митогенного воздействия модулируют пролиферативный ответ лимфоцитов *in vitro*.

2. Бета-эндорфин и динорфин А не влияют на спонтанный и ФГА индуцированный апоптоз лимфоцитов *in vitro*.

## Список литературы / References

1. Гейн С.В. Динорфины в регуляции функций иммунной системы // Биохимия, 2014. Т. 79, № 5. С. 509-519. [Gein S.V. Dynorphins in regulation of immune system functions. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2014, Vol. 79, no. 5, pp. 509-519. (In Russ.)]
2. Гейн С.В., Баева Т.А. Эндогенные опиоидные пептиды в регуляции функций клеток врожденного иммунитета // Биохимия, 2011. Т. 76, № 3. С. 379-390. [Gein S.V., Baeva T.A. Endogenous opioid peptides in regulation of innate immunity cell functions. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2011, Vol. 76, no. 3, pp. 379-390. (In Russ.)]
3. Лимфоциты: методы / Под ред. Дж. Клауса; Пер. с англ. А.Н. Маца, А. А. Фельдшеровой. М.: Мир, 1990. 395 с. [Lymphocytes: Methods. Ed. by J. Klaus; Transl. from Engl. A.N. Matz, A.A. Feldsherova]. Moscow: Mir, 1990. 395 p.
4. Nair M.P., Schwartz S.A., Polasani R., Hou J., Sweet A., Chadha K.C. Immunoregulatory effects of morphine on human lymphocytes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1997, Vol. 4, no. 2, pp. 127-132.
5. Singhal P.C., Kapasi A.A., Franki N., Reddy K. Morphine-induced macrophage apoptosis: the role of transforming growth factor-beta. *Immunology*, 2000, Vol. 100, no. 1, pp. 57-62.
6. Singhal P.C., Reddy K., Franki N., Sanwal V., Gibbons N. Morphine induces splenocyte apoptosis and enhanced mRNA expression of cathepsin-B. *Inflammation*, 1997, Vol. 21, no. 6, pp. 609-617.
7. Singhal P.C., Sharma P., Kapasi A.A., Reddy K., Franki N., Gibbons N. Morphine enhances macrophage apoptosis. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 160, no. 4, pp. 1886-1893.

8. Wang J., Charboneau R., Barke R.A., Loh H.H., Roy S. Mu-opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 7, pp. 3630-3636.
9. Yin D., Mufson R.A., Wang R., Shi Y. Fas-mediated cell death promoted by opioids. *Nature*, 1999, Vol. 397, no. 6716, 218. doi: 10.1038/16612.
10. Yin D., Woodruff M., Zhang Y., Whaley S., Miao J., Ferslew K., Zhao J., Stuart C. Morphine promotes Jurkat cell apoptosis through pro-apoptotic FADD/P53 and anti-apoptotic PI3K/Akt/NF-kappaB pathways. *J. Neuroimmunol.*, 2006, Vol. 174, no. 1-2, pp. 101-107.

---

**Авторы:**

**Южанинова С.В.** — к.м.н., научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

**Гилёва С.Г.** — к.м.н., инженер лаборатории биохимии развития микроорганизмов ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

**Authors:**

**Yuzhaninova S.V.**, PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Biochemistry of the Development of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Gileva S.G.**, PhD (Medicine), Engineer, Laboratory of Biochemistry of the Development of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

---

Поступила 08.06.2020  
Отправлена на доработку 12.07.2020  
Принята к печати 01.08.2020

---

Received 08.06.2020  
Revision received 12.07.2020  
Accepted 01.08.2020

## **АНАЛИЗ Т- И В-КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ**

**Батурина И.Л., Логинова Ю.В., Емельянов И.В., Никушкина К.В.,  
Зотова М.А., Никонова Т.И.**

*ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения  
РФ, г. Челябинск, Россия*

**Резюме.** Невынашивание беременности по определению ВОЗ (Всемирная Организация Здравоохранения) — это наличие в анамнезе у женщины 2 и более беременностей, закончившихся спонтанным выкидышем на сроках от зачатия до 22 недель беременности. Привычное невынашивание беременности (ПНБ) является одной из актуальных проблем бесплодных браков и составляет от 5 до 20% в структуре невынашивания беременности. 80% от всех идиопатических случаев ПНБ связано с иммунологическими нарушениями. В настоящее время, многие исследователи уделяют большое внимание изучению влияния Т- и В-клеток разного уровня дифференцировки в формировании иммунологического ответа на аллогенный трансплантат и формирование иммунологической толерантности. Однако интерес представляет тот факт, что гормон беременности ХГ (хорионический гонадотропин) обладает выраженным иммуносупрессивным действием, за счет регуляции функциональной активности Т-регуляторных лимфоцитов. Доказано, что ХГ способствует повышению Treg на периферии и привлечению этих клеток в зону имплантации эмбриона, формируя, таким образом, иммунологическую толерантность во время беременности. Однако нет данных о влиянии ХГ на Т и В-клетки разного уровня дифференцировки при ПНБ. Проведен корреляционный анализ между Т- и В-клетками разного уровня дифференцировки и уровнем ХГ у женщин с ПНБ. Установлена зависимость низкого уровня ХГ со снижением наивных Т- и В-клеток при одномоментном повышении эффекторных клеток памяти CD8<sup>+</sup> (Тem), что может являться плохим прогностическим признаком особенно на ранних сроках беременности.

*Ключевые слова:* хорионический гонадотропин, В-клетки, невынашивание беременности, проточная цитометрия

### **Адрес для переписки:**

*Батурина Ирина Леонидовна  
Научно-исследовательский институт иммунологии  
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный  
медицинский университет»  
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64а.  
Тел.: 8 (904) 977-36-01.  
E-mail: irisha\_baturina@mail.ru*

### **Address for correspondence:**

*Baturina Irina L.  
Research Institute of Immunology, South Ural Medical State  
University  
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64a.  
Phone: 7 (904) 977-36-01.  
E-mail: irisha\_baturina@mail.ru*

### **Образец цитирования:**

*И.Л. Батурина, Ю.В. Логинова, И.В. Емельянов,  
К.В. Никушкина, М.А. Зотова, Т.И. Никонова «Анализ  
Т- и В-клеток различного уровня дифференцировки  
и их прогностическая роль при невынашивании  
беременности» // Российский иммунологический  
журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 181-186.  
doi: 10.46235/1028-7221-395-ETA  
© Батурина И.Л. и соавт., 2020*

### **For citation:**

*I.L. Baturina, Yu.V. Loginova, K.V. Nikushkina,  
I.V. Emelyanov, M.A. Zotova, T.I. Nikonova “Evaluating T  
and B cell lineage differentiation stage and related prognostic  
impact in miscarriage”, Russian Journal of Immunology/  
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2,  
pp. 181-186.  
doi: 10.46235/1028-7221-395-ETA  
DOI: 10.46235/1028-7221-395-ETA*

## EVALUATING T AND B CELL LINEAGE DIFFERENTIATION STAGE AND RELATED PROGNOSTIC IMPACT IN MISCARRIAGE

Baturina I.L., Loginova Yu.V., Nikushkina K.V., Emelyanov I.V., Zotova M.A., Nikonova T.I.

South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Abstract.** The WHO (World Health Organization) defines miscarriage as two or more pregnancies documented in woman medical history ended up with spontaneous miscarriage at stage of up to 22 weeks of pregnancy from conception. Habitual miscarriage of pregnancy (HMP) is one of high priority problems for infertile marriages comprising 5-20% among other causes of miscarriage. As many as 80% of all idiopathic HMP cases are associated with immune-related disorders. Currently, many researchers have been paying more attention to examining effects of T and B cells at varying differentiation stage in developing immune response against allogenic graft and formation immunological tolerance. However, it is worth noting that pregnancy-associated human hormone chorionic gonadotropin (HCG) exhibits a marked immunosuppressive effect by regulating regulatory T (Treg) cell functional activity. It has been proven that HCG contributes to increasing Tregs level in periphery and recruiting them to the embryo implantation zone, thus establishing immunological tolerance during pregnancy. However, no data regarding HCG effects on T and B cells at various differentiation stage were obtained during HMP. A correlation analysis between frequency of T and B cells at various differentiation stage and level of serum HCG in women with HMP was performed. It was found that low level HCG was associated with decreased naive T and B cell frequency paralleled with elevated percentage of effector memory CD8<sup>+</sup> (Tem) that may serve as a poor prognostic sign especially in early stage of pregnancy.

*Keywords:* chorionic gonadotropin, T cells, B cells, miscarriage, flow cytometry

### Введение

Невынашивание беременности по ВОЗ – это наличие в анамнезе у женщины 2 и более беременностей, закончившихся спонтанным выкидышем на сроках от зачатия до 22 недель беременности. В настоящее время принята классификация привычного выкидыша (ПВ) в зависимости от срока прерывания беременности: до 12 недель – ранние ПВ; 12-22 недели – поздние ПВ; с 28 недели – преждевременные роды [1].

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) – это полиэтиологическая патология. При спорадическом выкидыше действие повреждающих факторов имеет проходящий характер и не наносит вреда репродуктивному здоровью женщины [1, 2]. К таким, например, можно отнести агрессивную антибиотикотерапию, которая может привести к нарушению формирования гамет и формированию генетически неполноценного нежизнеспособного плода, и как следствие к прерыванию беременности. Однако, в 1-5% женщин, у которых первая беременность закончилась спонтанным прерыванием, находят эндогенные причины, препятствующие нормальному развитию эмбриона. Это впоследствии приводит к повторным прерываниям беременности и фор-

мированию симптомокомплекса привычного выкидыша (ПВ). Установлено, что привычный выкидыш составляет от 5 до 20% в общей структуре ПНБ. Риск развития последующего выкидыша после первого составляет 13-17%, после 2 предшествующих прерываний – 36-38%, а вероятность 3-го – возрастает до 45%. Учитывая это, многие специалисты по ПНБ, относят семейные пары, имеющие в анамнезе 2 последовательных выкидыша к категории ПВ с последующим обязательным обследованием в перинатальных центрах.

Среди всех установленных причин ПНБ выделяют также идиопатические, когда генез заболевания остается не уточненным. Установлено, что в 80% случаев идиопатического ПНБ причиной являются нераспознанные иммунологические нарушения.

Большинство исследований последних лет направлено на изучение влияния Т- и В-клеток разного уровня дифференцировки в формировании иммунологического ответа на аллогенный трансплантат и формирование иммунологической толерантности. С наступлением беременности и имплантации, для сохранения эмбриона, в организме женщины начинается перестройка нейроиммунноэндокринной регуляции, в пер-

вую очередь влияющая на функциональную активность факторов врожденного иммунитета (нейтрофилов, макрофагов, их цитокиновой регуляции, хемокинов, NK-клеток), а во вторую – факторов специфического иммунитета (Т- и В-лимфоцитов различного уровня дифференцировки и антител), обеспечивая так называемую – иммунологическую толерантность [3, 4, 5]. Примечательно, что в ранний гравидарный период эндометрий активно инфильтрируют В-клетки, которые вырабатывают АPLA-антитела против отцовских HLA-антигенов, именно эти антитела защищают плод от материнских NK-клеток, способствующих отторжению плода [3]. Установлено, что гормон беременности ХГ (хорионический гонадотропин) обладает выраженным иммуносупрессивным действием, за счет регуляции функциональной активности Т-регуляторных лимфоцитов. Доказано, что ХГ способствует повышению Treg на периферии и привлечению этих клеток в зону имплантации эмбриона, формируя, таким образом, иммунологическую толерантность во время беременности [6]. Однако нет данных о влиянии ХГ на Т- и В-клетки разного уровня дифференцировки при ПНБ.

В исследованиях, проведенных ранее в Челябинском НИИ иммунологии было установлено, что при ПНБ происходит увеличение количества активированных наивных В-клеток и уменьшение первичных наивных В-клеток, при одновременном повышении наивных Т-клеток (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) и эффекторных клеток памяти CD8<sup>+</sup> цитотоксических лимфоцитов (ТЕМ) [4, 5]. С одной стороны, это может свидетельствовать об активном участии активированных наивных В-клеток в выработке АТ против плода, а с другой стороны, повышение ТЕМ CD8<sup>+</sup> цитотоксических лимфоцитов, которые мигрируют в место имплантации эмбриона, могут способствовать его гибели за счет прямого цитолитического действия этих клеток. Однако какова взаимосвязь данных показателей и их влияние на прогноз течения имплантационного процесса до сих пор до конца не изучено.

**Цель** – установление взаимосвязи уровня хорионического гонадотропина (ХГ) и Т- и В-клеток разного уровня дифференцировки периферической крови у пациенток с привычным невынашиванием беременности (ПНБ).

## Материалы и методы

В иммунологической лаборатории Медицинского университета г. Челябинска в 2015–2019 гг. было проведено исследование 50 образцов венозной крови у женщин в возрасте от 20 до 36 лет. Все пациентки были разделены на две группы: А – контроль (условно здоровые женщины, n = 20);

В – женщины с верифицированным диагнозом ПНБ, (n = 30). Исследование субпопуляционного состава Т- и В-лимфоцитов проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре Navios™ производства Beckman Coulter (BC), США. Окраску образцов проводили в соответствии с рекомендациями производителя, указанными в инструкции к реактивам.

Для анализа дифференцировки В-лимфоцитов по основным субпопуляциям использовали АТ CD-38 – PE; Anti-Human IgD-FITC (Beckman Coulter, США) выделяли «первичные наивные клетки» с фенотипом IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> (Vm1) и «активированные наивные клетки» с фенотипом IgD<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (Vm2), центробласты и центроциты – IgD<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> (Vm3+Vm4), ранние покоящиеся В-клетки памяти – IgD<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> (Vm5). Дифференцировку Т-клеток изучали согласно установленной классификации, все лимфоциты были разделены на 4 субпопуляции: 1- наивные Т-клетки (Tn); 2 – центральные клетки памяти (Tcm), 3 – эффекторные клетки памяти (Tem); 4 – периферические клетки памяти (Temra) в популяциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в периферической крови женщин [7].

Для проведения корреляционного анализа из группы женщин с ПНБ были выбраны 10 пациенток, у которых ретроспективно был известен уровень ХГ. Анализ проводился в одной лаборатории, методом ИФА, с использованием тест-системы АЛКОР БИО, производства Санкт-Петербург, Россия. Срок прерывания беременности у всех выбранных пациенток был на 4–5 неделе.

Полученные результаты были статистически обработаны с помощью программы Statistica 8.0.

## Результаты и обсуждение

Анализ дифференцировки В-клеток показал, что достоверные отличия субпопуляций В-лимфоцитов отмечались только по Vm1- и Vm2-клеткам по сравнению с группой А (контроль). В группе – В (с ПНБ) наблюдалось увеличение количества активированных наивных В-лф (Vm2) и уменьшение первичных наивных В-лф Vm1 по сравнению с группой А (контроль) (табл. 1).

Установлено, что красный костный мозг подают клетки с фенотипом IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> (Vm1) – “virgin naive” В-лимфоциты, а после активации антигеном иницируется антигензависимая стадия развития В-клеток, которая проходит в В-зависимых зонах периферических лимфатических узлов и такие клетки называются активированные наивные клетки с фенотипом IgD<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (Vm2). Возможно, что повышенное количество Vm2-клеток способствует отторжению аллоген-

**ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОК С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ, М±m**

TABLE 1. SUBPOPULATION COMPOSITION OF T AND B LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH HABITUAL MISCARRIAGE, M±m

Показатели Indicators	Группы Groups	
	Контроль (А) Control (A)	Пациентки с невынашиванием беременности (В) Patients with miscarriage (B)
IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л (Вm1) IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л (Bm1)	291,4±30,5	151,0±19,9 p <sub>A-B</sub> = 0,03*
IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л (Вm2) IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л (Bm2)	869,8±20,5	974,4±31,4 p <sub>A-B</sub> = 0,03*
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л (Тn) CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> , × 10 <sup>9</sup> /л (Tn)	917,0±27,5	947,6±26,0 p <sub>A-B</sub> = 0,03*
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> × 10 <sup>9</sup> /л (Тn) CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> × 10 <sup>9</sup> /л (Tn)	821,8±24,8	898,1±36,8 p <sub>A-B</sub> = 0,05*
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup> × 10 <sup>9</sup> /л (Тem) CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup> × 10 <sup>9</sup> /л (Tem)	398,1±34,2	508,1±24,2 p <sub>A-B</sub> = 0,0012*

Примечание. В таблице приведены только те показатели, которые достоверно изменились. p ≤ 0,05 – достоверные различия; p<sub>A-B</sub> – различия между исследуемыми показателями подгруппы В от подгруппы А.

Note. The Table shows only those indicators that have significantly changed. p ≤ 0.05, significant differences; p<sub>A-B</sub>, differences between the studied indicators of subgroup B from subgroup A.

**ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ХГ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ НА СРОКЕ ПРЕРЫВАНИЯ 4-5 НЕДЕЛЬ, М±m (n = 10)**

TABLE 2. HG LEVEL IN WOMEN WITH HABITUAL MISCARRIAGE ON TERMINATION OF 4-5 WEEKS, M±m (n = 10)

Показатель Indicator	Нормы указанные в тест-системе для 4-5 недель беременности (МЕ/л) Norms indicated in the test system for 4-5 weeks of pregnancy (ME/l)	Пациентки с ПНБ (МЕ/л) Patient with habitual miscarriage (ME/l)
Хорионический гонадотропин (ХГ) Chorionic gonadotropin (HG)	10 000-30 000	8500±600

ного трансплонтата путем образования специфических АТ.

Изучение дифференцировки Т-клеток показало повышение наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов (Тn) при одновременном повышении эффекторных CD8<sup>+</sup> лимфоцитов (Тem) по сравнению с группой контроля.

Учитывая вышеизложенное, мы решили провести корреляционный анализ взаимосвязей достоверно измененных показателей. Была установлена обратная зависимость между повышением активированных наивных В-клеток

(Вm2) (r = -0,79 при p = 0,03) и снижением наивных В-клеток (Вm1) А также прямая корреляционная связь между повышением наивных CD8<sup>+</sup> лимфоцитов (Тn) при одновременном повышении эффекторных CD8<sup>+</sup> лимфоцитов (Тem) (r = 0,82 при p = 0,0012).

Далее мы провели анализ взаимосвязей между низким уровнем ХГ (табл. 2) и установленными ранее показателями.

Была установлена прямая отрицательная взаимосвязь между низким уровнем ХГ и снижением наивных В-клеток (Вm1) (r = 0,69) и выраженная

обратная зависимость между уровнем ХГ и эффекторными CD8<sup>+</sup> лимфоцитов (Tem) ( $r = 0,95$ ).

## Выводы

Учитывая вышеизложенное, мы предположили, что ХГ взаимосвязан с механизмами, формирующими иммунологическую толерантность матери к аллогенному эмбриону не только за счет привлечения Т-регуляторных клеток, которые угнетают иммунологическую реактивность, но и за счет Т- и В-клеток разного уровня дифференцировки. Доказано, что во время течения нормальной беременности наблюдается увеличение

пула наивных клеток в популяции Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов на фоне снижения эффекторных (Tem) и периферических клеток памяти (Temra) [1, 2]. Однако при ПНБ происходит снижение наивных Т- и В-клеток при одновременном повышении эффекторных клеток памяти (Tem), что в совокупности с низким уровнем ХГ может быть плохим прогностическим фактором для течения беременности. Полученные данные требуют дальнейшего изучения для более глубокого понимания иммунорегуляторных механизмов ПНБ и разработки прогностических критериев течения беременности, особенно на ранних сроках.

## Список литературы / References

1. Заморина С.А., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храпцов П.В., Раев М.Б. Роль хорионического гонадотропина и его пептидных фрагментов в регуляции экспрессии IDO моноцитами человека // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 306-310. [Zamorina S.A., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khrantsov P.V., Raev M.B. The role of chorionic gonadotropin and its peptide fragments in the regulation of IDO expression by human monocytes. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12 (21), no. 3, pp. 306-310. (In Russ.)]
2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. 2-е изд., доп. и расшир. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014. 576 с. [Zurochka A.V., Khaydukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in medicine and biology. 2<sup>nd</sup> edition. Ekaterinburg: URO RAS, 2014. 576 p.]
3. Кудряшова А.В. Дифференцировка CD8<sup>+</sup> клеток памяти при беременности // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 1. С. 79-82. [Kudryashova A.V. Differentiation of CD8<sup>+</sup> memory cells during pregnancy. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 1, pp. 79-82. (In Russ.)]
4. Лупояд В.С., Бородай И.С., Аралов О.Н., Щербина И.Н. Привычное невынашивание беременности: современный взгляд на старую проблему // Международный медицинский журнал, 2011. № 4. С. 54-60. [Lupoyad V.S., Boroday I.S., Aralov O.N., Shcherbina I.N. Habitual miscarriage: a modern look at the old problem. *Mezhdunarodnyu meditsinskiy zhurnal = International Medical Journal*, 2011, Vol. 4, pp. 54-60. (In Russ.)]
5. Okada R., Kondo T., Matsuki F., Takata H., Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD4<sup>+</sup>T cell subsets and their differentiation. *Int. Immunol.*, 2008, Vol. 20, pp. 1189-1199.
6. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Ann. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 745-763.
7. van der Zee M., Dik W.A., Kap Y.S., Dillon M.J. Synthetic human chorionic gonadotropin-related oligopeptides impair early innate immune responses to *Lysteria monocytogenesis* in mice. *J. Infect. Dis.*, 2010, Vol. 201, no. 7, pp. 1072-1080.

---

### Авторы:

**Батурина И.Л.** — к.м.н., старший научный сотрудник Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Логина Ю.В.** — младший научный сотрудник Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Никושкина К.В.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

### Authors:

**Baturina I.L.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Loginova Yu.V.**, Junior Research Associate, Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Nikushkina K.V.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Емельянов И.В.** — старший лаборант Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Зотова М.А.** — научный сотрудник Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Никонова Т.И.** — старший лаборант Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Emelyanov I.V.**, Senior Laboratory Assistant, Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Zotova M.A.**, Research Associate, Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Nikonova T.I.**, Senior Laboratory Assistant, Research Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

---

Поступила 03.07.2020  
Принята к печати 12.07.2020

Received 03.07.2020  
Accepted 12.07.2020

## МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТДЕЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА С ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Бедулева Л.В., Сидоров А.Ю., Абишева Н.Н., Гильманова Л.У., Горбушина А.Н.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

**Резюме.** Регуляторный ревматоидный фактор (регРФ) представляет собой отдельную популяцию ревматоидного фактора, имеющую потенциал использования в клинической диагностике, а лимфоциты, его продуцирующие, — перспективная терапевтическая биомишень при аутоиммунных заболеваниях. Поэтому важно знать условия его надежного выявления у человека и лабораторных животных. Для выявления регуляторного ревматоидного фактора был использован метод агглютинации таннизированных IgG-нагруженных эритроцитов, так как данный метод выявляет только регуляторный ревматоидный фактор, в отличие от метода латекс фиксации, который выявляет и регуляторный ревматоидный фактор и классический ревматоидный фактор, ассоциированный с ревматическими заболеваниями. Обнаружено, что для определения уровня регРФ у крыс следует использовать свежую или замороженную сыворотку. В свежеполученной плазме крови крыс, стабилизированной гепарином, цитратом натрия или ЭДТА, регРФ не выявляется, что возможно связано с присутствием фибриногена, имеющего, как известно, сродство к IgG. Гепарин также самостоятельно затрудняет выявление регРФ у крыс. У человека регРФ надежно выявляется в плазме крови, стабилизированной цитратом натрия, предварительно замороженной. При использовании сыворотки крови для выявления регРФ у человека в небольшом количестве случаев были получены ложно-отрицательные результаты.

**Ключевые слова:** факторы иммунорегуляции, ревматоидный фактор, Fc-фрагменты IgG, плазма

## DETECTION OF IMMUNOREGULATORY RHEUMATOID FACTOR

Beduleva L.M., Sidorov A.Yu., Abisheva N.N., Gilmanova L.U., Gorbushina A.N.

Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

**Abstract.** Regulatory rheumatoid factor (regRF) represents a separate rheumatoid factor population that might be potentially used for clinical diagnostics, whereas regRF-producing lymphocytes serve as a promising therapeutic target for autoimmune diseases. Hence, it is worth outlining conditions allowing to reliably detect regRF in humans and laboratory animals. The method of agglutination with tanned IgG-loaded red blood cells was used to measure level of regulatory rheumatoid factor, because it allows to identify solely regRF as compared to the latex fixation method detecting both the regulatory rheumatoid factor as well as the rheumatoid factor associated with rheumatic diseases. It was found that fresh or frozen serum should be used to detect regRF in rats. Freshly purified rat blood

### Адрес для переписки:

Бедулева Любовь Викторовна  
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»  
426034, Россия, Удмуртская Республика, г. Ижевск,  
ул. Университетская, 1.  
Тел.: 8 (3412) 91-64-26.  
E-mail: blv76@mail.ru

### Address for correspondence:

Beduleva Lyubov V.  
Udmurt State University  
426034, Russian Federation, Udmurt Republic, Izhevsk,  
Universitetskaya str., 1.  
Phone: 7 (3412) 91-64-26.  
E-mail: blv76@mail.ru

### Образец цитирования:

Л.В. Бедулева, А.Ю. Сидоров, Н.Н. Абишева,  
Л.У. Гильманова, А.Н. Горбушина «Метод определения  
отдельной популяции ревматоидного фактора  
с иммунорегуляторными свойствами» // Российский  
иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 187-190.  
doi: 10.46235/1028-7221-267-DOI

© Бедулева Л.В. и соавт., 2020

### For citation:

L.M. Beduleva, A.Yu. Sidorov, N.N. Abisheva,  
L.U. Gilmanova, A.N. Gorbushina "Detection  
of immunoregulatory rheumatoid factor", Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020,  
Vol. 23, no. 2, pp. 187-190.  
doi: 10.46235/1028-7221-267-DOI

DOI: 10.46235/1028-7221-267-DOI

plasma stabilized with heparin, sodium citrate or EDTA did not allow to detect regRF, potentially being linked to the presence of fibrinogen known to demonstrate IgG binding activity. In addition, heparin itself also complicates regRF detection in rats. In humans, regRF was reliably detected in pre-frozen plasma stabilized with sodium citrate. Finally, false-negative results were obtained in a small number of cases while using blood serum for detecting regRF in humans.

*Keywords: immunologic factors, rheumatoid factor, immunoglobulin Fc fragments, plasma*

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования (номер проекта 0827-2020-0012, государственное задание номер 075-00232-20-01).

## Введение

Ревматоидный фактор, первоначально определенный как патологические аутоантитела к IgG, выявляемые при ревматоидном артрите, оказался мультиспецифичными антителами, некоторые из которых демонстрируют иммунорегуляторные свойства [3, 4, 5]. Недавно нами было показано, что ревматоидный фактор, выявляемый методом агглютинации танализированных IgG-нагруженных эритроцитов, является фактором негативной регуляции аутореактивности. Об этом свидетельствуют наличие ассоциации между продукцией данного ревматоидного фактора и устойчивостью к развитию экспериментально-вызванных аутоиммунных заболеваний и их ремиссией [1], а также редукция симптомов коллаген-индуцированного артрита крыс в ответ на иммунизацию конформерами Fc-фрагментов, несущих эпитопы распознаваемые ревматоидным фактором, выявляемым методом агглютинации танализированных IgG нагруженных эритроцитов [6]. Сравнение специфичности ревматоидного фактора, выявляемого методом агглютинации танализированных IgG нагруженных эритроцитов со специфичностью ревматоидного фактора, выявляемого методом латекс фиксации и ассоциированного с аутоиммунными патологиями, показало, что ревматоидный фактор, выявляемый методом агглютинации танализированных IgG нагруженных эритроцитов, представляет собой отдельную популяцию ревматоидного фактора. Данная популяция ревматоидного фактора получила название регуляторный ревматоидный фактор (регРФ) [6, 7]. Исследование специфичности регуляторного ревматоидного фактора показало, что он представляет собой поликлональные антитела с двойной специфичностью. Индивидуальный паратоп регРФ специфичен к идиотипам антител, и уникален для каждой молекулы регуляторного ревматоидного фактора [1]. Общий паратоп регРФ специфичен к неэпитопам конформеров Fc-фрагментов IgG [6, 7], и не связывается с нативным или измененным IgG, к которому специфичен ревматоидный фактор, выявляемый при ревматических заболеваниях методом латекс фиксации. Механизм действия регРФ заключается в сдерживании экспансии активированных CD4 Т-лимфоцитов, которые он убивает посредством комплемент-зависимого лизиса [8]. Так как регРФ-продуцирующие лимфоциты имеют перспективу использования

в качестве биоматериала для подавления патологических аутоиммунных реакций, а регРФ может иметь самостоятельное, отличное от патологического ревматоидного фактора, выявляемого методом латекс фиксации, клинико-диагностическое значение при аутоиммунных заболеваниях, то важно не допускать ошибок при определении уровня регРФ как у людей в ходе клинических лабораторных исследований, так и лабораторных животных в ходе экспериментальных исследований. Поэтому **целью исследования** было выяснить условия надежного выявления регРФ в крови.

## Материалы и методы

Исследование уровня регРФ было проведено в крови интактных крыс ( $n = 20$ ), здоровых людей ( $n = 13$ ) и карантинизированной в течение 6 месяцев плазме крови человека ( $n = 5$ ). Периферическая кровь крыс была разделена на несколько порций, в которые добавляли один из антикоагулянтов, используемых при рутинных лабораторных анализах крови (ЭДТА, цитрат натрия, гепарин), одна из порций служила для получения сыворотки. К образцам сыворотки также были добавлены антикоагулянты в тех же количествах, что и для получения плазмы крови. Образцы плазмы и сыворотки крови подвергали также замораживанию. Из крови человека получали плазму, стабилизированную цитратом натрия, или сыворотку, которые были немедленно заморожены и использованы для анализа в течение следующих 2 недель. Уровень регРФ в плазме или сыворотке крови определяли методом агглютинации танализированных IgG-нагруженных эритроцитов. Для этого эритроциты человека группы 0, полученные с Республиканской станции переливания крови, фиксировали глутаровым альдегидом, танализировали, нагружали IgG человека, либо крысы. Нагруженные эритроциты отмывали бычьим сывороточным альбумином, затем полученную 1,5% суспензию эритроцитов в объеме 50 мкл смешивали с 50 мкл сыворотки или плазмы крови предварительно раститрованными с шагом 2. Реакцию агглютинации учитывали через 3 часа. Для получения доказательств, что выявляемые антитела представляют собой регРФ, исследовали влияние на его связывание следующих антигенов: нативного гомологичного IgG, полученного шадящим методом осаждения сульфатом аммония и последующей эксклюзионной хроматографией, лиофилизированного препарата гомологичного IgG (Equitech-Био, США) и модифицированных Fc-фрагментов гомологичного IgG, несущих свободные SH группы в шарнирной области.

## Результаты

Сравнительный анализ уровня регРФ в свежих, не подвергавшихся замораживанию сыворотках и свежих образцах плазмы крови крыс, полученных с использованием антикоагулянтов показал, что регРФ выявляется в свежей сыворотке крови крыс (его титр варьировал в диапазоне от 1:8 до 1:64) и почти не обнаруживается в свежей плазме крови крыс, полученной с добавлением к крови цитрата натрия, либо ЭДТА, либо гепарина (табл. 1).

Чтобы выяснить, антикоагулянт или белки плазмы крови, подвергающиеся изменению в ходе процесса свертывания крови, препятствуют выявлению регРФ в плазме крови, определение его уровня было проведено также в сыворотках крови, в которые были добавлены антикоагулянты. В таблице 1 показано, что уровень регРФ в интактной сыворотке и в сыворотке с добавлением цитрата натрия или ЭДТА не отличается. Уровень регРФ в сыворотке, содержащей гепарин в три раз ниже чем в интактной сыворотке. Следовательно, гепарин добавленный в сыворотку крови крыс препятствует выявлению регуляторного ревматоидного фактора. Таким образом, белки плазмы крови, которые модифицируются при свертывании крови, мешают выявлению регуляторного ревматоидного фактора в свежей плазме крови крыс. Гепарин является самостоятельным фактором, препятствующим выявлению регуляторного ревматоидного фактора в крови крыс. Свежая плазма крови крыс не подходит для определения в ней регуляторного ревматоидно-

го фактора. Регуляторный ревматоидный фактор был также исследован в сыворотках и плазме крови крыс, подвергнутых замораживанию при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 7 дней. В сыворотке крови уровень регРФ в ходе хранения не изменился. Замораживание увеличило количество выявляемого регРФ в плазме, полученной с использованием цитрата натрия или ЭДТА, однако его уровни не достигли тех, что были выявлены в сыворотке крови (табл. 1). В плазме крови крыс, полученной с добавлением гепарина, регРФ после замораживания не определяется, также как и в свежей гепаринизированной плазме. Таким образом, замораживание плазмы, стабилизированной цитратом натрия или ЭДТА, способствует выявлению регРФ, но уровень остается ниже того, что выявляется в сыворотке. Voehtn было показано, что фибриноген способен связывать с иммобилизованным IgG [2], поэтому можно предположить что в плазме крови связыванию регРФ с танизированными нагруженными IgG эритроцитами, а следовательно выявлению регРФ может мешать фибриноген, который связываясь с IgG иммобилизованным на эритроцитах может экранировать эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором. Замораживание плазмы может приводить к разрушению фибриногена и способствовать выявлению регРФ.

Сравнительный анализ уровня регРФ в сыворотке крови и плазме крови здоровых людей, полученной с использованием цитрата натрия, подвергнутых замораживанию, показал, что регРФ выявляется как в сыворотке, так и цитратной плазме, а также и карантинизированной плазме.

**ТАБЛИЦА 1. РЕГУЛЯТОРНЫЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ИНТАКТНЫХ КРЫС И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ**

TABLE 1. REGULATORY RHEUMATOID FACTOR IN SERUM AND PLASMA OF INTACT RATS AND HEALTHY PEOPLE

	Сыворотка крови крыс Rat serum	Плазма крови крыс Rat plasma			Сыворотка крови крыс Rat serum		
		Гепарин Heparin	Цитрат натрия Sodium citrate	ЭДТА EDTA	Гепарин Heparin	Цитрат натрия Sodium citrate	ЭДТА EDTA
<b>Свежая</b> (среднее $\pm$ SD) Fresh (mean $\pm$ SD)	32,8 $\pm$ 19,7	1,4 $\pm$ 2,5	1,5 $\pm$ 1,3	5,2 $\pm$ 4,5	10,4 $\pm$ 20,6	31,0 $\pm$ 25,7	38,6 $\pm$ 25,7
<b>Замороженная</b> при $-20^{\circ}\text{C}$ , 7 дней (среднее $\pm$ SD) Frozen at $-20^{\circ}\text{C}$ , 7 days (mean $\pm$ SD)	37,3 $\pm$ 21,1	2,0 $\pm$ 4,9	16,4 $\pm$ 14,1	16,2 $\pm$ 7,1			
	<b>Сыворотка крови человека</b> Human serum	<b>Плазма крови здоровых людей, стабилизированная цитратом натрия</b> Plasma of healthy people, stabilized with sodium citrate			<b>Карантинизированная плазма крови человека</b> Quarantined human blood plasma		
<b>(среднее <math>\pm</math> SD)</b> (mean $\pm$ SD)	92,7 $\pm$ 143,7	103,3 $\pm$ 138,2			70,4 $\pm$ 35,0		

Однако в нескольких образцах сыворотки регРФ не определялся не смотря на то, что в плазме крови, полученной от тех же людей, обнаруживался. Поэтому у людей, для избегания ложно отрицательных результатов, выявление регРФ желательнее проводить не в сыворотке, а в плазме крови стабилизированной цитратом натрия.

Чтобы убедиться, что в плазме и сыворотках крови человека и сыворотках крыс был выявлен регРФ, а не другие антитела, был проведен анализ подавления реакции агглютинации гомологичными конформерами Fc-фрагментов IgG, нативным и лиофилизированным IgG. Выявлено, что конформеры Fc-фрагментов IgG подавляют, а нативный и лиофилизированный

IgG не влияют на связывание сыворотки или плазмы крови с танализованными IgG-нагруженными эритроцитами. Следовательно, выявляемые в реакции агглютинации танализованных IgG-нагруженных эритроцитов антитела как у крыс, так и человека являются регуляторным ревматоидным фактором.

## Заключение

Для выявления регуляторного ревматоидного фактора в крови крыс следует использовать свежую или замороженную при  $-20^{\circ}\text{C}$  сыворотку крови. У людей выявление регРФ желательнее проводить в прошедшей замораживании плазме крови, стабилизированной цитратом натрия.

## Список литературы / References

1. Beduleva L., Menshikov I., Stolyarova E., Fomina K., Lobanova O., Ivanov P. Terentiev A. Rheumatoid factor in idiotypic regulation of autoimmunity. *Int. J. Rheum. Dis.*, 2015, Vol. 18, pp. 408-420.
2. Boehm T.K., DeNardin E. Fibrinogen binds IgG antibody and enhances IgG-mediated phagocytosis. *Hum. Antibodies*, 2008, Vol. 17, no. 3-4, pp. 45-56.
3. Fong S., Chen P.P., Crowley J.J., Silverman G.J., Carson D.A. Idiotypes and the structural diversity of human rheumatoid factors. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1988, Vol. 10, pp. 189-201.
4. Mageed R.A., Moyes S.P., Thompson K.M., Natvig J.B. Molecular and cellular aspects of human rheumatoid factor production and idiotypes. In: Shoenfeld Y., Kennedy R.C., Ferrone S. (ed) *Idiotypes in Medicine: Autoimmunity, Infection and Cancer*. Elsevier, 1997, pp. 135-155.
5. Monestier M., Bellon B., Manheimer A.J., Bona C.A. Rheumatoid factors. Immunochemical, molecular, and regulatory properties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1986, Vol. 475, pp. 106-113.
6. Sidorov A., Beduleva L., Menshikov I., Terentiev A., Stolyarova E., Abisheva N. Fc fragments of immunoglobulin G are an inducer of regulatory rheumatoid factor and a promising therapeutic agent for rheumatic diseases. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, Vol. 95, pp. 938-945.
7. Sidorov A., Beduleva L., Menshikov I., Terentiev A., Cherepanov I. Physicochemical characteristics of human IgG Fc fragments that expose regulatory rheumatoid factor neoepitopes and may show promise as antirheumatic agents. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2019, Vol. 67, no. 2, pp. 287-293.
8. Stolyarova E., Beduleva L., Menshikov I., Snigiryev A., Khramova T. Mechanism by which regulatory rheumatoid factor prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, 2018, Vol. 18, pp. 596-601.

### Авторы:

**Бедулева Л.В.** — д.б.н., заведующая лабораторией молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

**Сидоров А.Ю.** — научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

**Абишева Н.Н.** — научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

**Гильманова Л.У.** — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

**Горбушина А.Н.** — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

### Authors:

**Beduleva L.V.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

**Sidorov A. Yu.**, Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

**Abisheva N.N.**, Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

**Gilmanova L.U.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

**Gorbushina A.N.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

## АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *IL6* У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ С РАЗНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ

Беляева С.В.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

**Резюме.** Во всем мире туберкулез продолжает оставаться одной из самых главных проблем здравоохранения. Согласно многочисленным литературным данным, это генетически детерминированное заболевание, и полиморфизм генов является механизмом, который приводит к прогрессированию от инфицирования к клинической манифестации. В настоящее время широко исследуется ассоциация туберкулеза с полиморфизмом гена *IL6* в позиции -174, который отвечает за низкую продукцию цитокина. Ранее нами была оценена ассоциация аллелей и генотипов гена данного цитокина с предрасположенностью/устойчивостью к туберкулезу у русских Челябинской области. В данном исследовании мы провели сравнение распределения аллелей и генотипов гена *IL6* у больных с разной степенью поражения легких: инфильтративной, очаговой и фиброзно-кавернозной формами туберкулеза. Были использованы следующие методы: выделение образцов ДНК из цельной крови, проведение генотипирования исследуемых полиморфизмов генов с помощью полимеразно-цепной реакции и электрофорез в агарозном геле. Мы установили, что для больных с очаговой формой характерна высокая частота встречаемости генотипа *IL6(-174)\*C/C*, связанного с низкой продукцией цитокина, в то время как для больных с тяжелой фиброзно-кавернозной – генотипа *IL6(-174)\*G/C*, отвечающего за средний уровень продукции.

*Ключевые слова:* туберкулез легких, цитокины, полиморфизм генов

## ANALYZING *IL6* GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH VARIOUS CLINICAL FORMS OF PULMONARY TUBERCULOSIS

Belyaeva S.V.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Abstract.** Throughout the world, tuberculosis still remains one of the most important public health problems. According to numerous publications, TB infection is considered as a genetically determined disease, and host genetical polymorphism underlies a mechanism resulting in disease progression from primary infection to clinical

---

**Адрес для переписки:**

Беляева Светлана Валерьевна  
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный  
университет»  
456658, Россия, г. Копейск, мкр Премьера, 22-36.  
Тел.: 8 (908) 052-18-66.  
E-mail: shshvetlana@yandex.ru

**Address for correspondence:**

Belyaeva Svetlana V.  
Chelyabinsk State University  
456658, Russian Federation, Kopeisk,  
Microdistrict Premiere, 22-36.  
Phone: 7 (908) 052-18-66.  
E-mail: shshvetlana@yandex.ru

---

**Образец цитирования:**

С.В. Беляева «Анализ полиморфизма гена *IL6* у  
больных туберкулезом легких с разными клиническими  
формами» // Российский иммунологический журнал,  
2020. Т. 23, № 2. С. 191-194.  
doi: 10.46235/1028-7221-388-AIG  
© Беляева С.В., и соавт., 2020

**For citation:**

S.V. Belyaeva "Analyzing *IL6* gene polymorphism in patients  
with various clinical forms of pulmonary tuberculosis", Russian  
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 191-194.  
doi: 10.46235/1028-7221-388-AIG  
DOI: 10.46235/1028-7221-388-AIG

manifestations. Currently, an association between TB infection and *IL6* gene polymorphism at position -174 responsible for low cytokine production has been extensively investigated. Previously, we evaluated the association between *IL6* gene alleles and genotypes and predisposition/resistance to tuberculosis in Russian descendants residing in the Chelyabinsk Region. Here, we conducted a comparative analysis for prevalence of *IL6* gene alleles and genotypes in patients differed in lung damage degree such as infiltrative, focal, and fibrous-cavernous forms of pulmonary tuberculosis by isolating whole blood DNA samples and subsequent genotyping of *IL6* gene polymorphisms with polymerase chain reaction and agarose gel electrophoresis. We found that patients with a focal TB form were characterized by prevalence of *IL6*(-174)\*C/C genotype associated with low cytokine production, whereas patients with severe fibrous-cavernous carried *IL6*(-174)\*G/C genotype accounting for moderated IL-6 production.

*Keywords: tuberculosis, cytokines, genetic polymorphism*

## Введение

Во всем мире туберкулез продолжает оставаться одной из самых главных проблем здравоохранения. Несмотря на постепенное снижение заболеваемости туберкулезом, ежегодно заболевают более 10 млн. человек и 1,7 млн. погибают от этой инфекции [2, 3]. Туберкулез – это хроническое воспалительное заболевание, вызываемое факультативным патогеном *Mycobacterium tuberculosis*, поражающим макрофаги, в результате взаимодействия с которыми вырабатывается широкий спектр цитокинов, которые, в свою очередь, характеризуют прогрессирование болезни и ее статус в определенный момент времени [8]. Известно, что при тяжелых формах туберкулеза легких наблюдается нарушение баланса цитокинов, что приводит к неспособности организма на полноценный запуск иммунного ответа [2, 4]. Одним из основных цитокинов, участвующих в противотуберкулезном ответе, является *IL6* [9]. Он секретируется клетками, экспрессирующими молекулы Toll-подобного рецептора 2, в ответ на присутствие *Mycobacterium tuberculosis* на ранних стадиях инфекции и участвует в противотуберкулезном иммунитете организма [5]. Известно, что микобактерии усиливают экспрессию *IL6*, и это приводит к повышенным воспалительным реакциям и усилению тяжести заболевания [4]. *IL6*, в отличие от других провоспалительных цитокинов, не так важен для антимикобактериальных эффекторных механизмов, отвечая за контроль роста микобактерий и формирование устойчивости к туберкулезу после инфицирования [5, 9]. Различные эффекты *IL6* связаны с концентрацией цитокина, определяемой полиморфизмами гена. В настоящее время широко исследуется полиморфизм гена *IL6* в позиции -174, который расположен на 7 хромосоме 7p21-p14 в промоторной части гена и отвечает за замену С (цитозина) на G (гуанина), что приводит к снижению продукции цитокина [5, 6]. Данный полиморфизм вовлечен в восприимчивость к туберкулезу во мно-

гих исследованиях в азиатских и латиноамериканских популяциях [5, 7, 9]. Исследование, проведенное в южной бразильской популяции, показало, что минорный аллель *IL6*(-174)\*С снижает риск развития туберкулеза [6].

**Цель** – оценить особенности частоты встречаемости полиморфизма гена *IL6* у больных туберкулезом легких с разными фенотипами заболевания.

## Материалы и методы

Выборка больных с туберкулезом легких состояла из 74 человек русской популяции Челябинской области, пациентов ГБУЗ «Челябинский областной клинический противотуберкулезный диспансер».

Выделение геномной ДНК из крови выполняли на колонках согласно инструкции производителя (Ахуген, США). Генотипирование SNPs в гене *IL6*(-174)\*G/C осуществляли методом ПЦР (реактивы ООО НПФ «Литех», Москва). Для детекции использовали электрофоретический метод в 3% агарозном геле.

Согласно Российской клинической классификации (Российская клиническая классификация, Приказ МЗ РФ от 21.03.2003 № 109), были выделены группы больных с разными по тяжести формами туберкулеза легких: с очаговой, инфильтративной и фиброзно-кавернозной.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы Statistica 8.0 for Windows, где использовали критерии Пирсона с поправкой Йейтса и точный двусторонний критерий Фишера, отличия считались значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

На предыдущих этапах работы мы исследовали вклад полиморфизма гена *IL6*(-174)\*G/C в формирование предрасположенности к развитию

активного туберкулеза легких и обнаружили, что у больных, характеризующихся бактериовыделением повышена частота встречаемости аллеля G и генотипа G/G в сравнении с больными без бактериовыделения. Между группами больных и контрольной группой достоверные различия не были обнаружены [1].

В настоящей работе мы сравнили частоту аллелей и генотипов гена *IL6* у больных с разной степенью поражения легких: с легкой (очаговый туберкулез) и более тяжелыми (инфильтративный и фиброзно-кавернозный), т.к. по литературным данным известно о роли генетических полиморфизмов в формировании широкого диапазона клинических форм заболевания [1, 4]. В результате анализа было обнаружено достоверное снижение у больных фиброзно-кавернозной формой в сравнении с очаговой генотипа *IL6(-174)\*C/C* (18% и 46%,  $p = 0,032$ , OR = 0,139, CI 0,021-0,925), связанного с низкой продукцией цитокина, и повышение частоты гетерозиготного генотипа *IL6(-174)\*G/C* (63% и 23%,  $p = 0,045$ , OR = 5,833, CI 1,031-34,461), связанного со средней продукцией цитокина. У больных с инфильтративной формой туберкулеза распределение генотипов соответствовало распределению у больных с фиброзно-кавернозной формой: повышена частота гетерозиготного генотипа *IL6(-174)\*G/C* (44%) и снижена частота *IL6(-174)\*C/C* (30%), но различия не достигли статистической значимости. У больных с более тяжелой инфильтративной формой с распадом генотип *IL6(-174)\*C/C* не встречался.

Наши результаты подтверждают теорию о том, что генетические различия определяют развитие различных форм туберкулеза. У больных, имеющих в генотипе *IL6(-174)\*C/C*, отвечающий за низкую продукцию цитокина, большая вероятность развития более легких форм. У больных, имеющих в генотипе *IL6(-174)\*G/C*, вероятно, более высокий риск развития тяжелых форм: инфильтративной и фиброзно-кавернозной. Эти различия соответствуют литературным данным, согласно которым тяжесть заболевания определяется продукцией *IL6* и характеризуется тенденцией к повышению продукции цитокина у больных с более тяжелыми формами [4].

## Заключение

Изучение генетических биомаркеров чувствительности развития различных клинических фенотипов туберкулеза позволит разработать персонализированный подход к диагностике и лечению заболевания, а также глубже изучить его патогенез. Необходимо продолжить исследование генных полиморфизмов цитокинов, продукты которых участвуют в иммунном ответе на туберкулез, а также рассмотреть комбинации и межгенные взаимодействия, поскольку их совместное действие может иметь различные эффекты, что будет способствовать развитию новых взглядов на профилактические и терапевтические подходы при туберкулезе легких.

## Список литературы / References

1. Беляева С.В., Сташкевич Д.С., Максимова Е.А. Полиморфизм гена *IL-6* у больных туберкулезом легких русских Челябинской области // Материалы XVII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 75-летию Южно-уральского государственного медицинского университета, 2019. С. 10-11. [Beliaeva S.V., Stashkevich D.S., Maksimova E.A. Polymorphism of the *IL-6* gene in Russian patients with pulmonary tuberculosis of the Chelyabinsk region. Materials of the XVII All-Russian Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Specialists dedicated to the 75<sup>th</sup> anniversary of the South Ural State Medical University, 2019, pp. 10-11. (In Russ.)]
2. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Ситникова А.В., Бармина С.Э. Функциональный полиморфизм генов провоспалительных цитокинов при туберкулезе легких // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 149-156. [Churina E.G., Urazova O.I., Novitsky V.V., Sitnikova A.V., Barmina S.E. Functional polymorphism of the pro-inflammatory cytokine genes in pulmonary tuberculosis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 149-156. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-149-156
3. Aravindan P.P. Host genetics and tuberculosis: Theory of genetic polymorphism and tuberculosis. *Lung India*, 2019, Vol. 36, no. 3, pp. 244-252.
4. Delgobo M., Mendes D. AGB., Kozlova E., Rocha E.L., Rodrigues-Luiz G.F., Mascarin L., Dias G., Patrício D.O., Dierckx T. An evolutionary recent IFN/IL-6/CEBP axis is linked to monocyte expansion and tuberculosis severity in humans. *eLife*, 2019, Vol. 8. doi: 10.7554/eLife.47013.
5. Martinez A.N., Mehra S., Kaushal D. Role of interleukin 6 in innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 207, Iss. 8, pp. 1253-1261.
6. Milano M., Moraes M.O., Rodenbusch R., Carvalho C.X., Delcroix M., Mousquer G., Laux da Costa L., Unis G., Dalla Costa E.R., Rossetti M.L. Single nucleotide polymorphisms in *IL17A* and *IL6* are associated with decreased risk

for pulmonary tuberculosis in Southern Brazilian population. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 2, e0147814. doi: 10.1371/journal.pone.0147814.

7. Singh P.P., Goyal A. Interleukin-6: a potent biomarker of mycobacterial infection. *SpringerPlus*, 2013, Vol. 2, 686. doi: 10.1186/2193-1801-2-686.

8. Singh P.P., Sinha S., Goyal M. Diagnosis of human tuberculosis: identification of new biomarker(s) and biosignature(s). *Int. J. Infect. Dis.*, 2016. Vol. 45, no. 1, 413. doi: 10.1016/j.ijid.2016.02.882.

9. Sun Y., Wang M. Association between IL-6 gene polymorphisms and susceptibility of tuberculosis: evidence based on a meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2017, Vol. 10, no. 3, pp. 4297-4304.

---

**Автор:**

**Беляева С.В.** — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

**Author:**

**Belyaeva S.V.**, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Biological Faculty, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 26.06.2020

Принята к печати 04.07.2020

Received 26.06.2020

Accepted 04.07.2020

## ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ ГЕНА *TP53* ПРИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ ВЗРОСЛЫХ

Виноградов А.В.<sup>1,2</sup>, Резайкин А.В.<sup>2</sup>, Литвинова Д.В.<sup>2</sup>, Лобода А.Н.<sup>2</sup>,  
Сазонов С.В.<sup>2,3</sup>, Сергеев А.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Министерство здравоохранения Свердловской области, г. Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», г. Екатеринбург, Россия

<sup>3</sup> ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

**Резюме.** Цель исследования – оценка патогенетической значимости мутаций гена *TP53* у взрослых больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ). Клиническое наблюдение проведено на 114 пациентах с ОМЛ на базе Свердловской областной клинической больницы № 1 (г. Екатеринбург), из них 56 – мужчины, 58 – женщины. Средний возраст обследованных составлял 53,3±2,8 лет.

Морфологически диагноз «ОМЛ» во всех случаях был предварительно верифицирован в специализированных лабораториях с использованием стандартных цитологических, цитохимических, иммунофенотипических, гистологических и иммуногистохимических методик. В исследование были включены следующие варианты ОМЛ: M0 – 5, M1 – 9, M2 – 47, M2базо – 3, M2эо – 2, M3 – 8, M4 – 25, M4эо – 3, M5 – 3, M6 – 4, M7 – 1, острый миелофиброз – 1, бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль – 2. Исследовали пробы периферической крови и аспиратов костного мозга пациентов. Все образцы протестированы на наличие молекулярных повреждений экзонов 4–11 гена *TP53*. Кроме того, 81 проба, в том числе 22 – ОМЛ с нормальным кариотипом и 23 – с неуточненным, были обследованы на наличие мутаций гена *NPM1* молекулярно-генетическим и иммуногистохимическим методами. Секвенирование кДНК осуществлялось на автоматическом генетическом анализаторе по прямой и обратной последовательностям. Обработка результатов секвенирования осуществлялась с использованием программы MEGA X на основе статистической гипотезы, что они могут быть описаны биномиальным распределением. Проверка статистической гипотезы проведена с использованием точного критерия Фишера и  $\chi^2$ .

По результатам цитогенетического и ПЦР-исследований благоприятный прогноз определялся в 25 наблюдениях (21,9%), промежуточный – в 24 (21,1%), неблагоприятный – 33 случая (28,9%). В 32 пробах (28,1%) методами стандартной цитогенетики и ПЦР в реальном времени выявить генетические аномалии не удалось, соответственно, вариант прогноза у таких больных оказался не уточнен.

Миссенс-мутации *TP53* были представлены транзициями С292Т, А377Г, А659Г, С817Т (4 случая) и трансверсиями С569Г, G733Т, G841С (3 случая), также определялись синонимичные замены А639G (1,8%) и С891Т (0,9%) по третьей позиции кодона, не имевшие патогенетического значения. В одной пробе (0,9%) определялась делеция тимидина в позиции 645 кодирующей последовательности, приводящая к синтезу укороченного мутантного белка. Все вышеуказанные мутации локализовались в

### Адрес для переписки:

Виноградов Александр Владимирович  
Министерство здравоохранения Свердловской области  
620014, Россия, г. Екатеринбург, ул. Вайнера, 34б.  
Тел.: 8 (919) 438-92-33.  
E-mail: a.vinogradov@egov66.ru

### Address for correspondence:

Vinogradov Alexander V.  
Sverdlovsk Regional Ministry of Health  
620014, Russian Federation, Ekaterinburg, Weiner str., 34b.  
Phone: 7 (919) 438-92-33.  
E-mail: a.vinogradov@egov66.ru

### Образец цитирования:

А.В. Виноградов, А.В. Резайкин, Д.В. Литвинова,  
А.Н. Лобода, С.В. Сазонов, А.Г. Сергеев  
«Патогенетическое значение точечных мутаций гена  
*TP53* при острых миелоидных лейкозах взрослых»  
// Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23,  
№ 2. С. 195–202.  
doi: 10.46235/1028-7221-264-PVO

© Виноградов А.В. и соавт., 2020

### For citation:

A.V. Vinogradov, A.V. Rezaykin, D.V. Litvinova, A.N. Loboda,  
S.V. Sazonov, A.G. Sergeev “Pathogenetic value of *TP53*  
point mutations in adult acute myeloid leukemia patients”,  
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 195–202.  
doi: 10.46235/1028-7221-264-PVO

DOI: 10.46235/1028-7221-264-PVO

области ДНК-связывающего домена. Также в одном наблюдении (0,9%) выявлена тандемная дупликация протяженностью 19 оснований в 960 позиции кодирующей последовательности NLS-домена белка, располагающаяся на сайте ацетилирования. Несинонимичная трансверсия C215G, являвшаяся полиморфным вариантом гена, определялась в 94 пробах (82,5%). Клинически все *TP53*-позитивные ОМЛ характеризовались неблагоприятным прогнозом и первичной резистентностью опухоли к стандартной полихимиотерапии. Средний возраст таких больных составил  $63,0 \pm 5,4$  лет, что достоверно выше, чем в среднем по выборке. Средняя длительность наблюдения равнялась  $3,1 \pm 0,9$  месяца.

*Ключевые слова:* мутация, прогноз, острый миелоидный лейкоз, секвенирование, ген *TP53*

## PATHOGENETIC VALUE OF *TP53* POINT MUTATIONS IN ADULT ACUTE MYELOID LEUKEMIA PATIENTS

Vinogradov A.V.<sup>a,b</sup>, Rezaykin A.V.<sup>b</sup>, Litvinova D.V.<sup>b</sup>, Loboda A.N.<sup>b</sup>, Sazonov S.V.<sup>b,c</sup>, Sergeev A.G.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Sverdlovsk Regional Ministry of Health, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Institute of Medical Cell Technology, Ekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the study was to assess pathogenetic significance of *TP53* gene mutations in adult acute myeloid leukemia (AML) patients. Clinical observation was carried out on 114 AML patients at the Sverdlovsk Regional Clinical Hospital No. 1 (Ekaterinburg), including 56 males and 58 females. The average age of subjects was  $53.3 \pm 2.8$  years.

Morphologically, AML was previously verified in all cases at specialized laboratories by using standard cytological, cytochemical, immunophenotypic, histological and immunohistochemical methods. The study included the following variants of AML: M0 – 5, M1 – 9, M2 – 47, M2baso – 3, M2eo – 2, M3 – 8, M4 – 25, M4eo – 3, M5 – 3, M6 – 4, M7 – 1, acute myelofibrosis – 1, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm – 2. Samples of peripheral blood and bone marrow aspirates from patients were examined. Exons 4-11 within the *TP53* gene were tested for molecular damage by using sequencing method. In addition, 81 samples, including 22 AML with normal and 23 with an unspecified karyotype were examined for gene mutations by using molecular genetic and immunohistochemical methods. cDNA sequencing was carried out on automatic genetic analyzer in forward and reverse sequences. The sequencing results were processed by using the MEGA X software and statistical hypothesis that they may be described by a binomial distribution. The statistical hypothesis was tested by using Fisher's exact test and  $\chi^2$  test.

According to the results of cytogenetic and PCR studies, a favorable prognosis was determined in 25 cases (21.9%), intermediate – 24 (21.1%) and unfavorable – in 33 (28.9%). No genetic abnormalities could be detected in 32 samples (28.1%) with standard cytogenetics and real-time PCR, and prognosis option for such patients was not specified.

*TP53* missense mutations were revealed as C292T, A377G, A659G, C817T transitions (4 cases) and C569G, G733T, G841C transversions (3 cases); synonymous A639G substitutions were also determined (1.8% ) and C891T (0.9%), in codon position 3, providing no pathogenetic significance. In one sample (0.9%), a deletion of thymidine at position 645 of the coding sequence was determined, leading to produced shortened mutant protein. All the above mutations were localized in the region of the DNA-binding domain. Also, in one case (0.9%), a tandem duplication of 19 nucleotides at position 960 of the coding sequence of the NLS domain protein located in acetylation site. Non-synonymous C215G transversion, which is a polymorphic gene variant, was determined in 94 samples (82.5%). Clinically, all *TP53*-positive AML were characterized by unfavorable prognosis and primary resistance to standard chemotherapy. The average age of such patients was  $63.0 \pm 5.4$  years, with average follow-up reaching up to  $3.1 \pm 0.9$  months.

*Keywords:* mutation, prognosis, acute myeloid leukemia, sequencing, *TP53* gene

## Введение

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — это клональное опухолевое заболевание кроветворной ткани, связанное с мутацией в клетке-предшественнице гемопоэза, следствием которой становится блок дифференцировки и бесконтрольная пролиферация незрелых миелоидных клеток. В европейских клинических рекомендациях по лечению ОМЛ, помимо проведения стандартных анализов, для верификации диагноза предлагается также анализ аспирата костного мозга на наличие мутаций некоторых генов, таких как *TP53*, *ASXL1*, *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* и ряда других [7].

Ген *TP53*, расположенный на хромосоме 17p13.1, состоит из 11 экзонов, кодирует фосфопротеин p53, состоящий из 393 аминокислот, который функционирует как фактор транскрипции с жизненно важной функцией супрессора опухоли. Он содержит несколько важных функциональных доменов: N-концевой трансактивационный домен, который взаимодействует с отрицательным регулятором MDM2 (аминокислотные остатки (а.о.) 1-64); пролиновое домен, обеспечивающий активацию апоптоза, (а.о. 63-97); ДНК-связывающий домен (а.о. 94-292); сигнал ядерной локализации (NLS, а.о. 305-322); домен тетрамеризации (а.о. 319-359); C-концевой регуляторный домен (а.о. 360-393) [6,8,9,14].

Белок p53 экспрессируется во всех ядродержащих клетках организма. Его активация происходит при повреждениях генетического аппарата и приводит к изменению способности к связыванию с ДНК и активации транскрипции генов, содержащих специфическую нуклеотидную последовательность в регуляторной области (p53-response element). В результате активации, в зависимости от модальности стимула, происходит либо остановка клеточного цикла и репликации ДНК, либо запуск программируемой гибели клетки. Соответственно, при возникновении мутаций нарушаются следующие ключевые функции белка p53: связывание и образование устойчивых комплексов с ДНК, подавление спонтанной гомологичной рекомбинации, активация эксцизионной репарации, индуцирование транскрипции NER-генов, репликация двунитевых разрывов ДНК, препятствующая анеупloidии. Все это провоцирует снижение активности антигенпрезентирующих клеток, подавление провоспалительных цитокинов, дисбаланс в работе сигнальных путей FASL/FAS, TNFR1/TNF, Treg/Th17, RANKL/RANK/OPG, что значимо в онкогенезе злокачественных опухолей системы крови [6, 8, 9, 14].

Соматические мутации *TP53* встречаются в большинстве типов спорадических онкологических заболеваний человека (частота варьирует от

5,0 до 70,0% в зависимости от типа и стадии рака). При этом в 82,1% случаев в ДНК-связывающем домене обнаруживают миссенс-мутации, 30% из которых представляют собой замену гуанина на аденин. Чаще всего мутации наблюдаются в кодонах 175, 176, 220, 245, 248, 249, 273, 282, которые находятся в ДНК-связывающем домене. Мутации *TP53* могут также передаваться по наследству в семьях с предрасположенностью к множественному раку, например, при синдроме Ли-Фраумени. Примечательно, что при некоторых видах опухолей идентифицированы спектры мутаций *TP53*, специфичные для определенной опухоли, что актуально для генодиагностики и таргетного лечения. Соответственно, мутации *TP53* являются генетическим предиктором ответа опухоли на лечение и выживаемости пациента [6, 8, 9, 14].

**Цель исследования** — оценка патогенетической значимости мутаций гена *TP53* у взрослых больных острыми миелоидными лейкозами.

## Материалы и методы

Клиническое наблюдение проведено на 114 пациентах с ОМЛ на базе ГАУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1» (г. Екатеринбург), из них 56 человек — мужчины, 58 — женщины. Средний возраст обследованных составлял  $53,3 \pm 2,8$  лет.

Морфологически диагноз «ОМЛ» во всех случаях был предварительно верифицирован в специализированных лабораториях на базе ГАУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1» и ГАУЗ СО «Свердловское областное патологоанатомическое бюро» с использованием стандартных цитологических, цитохимических, иммунофенотипических, гистологических и иммуногистохимических методик. В соответствии с этим, в исследование включены следующие варианты ОМЛ по классификации ВОЗ: M0 — 5, M1 — 9, M2 — 47, M2базо — 3, M2эо — 2, M3 — 8, M4 — 25, M4эо — 3, M5 — 3, M6 — 4, M7 — 1, острый миелофиброз — 1, бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль — 2 [3, 5].

В исследуемой группе всем пациентам выполнено цитогенетическое (G-banding) и молекулярно-генетическое (методами ПЦР в режиме реального времени и прямого автоматического секвенирования) исследования. Протестированы на наличие молекулярных повреждений экзона 4-11 гена *TP53* в соответствии с ранее описанными методиками [1, 4]. Кроме того, 81 проба, в том числе 22 — ОМЛ с нормальным кариотипом и 23 — с неуточненным, были обследованы на наличие мутаций гена *NPM1* молекулярно-генетическим и иммуногистохимическим методами [5].

Исследовали пробы периферической крови и аспиратов костного мозга пациентов. Периферическая кровь отбиралась в исследование только при уровне бластемии не ниже 2000/мкл. Для предотвращения фрагментации и деградации РНК биообразцы сразу после отбора в вакуумные пробирки с ЭДТА и антикоагулянтом (BD Vacutainer K<sub>2</sub>EDTA, Becton Dickinson, США) смешивались с реагентом для стабилизации РНК RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific, США) в соотношении: 1 объем биообразца и 2 объема стабилизирующего раствора. Далее, до выделения РНК, пробы хранились не более 72 часов при температуре +4 °С.

Выделение тотальной РНК с последующей обратной транскрипцией в кДНК осуществляли с использованием ревертазы М-MLV и гексануклеотидных праймеров со случайной последовательностью. Участки кДНК, соответствующие экзонам 4-11 гена *TP53*, амплифицировали методом ПЦР. Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза с последующей детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе. Секвенирование кДНК осуществлялось на автоматическом генетическом анализатор (секвенаторе) по прямой и обратной последовательностям [1, 4].

Обработка результатов секвенирования осуществлялась с использованием программы MEGA X [10] на основе статистической гипотезы, что они могут быть описаны биномиальным распределением. Проверка статистической гипотезы проведена с использованием точного критерия Фишера и критерия  $\chi^2$ .

## Результаты

По результатам цитогенетического исследования в 31 случаях (27,2%, при 95% ДИ от 19,9 до 36,0%) определялся нормальный, в 51 (44,7%, при 95% ДИ от 35,9 до 53,9%) – aberrантный кариотип опухоли. Среди aberrантных кариотипов преобладала псевдодиплоидия ( $n = 24$ , 47,1%, при 95% ДИ от 34,1 до 60,5%), в том числе специфические аномалии, ассоциированные с благоприятным прогнозом – 14 наблюдений (27,4%, при 95% ДИ от 17,1 до 41,0%),  $t(8;21)(q22;q22) - 2$ ,  $inv(16)(p13;q22) - 9$ ,  $t(15;17)(q22;q21) - 3$ , с неблагоприятным – 5 (9,8%, при 95% ДИ от 4,3 до 21,0%),  $t(11;19)(q23;p13) - 1$ ,  $t(9;22)(q34;q11) - 1$ ,  $del(5q) - 1$ ,  $t(3;3)(q21;q26) - 1$ ,  $inv(9)(q12;p11) - 1$ , прочие – 5 (9,8%, при 95% ДИ от 4,3 до 21,0%),  $i(7) - 2$ ,  $add(2)(q37) - 1$ ,  $add(4)(p16) - 1$ ,  $ins(7;2)(q11;p23-p25) - 1$ . Анеуплоидия и комплексные аномалии кариотипа определялись в 9 (17,6%, при 95% ДИ от 9,6 до 30,3%) и 18 (35,3%, при 95% ДИ от 23,6 до 49,0%) случаях, соответственно. При дополнительном исследовании проб с

нормальным кариотипом методом ПЦР в реальном времени в двух случаях (6,5%, при 95% ДИ от 1,8 до 20,7%) при М3 определена криптическая  $t(15;17)(q22;q21)$  с экспрессией химерного транскрипта PML-RARA L-типа, в одном (3,2%, при 95% ДИ от 0,6 до 16,2%), при М2 –  $t(6;11)(q27;q23)$  с MLL-AF6 (KMT2A-AFDN). Кроме того, дополнительное иммуногистохимическое и молекулярно-генетическое исследование на мутации гена *NPM1* позволило выявить их в 9 образцах с диплоидией (40,9%, при 95% ДИ от 23,3 до 61,3%). Таким образом, по результатам иммуногистохимического и генетического исследований благоприятный прогноз ОМЛ определялся в 25 наблюдениях (21,9%, при 95% ДИ от 15,2 до 30,4%), промежуточный – в 24 (21,1%, при 95% ДИ от 14,6 до 29,4%), неблагоприятный – 33 случая (28,9%, при 95% ДИ от 21,4 до 37,9%). В 32 пробах (28,1%, при 95% ДИ от 20,7 до 36,9%) обнаружить генетические повреждения методами иммуногистохимии, молекулярной генетики и стандартного кариотипирования не удалось, соответственно, прогноз общей выживаемости больных не был стратифицирован [2].

В исследуемых экзонах гена *TP53* методом прямого секвенирования патогенетически значимые мутации определялись в 9 наблюдениях (7,9%, при 95% ДИ от 4,2 до 14,3%). В большинстве случаев они были представлены миссенс-мутациями (7 случаев, 6,1% при 95% ДИ от 3,0 до 12,1%), по одному случаю (0,9%, при 95% ДИ от 0,2 до 4,8%) – делеция и tandemная дупликация. Во всех наблюдениях, за исключением tandemной дупликации, отмечалось вовлечение ДНК-связывающего домена кодируемого мутантного белка. Кариотип *TP53*-позитивных лейкозов в 7 случаях характеризовался наличием комплексных хромосомных aberrаций, при этом среди них в трех случаях выявлялись структурные aberrации с вовлечением сегмента 17p – делеции ( $n = 2$ ) и вставки ( $n = 1$ ). В оставшихся пробах определялись диплоидия и неуточненный кариотип [2] – по одному наблюдению. Соответственно, после дополнительного исследования мутационного статуса *TP53* методом секвенирования прогноз во всех случаях стратифицировался как неблагоприятный. Морфологически варианты ОМЛ с выявленными мутациями *TP53* характеризовались как М2 ( $n = 4$ ), М2эо ( $n = 2$ ), М4 ( $n = 1$ ) и М6 ( $n = 2$ ). Клинически эти случаи характеризовались первичной резистентностью ( $n = 8$ ) опухоли либо ранней летальностью ( $n = 1$ ). Средний возраст *TP53*-позитивных больных ОМЛ составил  $63,0 \pm 5,4$  лет, средняя длительность наблюдения –  $3,1 \pm 0,9$  месяцев.

Среди выявленных патогенетически значимых миссенс-мутаций преобладали несинони-

мичные транзиции (4 случая, 3,5%, при 95% ДИ от 1,4 до 8,7%), при этом в одной из исследованных проб одновременно выявлялись сразу две из них (С292Т, С817Т). Наиболее часто встречалась транзиция С817Т (экзон 8), которая, соответственно определялась в двух пробах (1,8%, при 95% ДИ от 0,5 до 6,2%, изолированная и в сочетании с С292Т, экзон 4). По одному наблюдению определялись несинонимичные замены А377G (экзон 5) и А659G (экзон 6). Таким образом, случаи транзиций пуриновых и пиримидиновых оснований встречались в одинаковом числе исследованных проб (n = 2, 1,8%, при 95% ДИ от 0,5 до 6,2%).

Несинонимичные трансверсии определялись в 3 случаях (2,6%, при 95% ДИ от 0,1 до 7,4%) и были представлены, соответственно, заменами С569G (экзон 6), G733Т (экзон 7) и G841С (экзон 8), то есть во всех случаях было задействовано гуаниновое основание.

Наряду с функционально значимыми заменами, в двух пробах (1,8%, при 95% ДИ от 0,5 до 6,2%) определялись другие типы мутаций гена TP53, значимые для онкогенеза ОМЛ. В первом случае (0,9%, при 95% ДИ от 0,2 до 4,8%) при морфологическом варианте М2 с кариотипом 47, XY, del(3)(p12), del(5)(q31), add(17)(p13), -7, +21,+mar определялась фреймшифт-делеция тимидина в позиции 645 кодирующей последовательности экзона 6 гена TP53, приводящая к синтезу укороченного (до 245 аминокислотных остатков) мутантного белка. Во втором наблюдении, при ОМЛ М2 с неуточненным кариотипом, в позиции 960 кодирующей последовательности экзона 9 определялась тандемная дупликация (фреймшифт-инсерция), протяженностью 19 оснований нуклеотидов. В результате синтезировался нефункциональный полипептид, т.к. мутация располагалась в сайте ацетилирования и вовлекала NLS-домен tp53.

Несинонимичная трансверсия С215G (экзон 4), являющаяся полиморфным аллельным вариантом гена TP53 [6, 11], и обуславливавшая замену в кодируемом полипептиде аминокислотного остатка Р72R, определялась в 94 пробах (82,5%, при 95% ДИ от 74,5 до 88,4%). Кодирующая последовательность TP53 «дикого типа», соответствующая референсной NM\_000546, обнаруживалась лишь в 13 наблюдениях (11,4%, при 95% ДИ от 6,8 до 18,5%).

Наряду с миссенс-мутациями, в 3 пробах (2,6%, при 95% ДИ от 0,9 до 7,5%) определялись также синонимичные транзиции по третьей позиции нуклеотида в кодоне, соответственно, не приводящие к замене кодируемой аминокислоты ввиду вырожденности генетического кода. В двух случаях (1,8%, при 95% ДИ от 0,5 до 6,2%) они

были представлены транзицией А639G, в одном (0,9%, при 95% ДИ от 0,3 до 9,6%) – С891Т. В двух случаях они определялись у больных с неуточненным кариотипом [2], по одному наблюдению – диплоидия и t(9;22)(q34;q11).

## Обсуждение

По данным международных баз данных [11, 12, 13], в структуре точечных мутаций TP53 при ОМЛ преобладают несинонимичные замены (60,0%), среди которых подавляющее большинство составляют миссенс-мутации (91,7%). Среди прочих молекулярных повреждений в 15,0% случаев выявляются мутации сайтов сплайсинга, по 10% – фреймшифт-делеции и инсерции, 5% – синонимичные замены. При этом не обнаружено зависимости уровня экспрессии белка tp53 от типа мутации при сравнении укороченных мутантных белков с мутантными полноразмерными и нормальными (немутантными) [13]. Полученные в нашем исследовании результаты в целом соответствовали вышеописанной структуре: миссенс-мутации составили 58,3% наблюдений, фреймшифт-делеции и инсерции – по 8,3%, синонимичные замены – 25,0%. Мутации сайтов сплайсинга в нашем исследовании не определялись, т.к. секвенирование было ограничено кодирующими последовательностями экзонов 4-11 гена TP53.

Среди выявленных миссенс-мутаций особого внимания заслуживали трансверсия G733Т, обуславливавшая замену глицина на цистеин в позиции R245 белка, и транзиция С817Т, приводящая к замене аргинина на цистеин в остатке 273. Указанные аномалии входят в число самых распространенных соматических мутаций (так называемых «горячих точек») TP53 по данным IARC TP53 Database [12], причем доля последней достигает 17,0% в структуре изменений гена при ОМЛ. Это полностью соответствует полученным в нашем исследовании данным (16,6%). Среди прочих несинонимичных замен транзиция А659G и трансверсия G841С, обуславливающие, соответственно, мутации Y220С и D281Y в ДНК-связывающем домене белка, также описаны как онкогенные при лейкозах [11]. Мутация А659G, кроме того, описана как наследственная при синдроме Ли–Фраумени, при котором отмечается предрасположенность к развитию целого ряда онкологических заболеваний [12]. Более редкой является мутация С292Т, приводящая к изменению аминокислотной последовательности пролинового домена белка P98S. Данная перестройка при ОМЛ встречается нечасто и характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом. В нашем исследовании она выявлялась в одной пробе одновременно с более типичной транзицией С817Т.

Замена цитозина на глутамин С569G, выявленная в одной пробе и способствующая нарушению белковой цепи с последующими необратимыми функциональными изменениями, также зарегистрирована при злокачественных миелоидных новообразованиях, но с небольшой частотой. При этом предполагается, что указанные изменения могут быть ранними, обуславливающими, в свою очередь, вторичные генетические аномалии вследствие развития генетической нестабильности, обусловленной активацией и супрессией целого ряда *TP53*-зависимых генов [11, 12, 13]. Это корреспондировало со структурой выявленных при *TP53*-позитивных ОМЛ хромосомных aberrаций, среди которых в нашем исследовании преобладали комплексные аномалии кариотипа (в 77,8% наблюдений).

В соответствии с гипотезой о синтетических леталях, экспрессия определенных онкогенов значимо активируется в *TP53*-позитивных злокачественных новообразованиях по сравнению с *TP53*-негативными опухолями и нормальными тканями. Соответственно, разработка и применение таргетных противоопухолевых препаратов, направленных на синтетические летали, является перспективным для лечения *TP53*-позитивных ОМЛ [13]. Среди них при *TP53*-позитивных ОМЛ рассматривают следующие гены, участвующие в процессах апоптоза, активации ГТФаз, связывания белков, микротрубочек, кинезина и протеинкиназ: AUNIP (aurora kinase A and ninein interacting protein), DDIAS (DNA damage induced apoptosis suppressor), DEPDC1 (DEP domain containing 1) и FAM83D (family with sequence similarity 83 member D). Наоборот, экспрессия некоторых других генов при мутациях *TP53* подавляется, соответственно, в исследовании иммуногистохимическим и молекулярно-генетическим методами не было выявлено мутаций и изменения клеточной экспрессии гена *NPM1* при *TP53*-позитивных ОМЛ.

Таким образом, сравнительный анализ полученных в исследовании результатов и международных баз данных подтверждает, что выявленные мутации *TP53* имеют онкогенное значение

для развития ОМЛ. При этом в большинстве проб определялись миссенс-мутации, расположенные в ДНК-связывающем домене, что соответствовало их наиболее типичной локализации в гене *TP53* [11, 12, 13].

## Заключение

Исследование мутационного статуса гена *TP53* методом прямого автоматического секвенирования оказалось значимым для стратификации прогноза общей выживаемости больных ОМЛ. В исследуемой выборке было выявлено 8,1% образцов с патогенетически значимыми мутациями, все они были ассоциированы с крайне неблагоприятным прогнозом. Среди них наиболее часто встречались миссенс-мутации (6,1%), затрагивающие ДНК-связывающий домен (экзоны 5-8). Также определялись однонуклеотидная фрейм-шифт-делеция в экзоне 6 и тандемная дупликация (фрейм-шифт инсерция) в экзоне 9 (по одной пробе, 0,9%). Последняя располагалась вне области ДНК-связывающего домена, затрагивая сайт ацетилирования NLS-домена белка p53.

Клинически случаи ОМЛ с мутациями *TP53* характеризовались первичной резистентностью лейкозного клона к стандартной полихимиотерапии либо ранней летальностью, средняя продолжительность наблюдения составила  $3,1 \pm 0,9$  месяцев. Средний возраст больных ОМЛ с мутациями *TP53* был выше, чем в целом по выборке —  $63,0 \pm 5,4$  лет. При этом мутации *TP53* определялись у больных в возрасте 48-79 лет, медиана возраста выявления мутаций составила 61 год.

Заслуживает внимания также тот факт, что в исследуемой выборке не выявлено мутаций и изменения клеточной локализации экспрессии гена *NPM1* при *TP53*-позитивных ОМЛ иммуногистохимическим и молекулярно-генетическим методами, что свидетельствует в пользу отсутствия связи между этими молекулярными событиями в онкогенезе ОМЛ.

В целом спектр выявленных в исследовании мутаций гена *TP53* при ОМЛ соответствует описанному в международных базах данных [11, 12, 13].

## Список литературы / References

1. Виноградов А.В. Разработка технологии детекции мутаций генов *CDKN2A/ARF*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TET2*, *TP53*, *WT1* при острых миелоидных лейкозах // Российский онкологический журнал, 2013, № 4. С. 34-35. [Vinogradov A.V. Technology development of *CDKN2A/ARF*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TET2*, *TP53*, *WT1* gene mutations detection during acute myeloid leukemia. *Rossiyskiy onkologicheskij zhurnal = Russian Journal of Oncology*, 2013, no. 4, pp. 34-35. (In Russ.)]
2. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Изотов Д.В., Сергеев А.Г. Применение технологии прямого автоматического секвенирования для детекции мутаций генов *ASXL1*, *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NRAS*, *TP53* и *WT1* при острых миелоидных лейкозах с неуточненным кариотипом // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2016. № 4. С. 38-51. [Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Izotov D.V., Sergeev A.G. *ASXL1*, *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NRAS*, *TP53* and *WT1* genes mutations detection in acute myeloid leukemia with unspecified karyotype

using direct sequencing technique. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2016, no. 4, pp. 38-51. (In Russ.)]

3. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Салахов Д.Р., Сергеев А.Г. Бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль: опыт диагностики и лечения в Свердловском областном онкогематологическом центре // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 2. С. 110-114. [Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sazonov S.V., Salakhov D.R., Sergeev A.G. Blastic plazmatsitoids dendritocell tumour: experience of diagnostics and treatment in the Sverdlovsk regional oncohematological center. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 2, pp. 110-114. (In Russ.)]

4. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Сергеев А.Г. Клинико-патогенетическая характеристика мутаций генов DNMT3A, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 и WT1 у больных острыми миелоидными лейкозами в возрастной группе 15-45 лет // Гены и клетки, 2018. Т. 14, № 3. С. 70-74. [Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sazonov S.V., Sergeev A.G. Clinical and pathological features DNMT3A, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 and WT1 genes mutations detection in acute myeloid leukemia patient aged 15-45 years old. *Geny i kletki = Genes and Cells*, 2018, Vol. 14, no. 3, pp. 70-74. (In Russ.)]

5. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Салахов Д.Р., Иощенко С.Е., Сергеев А.Г. Сравнительный анализ результатов типирования молекулярных повреждений гена NPM1 при острых миелоидных лейкозах с использованием прямого автоматического секвенирования и иммуногистохимического метода // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2013. № 4. С. 124-127. [Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Salakhov D.R., Ioschenko S.E., Sergeev A.G. Comparative analysis of NPM1 gene mutations detection results using sequencing and immunohistochemical technique. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2013, no. 4, pp. 124-127. (In Russ.)]

6. Hainaut P., Pfeifer G.P. Somatic TP53 mutations in the era of genome sequencing. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2016, Vol. 6, no. 11, pii: a026179. doi: 10.1101/cshperspect.a026179.

7. Herold T., Rothenberg-Thurley M., Grunwald V.V., Janke H., Goerlich D., Sauerland M.C., Konstandin N.P., Dufour A., Schneider S., Neusser M., Ksienzyk B., Greif P.A., Subklewe M., Faldum A., Bohlander S.K., Braess J., Wörmann B., Krug U., Berdel W.E., Hiddemann W., Spiekermann K., Metzeler K.H. Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2020. doi: 10.1038/s41375-020-0806-0.

8. Huang R., Liao X., Li Q. Identification of key pathways and genes in TP53 mutation acute myeloid leukemia: evidence from bioinformatics analysis. *OncoTargets Ther.*, 2017, Vol. 11, pp. 163-173.

9. Hunter A.M., Sallman D.A. Current status and new treatment approaches in TP53 mutated AML. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2019, Vol. 32, no. 2, pp. 134-144.

10. Kumar S., Stecher G., Li M., Niyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 2018, Vol. 35, no. 6, pp. 1547-1549.

11. Leroy B., Girard L., Hollestelle A., Minna J.D., Gazdar A.F., Soussi T. Analysis of TP53 mutation status in human cancer cell lines: a reassessment. *Hum. Mutat.*, 2014, Vol. 35, no. 6, pp. 756-765.

12. Li V.D., Li K.H., Li J.T. TP53 mutations as potential prognostic markers for specific cancers: analysis of data from The Cancer Genome Atlas and the International Agency for Research on Cancer TP53 Database. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2019, Vol. 145, no. 3, pp. 625-636.

13. Wang X., Sun Q. TP53 mutations, expression and interaction networks in human cancers. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 1, pp. 624-643.

14. Welch J.S. Patterns of mutations in TP53 mutated AML. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2018, Vol. 31, no. 4, pp. 379-383.

---

**Авторы:**

**Виноградов А.В.** — к.м.н., главный терапевт  
Министерства здравоохранения Свердловской области;  
врач-гематолог, соискатель ФГБОУ ВО «Уральский  
государственный медицинский университет»  
г. Екатеринбург, Россия

**Резайкин А.В.** — к.м.н., доцент кафедры медицинской  
физики ФГБОУ ВО «Уральский государственный  
медицинский университет», г. Екатеринбург, Россия

**Authors:**

**Vinogradov A.V.**, PhD (Medicine), Chief Therapist,  
Hematologist, Sverdlovsk Regional Ministry of Health;  
Hematologist, Postdoc Researcher of Ural State Medical  
University, Ekaterinburg, Russian Federation

**Rezaikin A.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor,  
Department of Medical Physics, Ural State Medical University,  
Ekaterinburg, Russian Federation

**Литвинова Д.В.** — клинический ординатор ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», г. Екатеринбург, Россия

**Litvinova D.V.**, Clinical Resident, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

**Лобода А.Н.** — студент ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», г. Екатеринбург, Россия

**Loboda A.N.**, Student, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

**Сазонов С.В.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»; заместитель директора по науке ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

**Sazonov S.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Histology, Ural State Medical University; Deputy Head, Institute of Medical Cell Technology, Ekaterinburg, Russian Federation

**Сергеев А.Г.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», г. Екатеринбург, Россия

**Sergeev A.G.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

---

Поступила 02.06.2020  
Принята к печати 01.07.2020

---

Received 02.06.2020  
Accepted 01.07.2020

## ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ У ЛИЦ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ В КРОВИ ВАНАДИЯ

Дианова Д.Г.<sup>1,2</sup>, Долгих О.В.<sup>1,3</sup>, Алексеев В.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Пермь, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», г. Пермь, Россия

**Резюме.** Загрязнение окружающей среды ванадием экзогенного происхождения способствует его накоплению в биосредах человека и изменяет возможность организма адекватно отвечать на негативное воздействие экспозиции гаптенами. Целью работы явилось, используя метод проточной цитофлюориметрии, оценить иммунологическую реактивность у лиц с повышенным содержанием в крови ванадия (гаптена). Обследовано взрослое население с различным уровнем в крови ванадия. Группа наблюдения (n = 50) с уровнем контаминации ванадием статистически значимо (p < 0,001) в 3,7 раза превышавшей верхнюю границу референтного уровня и в 4,3 раза – среднegrupповое содержание ванадия у обследуемых группы сравнения в крови которых концентрация ванадия соответствовала диапазону референтных значений (n = 42). Установлено, что у лиц с избыточной контаминации крови ванадием отмечается интенсификация процессов активации лимфоцитов, повышение уровня эффекторных клеток с хелперной активностью, дефицит регуляторных лимфоцитов и гуморального звена иммунной системы, угнетение р53-зависимого контроля клеточного цикла. Таким образом, использование метода проточной цитометрии позволяет оценить иммунологическую реактивность у лиц с различным уровнем контаминации крови химическими веществами экзогенного происхождения, а также определить адаптационные возможности организма к воздействию химических факторов окружающей среды.

**Ключевые слова:** проточная цитометрия, иммунологическая реактивность, ванадий

## EXPERIENCE OF APPLYING FLOW CYTOMETRY TO ASSESS IMMUNOLOGIC REACTIVITY IN SUBJECTS WITH INCREASED BLOOD VANADIUM CONCENTRATION

Dianova D.G.<sup>a, b</sup>, Dolgikh O.V.<sup>a, c</sup>, Alekseev V.B.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russian Federation

<sup>c</sup> Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

**Abstract.** Environmental pollution with external vanadium results in its accumulation in human biological media and alters ability of human body to properly react to negative impact after exposure to haptens. Aim of

### Адрес для переписки:

Долгих Олег Владимирович  
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»  
614045, Россия, г. Пермь, ул. Монастырская, 82.  
Тел.: 8 (342) 236-39-30.  
E-mail: oleg@fcrisk.ru

### Address for correspondence:

Dolgikh Oleg V.  
Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies  
614045, Russian Federation, Perm, Monastyrskaya str., 82.  
Phone: 7 (342) 236-39-30.  
E-mail: oleg@fcrisk.ru

### Образец цитирования:

Д.Г. Дианова, О.В. Долгих, В.Б. Алексеев «Опыт применения метода проточной цитометрии для оценки иммунологической реактивности у лиц с повышенным содержанием в крови ванадия» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 203–208. doi: 10.46235/1028-7221-312-EOA

© Дианова Д.Г. и соавт., 2020

### For citation:

D.G. Dianova, O.V. Dolgikh, V.B. Alekseev “Experience of applying flow cytometry to assess immunologic reactivity in subjects with increased blood vanadium concentration”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 203–208. doi: 10.46235/1028-7221-312-EOA

DOI: 10.46235/1028-7221-312-EOA

the work was to assess immunologic reactivity in subjects bearing increased blood vanadium (haptен) level by using flow cytometry. There were examined adults bearing various blood vanadium concentration. The test group was comprised by adult subjects ( $n = 50$ ) having blood vanadium concentration exceeding that one for the upper limit of the reference level and mean reference group ( $n = 42$ ) corresponding to reference range by 3.7- ( $p < 0.001$ ) and 4.3-fold, respectively. It was found that subjects with excessively vanadium-contaminated serum were featured with stronger lymphocytes activation, increased count of effector helper T cells, lowered count of regulatory lymphocytes and decreased humoral immune arm, and suppressed p53-dependent control of cellular cycle. Thus, flow cytometry allows to assessing immunologic reactivity in subjects with varying level of blood exogenous chemicals as well as determining body adaptation potential to effects exerted by environmental chemical cues.

*Keywords: flow cytometry, immunologic reactivity, vanadium*

## Введение

Химические вещества различного происхождения существенно влияют на адаптационные возможности организма, а в зависимости от времени воздействия и дозы оказывают иммуномодулирующее, иммунотоксическое или иммуностимулирующее действие [2, 3, 4, 5, 6, 11, 12]. Техногенное загрязнение ванадием и его соединениями источников питьевой воды, атмосферного воздуха и почвы представляет серьезную угрозу для здоровья населения. Соединения ванадия применяются в самых разных отраслях промышленности (в сталеплавильной промышленности, автомобильной и горнодобывающей, в атомной энергетике, авиаприборостроении и др.) [1]. Между тем отмечается рост интереса к ванадию и ванадийсодержащим соединениям как к потенциальным лекарственным средствам. В последнее десятилетие появился широкий спектр соединений ванадия, используемых в качестве терапевтических средств для лечения диабета, туберкулеза, анемии, ревматизма, ВИЧ-инфекции, артериальной гипертензии, вирусных и бактериальных инфекции, злокачественных новообразований [1, 8, 12].

Ванадий (гаптен) — металл переменной валентности, которому в организме отводится роль важного биологического регулятора. Основными функциями ванадия в организме являются участие в работе щитовидной железы, стимуляция и усиление пролиферации клеток костного мозга, изменение активности ферментных систем, инициация каскада сигнальных событий, которые ведут к изменению экспрессии генов, цитокинов, мембранных и внутриклеточных маркеров апоптоза и т.д. [1, 2, 3, 7, 9, 14, 15]. Избыток ванадия в организме вызывает нарушения работы дыхательной системы, воспалительные процессы кожи и слизистых органа зрения, аллергические реакции, миелосупрессию [8]. Пятивалентный ванадий обладает мутагенным действием [5]. Состояния, связанные с дефицитом ванадия встречаются крайне редко, между тем описаны случаи развития сахарного диабета, атеросклероза и маниакально-депрессивного психоза у людей с недостатком ванадия в организме [11, 15]. У животных при нехватке ванадия в организме отмечалось нарушение обмена железа и развитие анемии, дисбаланс в системе «костеобразова-

ние — резорбция костной ткани» и недоразвитие костей скелета. Несмотря на большое количество научных данных о влиянии ванадия на различные органы и системы, его эффекты на отдельные составляющие компоненты иммунной системы при накоплении в организме, требуют дальнейшего углубленного изучения. Использование лазерной проточной цитофлуориметрии дает возможность получить важнейшую информацию о функциональном состоянии иммунной системы в условиях повышенной внешнесредовой химической нагрузки [4]. Очевидно, использование современных диагностических технологий, таких как метод проточной цитометрии для выявления особенностей формирования иммунного ответа, как ведущего фактора адаптации организма к условиям внешней среды, представляет значительный научный и практический интерес.

**Цель работы** — с помощью проточной цитофлуориметрии оценить иммунологическую реактивность у лиц с повышенным содержанием в крови ванадия (гаптена).

## Материалы и методы

Настоящее исследование выполнено в соответствии с обязательным соблюдением этических принципов медико-биологических исследований, изложенных в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. (с изменениями и дополнениями 2008 г.) и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Информированное согласие на участие в исследовании и использование персональных данных подписано всеми участниками исследования.

Результаты настоящего исследования базируются на данных углубленного медицинского обследования 92 человека в возрасте от 22 до 55 лет (средний возраст  $37,59 \pm 1,14$  лет), имеющих различные уровни контаминации крови ванадием (по результатам масс-спектрометрических исследований). Группа сравнения — 42 человек с уровнем контаминации ванадием, соответствующим диапазону референтных значений ( $0,00006-0,00087$  мг/дм<sup>3</sup>) его содержания в крови, среднегрупповое содержание ванадия в крови соответствовало  $0,00076 \pm 0,00014$  мг/дм<sup>3</sup>. Группа наблюдения — 50 человек с уровнем контаминации ванадием статистически значимо ( $p < 0,001$ ) в 3,7

раза превышавшей верхнюю границу референтного уровня и в 4,3 раза – среднегрупповое содержание ванадия у обследуемых группы сравнения, что соответствовало  $0,00323 \pm 0,00061$  мг/дм<sup>3</sup>.

Иммунофенотипирование проводилось с помощью метода проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACSCalibur фирмы Becton Dickinson (BD, США). Выполнена оценка уровня экспрессии CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>(NKT), CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> (FAS), CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (Treg) и p53.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, США). Проверка распределения количественных данных проводилась с помощью статистического критерия Колмогорова–Смирнова. Представленные данные описаны с помощью среднего арифметического значения (M), стандартной ошибки (m) и 95%-ного доверительного интервала для медианы (95% CI). Для проверки нулевых гипотез о равенстве средних значений между двумя независимыми группами применялся критерий Стьюдента. Сравнение выборочных данных с референтными уровнями выполнено с использованием одновыборочного критерия Вилкоксона. Уровень значимости, на котором проводилась проверка нулевых гипотез, принимался равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

Цитофлуориметрическая оценка показателей иммунной системы показала, что у обследуемых группы наблюдения статистически значимо ( $p < 0,001$ ) снижено в среднем в 1,3 раза количество CD19<sup>+</sup> лимфоцитов (относительное число) и CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов (относительное и абсолютное число) по сравнению с величинами, идентифицированными у обследуемых группы сравнения (табл. 1). Результаты иммунологического тестирования выявили, что у лиц, характеризующихся избыточным содержанием ванадия в крови, статистически значимо ( $p < 0,001$ ) в 3,6 раза снижено процентное содержание регуляторных клеток относительно показателей, полученных у лиц в биосредах которых ванадий идентифицирован в пределах референтных значений. У обследуемых группы наблюдения статистически значимо ( $p < 0,001$ ) в 2,4 раза реже экспрессируется белок p53, чем у обследуемых группы сравнения. Установлено, что у лиц, в крови которых среднегрупповое содержание ванадия превышает референтные значения, статистически значимо ( $p < 0,001$ ) в 1,4 раза на Т-лимфоцитах повышена экспрессия маркера ранней активации CD25<sup>+</sup> рецептора по сравнению со значениями, выявленными у лиц, в биосредах которых содержание ванадия не превышает предел референтного интервала. Сравнительная характеристика показателей иммунного статуса выявила статистически значимое ( $p = 0,044$ ) повышение в 1,1 раза процентного содержания CD4<sup>+</sup> лимфоцитов у обследуемых группы наблюдения по отношению к

результатам, полученным у обследуемых группы сравнения.

Ванадий, являясь ультрамикрэлементом, концентрация которого в организме не должна превышать 0,000001%, относится к важным регуляторам многих физиологических процессов [11, 12, 13, 15]. Обнаружить ванадий можно во всех органах и тканях человека, но значительные концентрации данного металла идентифицируются в костной ткани, сердечной мышце, ткани щитовидной железы, почках, печени, легких, волосах, грудном молоке и молозиве [9, 13]. Установлено, что на клеточном уровне ванадий повышает активность ферментов, участвующих в метаболизме гликогена и липидов, модифицирует активность H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы и Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТФазы, стимулирует ванадат-зависимое окисление NADH, влияет на транспорт аминокислот [7, 8, 13, 15, 16]. Ванадий может взаимодействовать с тирозингидроксилазой, аденилаткиназой, рибонуклеазой, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназой, ферментами, которые содержат фосфатные группы [11]. Ванадат является конкурентным ингибитором глюкозо-6-фосфатазы, фермента, играющего важную роль в развитии инсулинрезистентности [13]. Целым рядом выполненных иммунологических исследований показано, что в условиях экспозиции ванадия происходит отклонение от физиологической нормы показателей клеточного звена и гуморального звена иммунной системы, концентрации цитокинов в крови, показателей апоптоза у детей [2, 11] и взрослых [3]. Установлено, ванадий способен модифицировать активность множество путей внутриклеточной сигнализации: путь, регулируемый p53, который является ключевым регулятором клеточного деления; путь NF-κB, ассоциированный с осуществлением адекватного иммунного ответа; сигнальные пути, координирующие пролиферацию и выживание клеток (p38 MAPK, JNK-каскад, ERK1/2-каскад, PI3K/Akt/mTOR) [15]. Значимо влияние ванадия на митоген активируемый протеинкиназный каскад (MAPK), так как именно он обеспечивает регуляцию иммунного ответа [9]. Ванадий способен влиять на скорость окислительно-восстановительных процессов в организме. В зависимости от времени воздействия ванадий оказывает либо антиоксидантное, либо прооксидантное действие в клетке [14]. Значительная концентрация активных форм кислорода (ROS) обуславливает окислительный стресс. При этом малые концентрации ROS (перекиси, свободные радикалы и др.) выполняют сигнальные функции, выступая в роли вторичных посредников в редокс-чувствительных сигнальных каскадах. Модифицирующее влияние ванадия на активность NADH митохондрий [15] и способность ванадия непосредственно накапливаться в митохондриях [14] изменяют реализацию апоптоза. В экспериментальных моделях длительная экспозиция ванадия

**ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА У ОБСЛЕДУЕМЫХ ЛИЦ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ КОНТАМИНАЦИИ КРОВИ ВАНАДИЕМ**

TABLE 1. INDICATORS OF THE IMMUNE STATUS IN THE EXAMINED INDIVIDUALS, DEPENDING ON THE LEVEL OF BLOOD CONTAMINATION WITH VANADIUM

Наименование показателя Name of the indicator	Обозначение Designation	Группа сравнения Observation group n = 42	Группа наблюдения Comparison group n = 50	t	p
<b>Процент CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, %</b> The percentage of CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> lymphocytes, %	M±m 95% CI	42,06±0,92 41,78-42,34	44,73±0,93 44,47-44,97	2,04	0,044
<b>Абсолютное количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, 10<sup>9</sup>/л</b> The absolute number of CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> lymphocytes, 10 <sup>9</sup> /l	M±m 95% CI	0,84±0,04 0,83-0,85	0,84±0,03 0,83-0,85	0,00	1,000
<b>Процент CD19<sup>+</sup> лимфоцитов, %</b> The percentage of CD19 <sup>+</sup> lymphocytes, %	M±m 95% CI	11,06±0,51 10,91-11,21	10,34±0,45 10,22-10,46	10,5	< 0,001
<b>Абсолютное количество CD19<sup>+</sup> лимфоцитов, 10<sup>9</sup>/л</b> The absolute number of CD19 <sup>+</sup> lymphocytes, 10 <sup>9</sup> /l	M±m 95% CI	0,23±0,02 0,22-0,24	0,20±0,01 0,200-0,201	0,89	0,373
<b>Процент CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> лимфоцитов, %</b> The percentage of CD4 <sup>+</sup> 25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> lymphocytes, %	M±m 95% CI	1,97±0,19 1,91-2,03	0,55±0,06 0,53-0,57	7,13	< 0,001
<b>Процент CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов, %</b> The percentage of CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> lymphocytes, %	M±m 95% CI	14,30±0,60 14,12-14,48	10,50±0,48 10,37-10,63	4,95	< 0,001
<b>Абсолютное количество CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов, 10<sup>9</sup>/л</b> The absolute number of CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> lymphocytes, 10 <sup>9</sup> /l	M±m 95% CI	0,29±0,02 0,28-0,30	0,20±0,01 0,200-0,201	4,02	< 0,001
<b>Процент CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> лимфоцитов, %</b> The percentage of CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> lymphocytes, %	M±m 95% CI	9,21±0,63 8,94-9,48	12,59±0,47 12,41-12,77	6,94	< 0,001
<b>Абсолютное количество CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> лимфоцитов, 10<sup>9</sup>/дм<sup>3</sup></b> The absolute number of CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> lymphocytes, 10 <sup>9</sup> /dm <sup>3</sup>	M±m 95% CI	0,18±0,01 0,17-0,18	0,24±0,01 0,23-0,24	4,24	< 0,001
<b>Процент CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> лимфоцитов, %</b> The percentage of CD3 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> lymphocytes, %	M±m 95% CI	35,14±1,55 34,48-35,80	34,66±1,45 35,09-36,23	0,23	0,821
<b>Абсолютное количество CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, 10<sup>9</sup>/дм<sup>3</sup></b> The absolute number of CD3 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> lymphocytes, 10 <sup>9</sup> /dm <sup>3</sup>	M±m 95% CI	0,69±0,03 0,68-0,70	0,66±0,03 0,65-0,67	0,71	0,481
<b>Процент p53, %</b> The percentage of p53, %	M±m 95% CI	3,42±0,29 3,33-3,51	1,44±0,11 1,44-1,47	6,38	< 0,001

Примечание. p – достоверность различий показателей между группой сравнения и группой наблюдения согласно t-критерию Стьюдента.

Note. p, the reliability of differences between the comparison group and the observation group according to t-Student test.

вызывала остановку клеточного цикла и инициацию апоптоза [12].

По результатам ряда исследований установлено, что в зависимости от концентрации ванадия и экспериментальной модели ванадий

опосредует изменения экспрессии CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> [15], CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, Treg, p53 и дисбаланс проапоптотических и антиапоптотических цитокинов, а также модифицирует реализацию апоптоза [2, 3, 15]. В системе *in vivo*

доказано, что метаванадат аммония при концентрации 5-60‰ вызывал субпопуляционный дисбаланс Т-лимфоцитов периферической крови и ингибирование пролиферации Т-клеток селезенки [14]. Следует отметить, что Т-лимфоцитам отводится важнейшая роль в регуляции функциональной активности В-лимфоцитов [16]. Ванадий в системе *in vitro*, оказывая влияние на активность GTPases, изменял уровень экспрессии мембранных маркеров на В-лимфоцитах [15]. Экспериментально показано, что метаванадат натрия в диапазоне концентрации 0-3,99 мМ усиливал продукцию IFN $\gamma$  и IgG В-лимфоцитами [15]. Первостепенное значение в процессе модуляции иммунного ответа в условиях повышенной гаптенной нагрузки, в том числе химическими веществами различной природы, отводится регуляторным клеткам. Активированные Treg способны подавлять иммунный ответ и ингибировать выход Т-эффекторов в очаг патологического процесса, а также вызывать гибель активированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток посредством перфорин-гранзимного механизма. Т-эффекторы способны приобретать невосприимчивость к супрессии Treg-клетками в условиях гиперэкспрессии цитокинов Th2 (IL-6) [16].

Очевидно, влияние ванадия на значительное количество ферментативных и сигнальных систем клетки предполагает наличие у него широкого спектра эффектов на иммунную систему. В условиях избыточного содержания ванадия в биосредах (кровь) отмечается дисбаланс в иммунной системе, а использование метода проточной цитометрии позволяет не только определить количественные показатели компонентов иммунной системы, но и установить их функциональную активность.

## Заключение

Изменения, формирующиеся в условиях повышенной контаминации крови химическими

веществами экзогенного происхождения (гаптенами), определяют качество и силу иммунного ответа, следовательно, степень адаптации организма к негативному воздействию факторов среды обитания. Понимание основ взаимодействия антигена и иммунной системы, путей иммунорегуляции позволяет своевременно выявить и устранить нарушения иммунологической реактивности, обусловленные воздействием химических факторов гаптенной природы. Установлено, что у лиц при идентификации в их крови ванадия, концентрация которого в 3,7 раза превышает референтный уровень, отмечается иммунный дисбаланс. Обнаружено, что у обследуемых в крови которых содержание ванадия превышает референтные значения, статистически значимо ( $p < 0,001$ ) до 30% снижено количество CD19<sup>+</sup> лимфоцитов и CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов, до 70% снижено содержание внутриклеточного протеина p53 и количество CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> лимфоцитов относительно значений, полученных у обследуемых в биосредах которых ванадий идентифицирован в пределах референтных значений. У лиц с избыточным содержанием ванадия в крови установлено статистически значимое ( $p = 0,001-0,044$ ) повышение до 10% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов и до 40% CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> лимфоцитов по сравнению с результатами, выявленными у обследуемых в биосредах которых содержание ванадия не превышает референтные значения. Таким образом, у лиц, проживающих в условиях экзогенной экспозиции, происходит накопление ксенобиотиков в биосредах, что указывает на необходимость оценки состояния иммунной системы с использованием метода проточной цитометрии для ранней диагностики донозологических состояний, ассоциированных с воздействием ванадия.

## Список литературы / References

1. Гринь С.А., Кузнецов П.В., Питак И.В. Влияние соединений ванадия на окружающую среду // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. 2012. № 6 (10). С. 9-12. [Grin S.A., Kuznetsov P.V., Pitak I.V. The effect of vanadium compounds on the environment. *Vostochno-Evropeyskiy zhurnal peredovykh tekhnologiy = East European Journal of Advanced Technology*, 2012, no. 6 (10), pp. 9-12. (In Russ.)]
2. Дианова Д.Г., Предеина Р.А., Пирогова Е.А. Оценка цитокинового статуса детей, проживающих в условиях хронического аэрогенного воздействия ванадия // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 17. С. 294-296. [Dianova D.G., Predeina R.A., Pirogova E.A. Assessment of the cytokine status of children living under conditions of chronic aerogenic exposure to vanadium. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 17, pp. 294-296. (In Russ.)]
3. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Особенности иммунологических и генетических нарушений человека в условиях дестабилизации среды обитания. Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2016. 300 с. [Zaitseva N.V., Dolgikh O.V., Dianova D.G. Features of immunological and genetic disorders in humans under conditions of destabilization of the environment]. Perm: Perm National Research Polytechnic University, 2016. 300 p.
4. Зайцева Н.В., Дианова Д.Г. Метод проточной цитометрии в диагностике нарушений показателей иммунной системы у детей, проживающих в условиях техногенной нагрузки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 2 (1). С. 60-61. [Zaitseva N.V., Dianova D.G. Flow cytometry method in the diagnosis of disorders of the immune system in children living under anthropogenic load. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 2 (1), pp. 60-61. (In Russ.)]

5. Зайцева Н.В., Ланин Д.В., Черешнев В.А. Иммунная и нейроэндокринная регуляция в условиях воздействия химических факторов различного генеза. Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2016. 236 с. [Zaitseva N.V., Lanin D.V., Chereshev V.A. Immune and neuroendocrine regulation under the influence of chemical factors of various origins]. Perm: Perm National Research Polytechnic University, 2016. 236 p.
6. Черешнев В.А., Гамбургцев А.Г. Экология, мониторинг и здоровье людей // Вестник РАН, 2017. Т. 87, № 2. С. 121-129. [Chereshev V.A., Gamburtsev A.G. Ecology, monitoring and human health. *Vestnik RAN = Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 2017, Vol. 87, no. 2, pp. 121-129. (In Russ.)]
7. Chasteen N.D., Lord E.M., Thompson H.J., Grady J.K. Vanadium complexes of transferrin and ferritin in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, Vol. 884, no. 1, pp. 84-92.
8. Engelhart S., Segal R.J. Allergic reaction to vanadium causes a diffuse eczematous eruption and titanium alloy orthopedic implant failure. *Cutis*, 2017, Vol. 99, no. 4, pp. 245-249.
9. Fallahi P., Foddis R., Elia G., Ragusa F., Patrizio A., Benvenga S., Cristaudo A., Antonelli A., Ferrari S.M. Vanadium pentoxide induces the secretion of CXCL9 and CXCL10 chemokines in thyroid cells. *Oncol. Rep.*, 2018, Vol. 39, no. 5, pp. 2422-2426.
10. Fraile B., Martinez-Onsurbe P., Olmedilla G., Paniagua R., Royuela M., Rodriguez-Berriguete G. MAP kinases and prostate cancer. *J. Signal Transduction*, 2012, Vol. 2012, 169170. doi: 10.1155/2012/169170.
11. Gioacchino M., Sabbioni E., Giampaolo L., Schiavone C., Sciascio M.B., Reale M., Verna N., Qiao N., Paganelli R., Conti P., Boscolo P. *In vitro* effects of vanadate on human immune functions. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 2002, Vol. 32, no. 2, pp. 147-154.
12. Kioseoglou E., Petanidis S., Gabriel G., Salifoglou A. The chemistry and biology of vanadium compounds in cancer therapeutics. *Coord. Chem. Rev.*, 2015, Vol. 301-302, pp. 87-105.
13. Kosta L., Byrne A.R., Dermelj M. Trace elements in some human milk samples by radiochemical neutron activation analysis. *Sci. Total Environ.*, 1983, Vol. 29, pp. 261-268.
14. Suma P.R.P., Padmanabhan R.A., Telukutla S.R., Ravindran R., Velikkakath A.K.G., Dekiwadia C.D., Paul W., Shenoy S.J., Laloraya M., Srinivasula S.M., Bhosale S.V., Jayasree R.S. Paradigm of vanadium pentoxide nanoparticle-induced autophagy and apoptosis in triple-negative breast cancer cells. bioRxiv preprint, 2019. Available at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/810200v1.full>.
15. Tsave O., Petanidis S., Kioseoglou E., Yavropoulou M.P., Yovos J.G., Anastakis D., Tsepa A., Salifoglou A. Role of vanadium in cellular and molecular immunology: association with immune-related inflammation and pharmacotoxicology mechanisms. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, Vol. 2016, 4013639. doi: 10.1155/2016/4013639.
16. Yang S., Xie C., Chen Y., Wang J., Chen X., Lu Z., June R., Zheng S. Differential roles of TNF $\alpha$ -TNFR1 and TNF $\alpha$ -TNFR2 in the differentiation and function of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> induced Treg cells *in vitro* and *in vivo* periphery in autoimmune diseases. *Cell Death Dis.*, 2019, Vol. 10, 27. doi: 10.1038/s41419-018-1266-6.

---

**Авторы:**

**Дианова Д.Г.** — д.м.н., доцент, старший научный сотрудник отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

**Долгих О.В.** — д.м.н., заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», г. Пермь, Россия

**Алексеев В.Б.** — д.м.н., директор ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Пермь, Россия

**Authors:**

**Dianova D.G.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Department of Immunobiological Methods of Diagnostics, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies; Associate Professor, Department of Pharmacology, Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russian Federation

**Dolgikh O.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Immunobiological Methods of Diagnostics, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies; Professor, Department of Human Ecology and Life Safety, Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

**Alekseev V.B.**, PhD, MD (Medicine), Director, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

---

Поступила 08.06.2020  
Принята к печати 06.07.2020

Received 08.06.2020  
Accepted 06.07.2020

# ОСОБЕННОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К ГАПТЕНАМ И ИММУННЫЙ СТАТУС У ОБУЧАЮЩИХСЯ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Долгих О.В., Дианова Д.Г.

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора, г. Пермь, Россия

**Резюме.** В последние десятилетия частота и распространенность аллергической патологии среди детского населения значительно увеличились. Цель исследования — изучить особенности специфической сенсibilизации к гаптенам и иммунный статус у школьников различных возрастных групп, в условиях высокой напряженности образовательного процесса. Перечень показателей специфической сенсibilизации к металлам и органическим соединениям изучен: у 67 детей первых классов и 35 детей 6-7 классов, обучающихся в школе с высокой напряженностью образовательного процесса и одновременно в условиях хронического воздействия экзогенных химических гаптенов (группа наблюдения № 1 и группа наблюдения № 2 соответственно); у 20 учеников начальных классов и 27 учеников 6-7 классов, обучающихся в условиях отсутствия избыточного воздействия негативных факторов (группа сравнения № 1 и группа сравнения № 2 соответственно). Определение иммуноглобулинов IgE специфического к марганцу, IgE специфического к никелю, IgE специфического к формальдегиду и IgG специфического к бензолу, IgG специфического к свинцу, IgG специфического к фенолу выполнено с использованием методологии аллергосорбентного тестирования; определение IL-4 (Th2) — методом иммуноферментного анализа; оценка уровня экспрессии CD19<sup>+</sup>-рецептора на лимфоцитах — методом проточной цитометрии. В работе использовался простой линейный регрессионный анализ. Для проверки нулевых гипотез о равенстве средних значений между двумя независимыми группами с нормальным распределением применялся двухвыборочный критерий Стьюдента.

Установлено, у школьников, обучающихся в условиях хронического поступления экзогенных гаптенов, степень специфической сенсibilизации меняется с возрастом. У обучающихся старших классов относительно учеников начальных классов значительно возрастает уровень специфической сенсibilизации к органическим соединениям (уровень IgG к фенолу — в 1,5 раза) с одновременным существенным ростом экспрессии Th2 цитокинов (IL-4 — в 1,8 раза) и активацией гуморального звена иммунитета (повышение процентного содержания CD19<sup>+</sup> лимфоцитов — в 1,3 раза). Установлена вероятностная причинно-следственная связь между содержанием в крови экзогенного гаптена фенола и повышением концентрации IgG специфического к фенолу ( $F = 140,81$ ;  $R^2 = 0,53$ ;  $p < 0,001$ ). Особенности специфической сенсibilизации к гаптенам у обучающихся в динамике образовательного

**Адрес для переписки:**

Долгих Олег Владимирович  
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора  
614045, Россия, г. Пермь, ул. Монастырская, 82.  
Тел.: 8 (342) 236-39-30.  
E-mail: oleg@fcrisk.ru

**Address for correspondence:**

Dolgikh Oleg V.  
Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation  
614045, Russian Federation, Perm, Monastyrskaya str., 82.  
Phone: 7 (342) 236-39-30.  
E-mail: oleg@fcrisk.ru

**Образец цитирования:**

О.В. Долгих, Д.Г. Дианова «Особенности специфической сенсibilизации к гаптенам и иммунный статус у обучающихся различных возрастных групп» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 209-216. doi: 10.46235/1028-7221-266-FOH  
© Долгих О.В., Дианова Д.Г., 2020

**For citation:**

O.V. Dolgikh, D.G. Dianova "Features of hapten specific sensitization and immune status in different student age groups", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 209-216. doi: 10.46235/1028-7221-266-FOH  
DOI: 10.46235/1028-7221-266-FOH

процесса является прогрессивный рост ее уровня, ассоциированный с возрастом обучающихся или временем гаптенной экспозиции.

*Ключевые слова:* иммунный статус школьников, специфическая сенсибилизация, иммуноглобулины, цитокины Th2, CD19<sup>+</sup> лимфоциты

## FEATURES OF HAPTEN SPECIFIC SENSITIZATION AND IMMUNE STATUS IN DIFFERENT STUDENT AGE GROUPS

Dolgikh O.V., Dianova D.G.

*Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation*

**Abstract.** In recent decades, the frequency and prevalence of allergic diseases among children have increased dramatically. The aim of the current study was to investigate features of hapten specific sensitization and immune status in different student age groups during high-intensity educational process. A number of parameters related to specific sensitization to metals and organic compounds were studied: 67 first grade children and 35 6-7 grade children attending school with a high-intensity educational process simultaneously chronically exposed to exogenous chemical haptens (the observation group No. 1 and observation group No. 2, respectively); in 20 primary school students and 27 6-7 grade students educated in the absence of excessive exposure to negative factors (the comparison group No. 1 and comparison group No. 2, respectively). Measurement of serum IgE immunoglobulins specific to manganese, IgE specific to nickel, formaldehyde as well as IgG specific to benzene, lead, phenol was carried out by using enzymeallergosorbent test; level IL-4 (Th2) was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay; level of CD19<sup>+</sup> receptor expression on lymphocytes was estimated by flow cytometry. A simple linear regression analysis was used to analyze the data. To test null hypotheses about equality of mean values between two independent groups with a normal distribution, a two-sample Student's t-test was used. It was found out that the degree of specific sensitization changed with age in students chronically exposed to exogenous haptens. The level of specific sensitization to organic compounds increases markedly in high school students vs. to primary school children (IgG level to phenol elevated by 1.5 times) paralleled with profoundly increased production of Th2 cytokines (IL-4 – by 1.8-fold) as well as activated humoral immunity (percentage of CD19<sup>+</sup> lymphocytes increased by 1.3-fold). Probable causative link was found between amount of serum exogenous phenol hapten and increased concentration of phenol-specific IgG ( $F = 140.81$ ;  $R^2 = 0.53$ ;  $p < 0.001$ ). Hapten-specific sensitization in school students increases progressively with age or duration of hapten exposure.

*Keywords:* immune status of schoolchildren, specific sensitization, immunoglobulins, Th2 cytokines, CD19<sup>+</sup> lymphocytes

Работа выполнена по теме из Плана НИР ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» «Научное обоснование индикаторных показателей клеточной регуляции и специфической чувствительности у детей в условиях суммарной экспозиции факторов риска» № гос. регистрации АААА-А19-119022190009-4.

### Введение

В последние десятилетия в результате загрязнения объектов окружающей среды низкомолекулярными химическими соединениями

(НМХС) отмечается рост распространенности аллергических болезней среди населения, в том числе детского [1, 2, 3, 5]. В различных субъектах Российской Федерации, согласно данным эпидемиологических исследований, от различных форм аллергической патологии страдает от 10 до 15% детского населения [1]. Сегодня идентифицировано более 80 химических веществ, которые могут выступать не только в роли аллергенов, но и, изменяя функциональную активность иммунной системы, создавать условия для формирования аллергического процесса [4, 9, 10]. Основой иммунологической дисфункции при воздействии химических аллергенов является дисбаланс

Th1/Th2 иммунного ответа, дегрануляция тучных клеток и базофилов, повышенная продукция антител [5]. При этом аллерген-специфические иммуноглобулины являются неотъемлемой частью патогенеза аллергических реакций. Очевидно, в связи с влиянием загрязнителей окружающей среды на уровень аллергической заболеваемости у детского населения, существует необходимость более широкого использования современных диагностических методологических подходов для идентификации классов концентрации аллергенов и раннего выявления степени чувствительности к низкомолекулярным химическим соединениям, что в дальнейшем будет иметь решающее значение для выбора превентивных профилактических мероприятий, адекватной терапии, оценки динамики заболевания и формирования прогноза.

**Цель исследования** – изучить особенности специфической сенсибилизации к низкомолекулярным химическим соединениям (гаптенам) и иммунного статуса у школьников различных классов, в условиях влияния на организм экзогенных химических факторов и высокой напряженности образовательного процесса.

## Материалы и методы

Исследование выполнено с соблюдением этических требований Хельсинкской декларации ВМА 2000 года и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 года. В ходе настоящего исследования изучен перечень показателей специфической сенсибилизации у 149 мальчиков с различной напряженностью образовательного процесса в условиях влияния на организм НМХС. Группу наблюдения № 1 составили 67 детей первых классов в возрасте 6-7 лет, а группу наблюдения № 2 – 35 мальчиков 6-7 классов в возрасте 12-13 лет. Дети обучаются в школе с высокой напряженностью образовательного процесса и одновременно в условиях хронического воздействия экзогенных химических гаптенов. Группу сравнения № 1 составили 20 детей начальных классов, а в группу сравнения № 2 – 27 учеников 6-7 классов, обучающихся в условиях отсутствия избыточного воздействия негативных факторов.

Содержание IgE специфического к марганцу, никелю, формальдегиду, а также содержание IgG специфического к бензолу, свинцу, фенолу проведено аллергосорбентным методом. Использован метод проточной цитометрии для оценки уровня экспрессии CD19<sup>+</sup>. С помощью метода

иммуноферментного анализа проведена оценка содержания цитокинов Th2 (IL-4).

Для прогноза изменения иммунологических ответов при экспозиции химических веществ, использовался простой линейный регрессионный анализ. Вклад независимых переменных в вариацию зависимых оценивался по коэффициенту детерминации ( $R^2$ ). Для описания данных, имеющих нормальное распределение, использовали среднее арифметическое значение ( $M$ ), стандартное отклонение ( $\sigma$ ) и 95%-ный доверительный интервал для среднего (95% CI). Для проверки нулевых гипотез о равенстве средних значений между двумя независимыми группами с нормальным распределением применялся двухвыборочный критерий Стьюдента. Сравнение выборочных данных с физиологической нормой выполнено с использованием одновыборочного критерия Вилкоксона. Уровень значимости, на котором проводилась проверка нулевых гипотез, принимался равным 0,05. Статистический анализ данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, США).

## Результаты и обсуждение

Оценка влияния НМХС на иммунный ответ показала, что у детей, обучающихся в школе с высокой напряженностью образовательного процесса и одновременно в условиях хронического воздействия экзогенных химических гаптенов, отмечаются признаки повышения специфической сенсибилизации. Установлено статистически значимое ( $p < 0,001$ ) повышение в сыворотке крови детей группы наблюдения №1 содержания IgE специфического к марганцу в 4,7 раза, никелю в 4,5 раза и формальдегиду в 9,5 раза по отношению к значениям, полученным у детей группы сравнения № 1 (табл. 1). Концентрация IgG специфического к бензолу в 2,3 раза, фенолу в 4,2 раз и свинцу в 4,4 раза у детей начальных классов, обучающихся в условиях влияния на организм внешнесредовых химических факторов, статистически значимо ( $p < 0,001$ ) превышает аналогичные показатели, выявленные у детей 1 классов, обучающихся в условиях отсутствия избыточного воздействия экзогенных гаптенов.

Статистически значимо ( $p < 0,001$ ) повышен уровень специфической сенсибилизации IgE к марганцу в 3,3 раза, к никелю в 4,1 раза и к формальдегиду в 10,5 раза у детей группы наблюдения № 2 (ученики 6-7 классов) по отношению к значениям, обнаруженным у детей группы сравнения № 2 (табл. 2). У школьников 6-7 классов, обучающихся в условиях хронического воздей-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ И ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ У ОБУЧАЮЩИХСЯ В ПЕРВЫХ КЛАССАХ

TABLE 1. INDICATORS OF SPECIFIC SENSITIZATION AND IMMUNOREGULATION OF STUDENTS IN THE FIRST GRADES

Наименование показателя Name of the indicator	ФН FN	Обозначение Designation	Группа наблюдения № 1 Observation group No. 1 n = 67	Группа сравнения № 1 Comparison group No. 1 n = 20	t	p
IgE специфический к марганцу, МЕ/см <sup>3</sup> IgE specific to manganese, ME/cm <sup>3</sup>	0-1,21	M±σ 95% ДИ 95% CI	0,228±0,050 0,220-0,240	0,049±0,009 0,040-0,060	3,52	< 0,001
IgE специфический к никелю, МЕ/см <sup>3</sup> IgE specific to nickel, ME/cm <sup>3</sup>	0-1,55	M±σ 95% ДИ 95% CI	0,224±0,030 0,220-0,240	0,050±0,010 0,040-0,060	5,50	< 0,001
IgE, специфический к формальдегиду, МЕ/см <sup>3</sup> IgE specific to formaldehyde, ME/cm <sup>3</sup>	0-1,50	M±σ 95% ДИ 95% CI	0,312±0,060 0,300-0,330	0,033±0,007 0,030-0,040	4,62	<0 ,001
IgG, специфический к бензолу, усл. ед. IgG specific to benzene, conv. units	0-0,15	M±σ 95% ДИ 95% CI	0,169±0,030 0,160-0,180	0,074±0,020 0,070-0,080	2,63	< 0,001
IgG, специфический к фенолу, усл. ед. IgG specific to phenol, conv. units	0-0,13	M±σ 95% ДИ 95% CI	0,266±0,020 0,260-0,270*	0,063±0,010 0,060-0,070	9,08	< 0,001
IgG, специфический к свинцу, усл. ед. IgG specific to lead, conv. units	0-0,10	M±σ 95% ДИ 95% CI	0,257±0,040 0,250-0,270*	0,059±0,010 0,050-0,600	4,80	< 0,001
CD19 <sup>+</sup> лимфоциты, % CD19 <sup>+</sup> lymphocytes, %	6-25	M±σ 95% ДИ 95% CI	11,35±1,09 11,09-11,61	13,00±1,75 12,23-13,77	0,80	0,425
IL-4, пг/см <sup>3</sup> IL-4, pg/cm <sup>3</sup>	0-4	M±σ 95% ДИ 95% CI	1,10±0,20 1,05-1,15	0,29±0,11 0,24-0,34	3,55	< 0,001

Примечание. ФН – физиологическая норма; \* – статистически значимые различия с ФН согласно одновыборочному критерию Вилкоксона, различия считаются статистически значимыми при p < 0,05; p – достоверность различий показателей между группой сравнения и группой наблюдения согласно t-критерию Стьюдента.

Note. FN, physiological norm; \*, statistically significant differences between FN according to the one-sample Wilcoxon test, the differences are considered reliable and statistically significant when p < 0.05; p – the reliability of differences between the comparison group and the observation group according to t-Student test.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ И ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ У ОБУЧАЮЩИХСЯ 6-7 КЛАССОВ

TABLE 2. INDICATORS OF SPECIFIC SENSITIZATION AND IMMUNOREGULATION IN STUDENTS IN GRADES 6-7

Наименование показателя Name of the indicator	ФН FN	Обозначение Designation	Группа наблюдения № 2 Observation group No. 2 n = 35	Группа сравнения № 2 Comparison group No. 2 n = 27	t	p
IgE специфический к марганцу, МЕ/см <sup>3</sup> IgE specific to manganese, ME/cm <sup>3</sup>	0-1,21	M±σ 95% ДИ 95% CI	0,174±0,020 0,170-0,180	0,053±0,009 0,050-0,060	5,52	< 0,001
IgE специфический к никелю, МЕ/см <sup>3</sup> IgE specific to nickel, ME/cm <sup>3</sup>	0-1,55	M±σ 95% ДИ 95% CI	0,198±0,020 0,190-0,200	0,049±0,009 0,049-0,051	6,79	< 0,001
IgE, специфический к формальдегиду, МЕ/см <sup>3</sup> IgE specific to formaldehyde, ME/cm <sup>3</sup>	0-1,50	M±σ 95% ДИ 95% CI	0,327±0,050 0,310-0,340	0,031±0,006 0,030-0,031	5,88	< 0,001
IgG, специфический к бензолу, усл. ед. IgG specific to benzene, conv. units	0-0,15	M±σ 95% ДИ 95% CI	0,173±0,020 0,160-0,180	0,075±0,010 0,070-0,080	3,53	0,001
IgG, специфический к фенолу, усл. ед. IgG specific to phenol, conv. units	0-0,13	M±σ 95% ДИ 95% CI	0,323±0,020 0,320-0,330* **	0,051±0,010 0,050-0,054	12,2	< 0,001
IgG, специфический к свинцу, усл. ед. IgG specific to lead, conv. units	0-0,10	M±σ 95% ДИ 95% CI	0,264±0,040 0,250-0,280*	0,059±0,010 0,058-0,060	4,97	< 0,001
CD19 <sup>+</sup> лимфоциты, % CD19 <sup>+</sup> lymphocytes, %	6-25	M±σ 95% ДИ 95% CI	14,52±1,05 14,17-14,87**	12,00±1,05 11,60-12,40	1,70	0,094
IL-4, пг/см <sup>3</sup> IL-4, pg/cm <sup>3</sup>	0-4	M±σ 95% ДИ 95% CI	2,00±0,40 1,87-2,13**	0,33±0,29 0,22-0,44	3,38	0,001

Примечание. \*\* – статистически значимые различия с группой наблюдения № 1 согласно t-критерию Стьюдента, различия считаются достоверными и статистически значимыми при p < 0,05.

Note. \*\*, statistically significant differences with observation group No. 1 according to Student t-test, the differences are considered significant and statistically significant when p < 0.05.

ствия химических факторов, статистически значимо ( $p < 0,001$ ) повышена концентрация специфического IgG к бензолу в 2,3 раза, к фенолу в 6,3 раза, к свинцу в 4,5 раза в сравнении с результатами, полученными у учеников 6-7 классов, обучающихся в условиях отсутствия избыточного воздействия негативных химических факторов.

Выраженное повышение (до 2,5 раз) относительно физиологической нормы IgG специфического к бензолу, IgG специфического к фенолу, IgG специфического к свинцу и IgE специфический к марганцу у детей группы наблюдения № 1 (ученики начальных классов) отмечено в 54, 65, 78 и 42% проб сыворотки соответственно. У детей группы наблюдения № 2 (ученики 6-7 классов) доля проб сыворотки крови со значительным превышением (до 2,6 раз) уровня IgG специфического к бензолу, IgG специфического к фенолу и IgG специфического к свинцу по сравнению с физиологической нормой составила 48, 66 и 73% соответственно. Установлено статистически значимое ( $p < 0,050$ ) повышение концентрации антител класса G к фенол- и свинецсодержащим аддуктам у обследуемых в группе наблюдения № 1 и группе наблюдения № 2 по отношению к референтному интервалу. Выявлено, что по отношению к ученикам начальных классов (группа наблюдения № 1) у обучающихся 6-7 классов (группа наблюдения № 2) статистически значимо ( $t = 2,02$ ,  $p = 0,046$ ) повышен в 1,2 раза уровень специфической сенсibilизации по критерию IgG специфический к фенолу.

Результаты изучения показателей гуморального звена иммунной системы выявили, что у учеников 6-7 классов, которые обучаются в школе с высокой напряженностью образовательного процесса и одновременно в условиях хронического воздействия экзогенных химических гаптен, процентное содержание В-лимфоцитов статистически значимо ( $t = 2,09$ ,  $p = 0,038$ ) в 1,3 раза превышает аналогичный показатель, установленный у детей первых классов, обучающихся в условиях избыточного воздействия негативных химических факторов. Оценка цитокинового профиля продемонстрировала, что у детей группы наблюдения № 1 и группы наблюдения № 2 статистически значимо ( $p < 0,001$ ) в 3,8 раза и 6,1 раза соответственно повышена экспрессия Th2-ассоциированного цитокина интерлейкина 4 по сравнению с результатами, полученными у детей соответствующих групп сравнения. Обнаружено, что у школьников старших классов (группа наблюдения № 2) статистически значимо ( $t = 2,01$ ,  $p = 0,046$ ) в 1,8 раза повышена экспрессии IL-4

относительно значений, зафиксированных у обучающихся начальных классов этой же школы (группа наблюдения № 1).

Результаты математического моделирования с использованием методического приёма оценки отношения шансов изменения иммунологических тестов при возрастании концентрации экзогенных гаптен фенола и свинца в крови позволили установить статистически значимую вероятностную зависимость повышения концентрации IgG специфического к фенолу ( $a_0 = -0,556$ ;  $a_1 = 78,797$ ;  $F = 140,81$ ;  $R^2 = 0,53$ ;  $p < 0,001$ ) и IgG специфического к свинцу ( $a_0 = -0,350$ ;  $a_1 = 44,915$ ;  $F = 141,58$ ;  $R = 0,70$ ;  $p < 0,001$ ) соответственно.

Представленные результаты верифицируют ожидаемый нарастающий с возрастом иммунный дисбаланс у детей, обучающихся в школе с высокой напряженностью образовательного процесса и одновременно в условиях хронического воздействия экзогенных химических гаптен. Особенностью иммунного ответа у школьников, скомпрометированных избыточностью воздействующих экзогенных гаптен, является повышенная экспрессия специфических антител IgE-класса (реагинов) и специфических IgG-антител, гиперпродукция Th2-цитокинов в ответ на экспозицию НМХС.

К факторам, обуславливающим формирование специфической сенсibilизации, следует отнести особенности индивидуальной чувствительности к средовым факторам в зависимости от наследственных особенностей, условия проживания, в том числе бытовые условия, компонентный состав потребляемых пищевых продуктов и др. [1, 5]. Повышенная специфическая сенсibilизация к низкомолекулярным химическим соединениям (гаптенам), которая формируется у детей с первых классов (с учетом феномена аддитивности, связанного с повышенными интенсивностью и напряжением образовательного процесса), способствует в дальнейшем развитию различных форм сенсibilизации и формированию аллергической патологии. Ксенобиотики разной химической структуры (металлы и органические соединения), являющиеся гаптенами, потенциально способны оказывать разнообразные биологические эффекты, в том числе и изменять функциональную активность иммунной системы [2, 4, 8].

Th2-девиация иммунного ответа в условиях воздействия химических аллергенов ведет к предрасположенности развития заболеваний, характеризующихся IgE-сенсibilизацией и воспалительными процессами под воздействием

IL-4 [2, 3]. Важно отметить, что IgE имеет короткий период полураспада в плазме, менее одного дня. Однако IgE, связанный с FcεRI-рецептором на тучной клетке, находится в тканях в течение нескольких недель или месяцев [7]. Полагают, что особенности строения Fc-фрагмента позволяет молекуле IgE взаимодействовать с ее высокоаффинным FcεRI-рецептором на тучных клетках и низкоаффинным FcεRII-рецептором (CD23) на В-лимфоцитах. Кроме того, молекула IgE содержит значительное число сайтов N-гликозилирования, что необходимо для более прочного связывания с FcεRI-рецепторами [10]. Рецепторами для иммуноглобулина G являются CD16, CD32, CD64. Ранее предполагали, что CD23 также относится к рецепторам для IgG, однако на современном этапе медико-биологических наук данный факт не нашел доказательств [6]. IgG, обеспечивающий связь клеточного и гуморального иммунитета, в сыворотке крови увеличивается с возрастом. Показано, что IgG в детском возрасте имеет низкую аффинность [8]. IL-4 не только опосредует индукцию Th2-ответа и переключение иммунного ответа на синтез IgE, но также обуславливает экспрессию FcεRII-рецептора на макрофагах, эозинофилах и тромбоцитах [7]. Гиперпродукция IL-4 ингибирует активность Th1-лимфоцитов, опосредует расширение процессинга антигенов (гаптенов). Результатами нашего исследования подтвержден феномен образования избыточного количества специфических антител в условиях сочетанного воздействия гаптенной аэрогенной экспозиции и высокой интенсивности образовательного процесса в начальной и средней школе.

Таким образом, у детей, обучающихся в условиях устойчивого воздействия экзогенных химических факторов, сочетающихся с повышенной интенсивностью напряженностью образовательного процесса в школе, специфическая сенсибилизация к гаптенам меняется с возрастом. Так, у учеников 6-7 классов специфическая сенсибилизация к металлам (марганец, никель) имеет тенденцию к снижению, между тем концентрация антител к органическим соединениям (фенол) возрастает по сравнению с уровнем специфической сенсибилизации у обучающихся начальных классов в данной школе. Характеризуя цитокиновый профиль сыворотки, следует отметить, что из всех обучающихся в условиях влияния на организм химических гаптенов, экспрессия цитокинов Th2 (IL-4) максимально представлена у школьников 6-7 классов.

## Заключение

В условиях хронического воздействия низкомолекулярных химических соединений (гаптенов) у школьников 6-7 классов относительно учеников начальных классов статистически значимо ( $p < 0,001$ ) возрастает (до 20%) уровень специфической сенсибилизации к органическим соединениям (фенол). Хроническое воздействие на организм обследуемых детей низких доз экзогенных химических гаптенов формирует Th2-смещение цитокинового профиля, при этом максимальные значения IL4 идентифицированы у школьников 6-7 классов, уровень экспрессии данного цитокина статистически значимо ( $p < 0,001$ ) (до 80%) превышал значения, полученные у учеников начальных классов данной школы.

## Список литературы / References

1. Балаболкин И.И., Терлецкая Р.Н., Модестов А.А. Аллергическая заболеваемость детей в современных экологических условиях // Сибирское медицинское обозрение, 2015. № 1. С. 63-67. [Balabolkin I.I., Terletskaia R.N., Modestov A.A. Allergic incidence of children in modern environmental conditions. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2015, no. 1, pp. 63-67. (In Russ.)]
2. Дианова Д.Г., Предеина Р.А., Пирогова Е.А. Оценка цитокинового статуса детей, проживающих в условиях хронического аэрогенного воздействия ванадия // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 294-296. [Dianova D.G., Predeina R.A., Pirogova E.A. Assessment of the cytokine status of children living under conditions of chronic aerogenic exposure to vanadium. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 3, pp. 294-296. (In Russ.)]
3. Долгих О.В., Отавина Е.А., Аликина И.Н., Казакова О.А., Жданова-Заплесвичко И.Г., Гусельников М.А. Особенности иммунорегуляторных показателей у детей, проживающих в условиях аэрогенной экспозиции алюминием // Гигиена и санитария, 2018. Т. 97, № 1. С. 81-84. [Dolgikh O.V., Otavina E.A., Alikina I.N., Kazakova O.A., Zhdanova-Zaplesvichko I.G., Guselnikov M.A. Features of immunoregulatory parameters in children living under conditions of aerogenic exposure to aluminum. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2018, Vol. 97, no. 1, pp. 81-84. (In Russ.)]
4. Arts J. How to assess respiratory sensitization of low molecular weight chemicals? *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 2020, Vol. 225, 113469. doi: 10.1016/j.ijheh.2020.113469.

5. Chary A., Hennen J., Klein S.G., Serchi T., Gutleb A.C., Blömeke B. Respiratory sensitization: toxicological point of view on the available assays. *Arch. Toxicol.*, 2018, Vol. 92, no. 2, pp. 803-822.
6. de Taeye S.W., Rispens T., Vidarsson G. The ligands for human IgG and their effector functions. *Antibodies*, 2019, Vol. 8, no. 2, 30. DOI: 10.3390/antib8020030.
7. Godwin L., Crane J.S. Biochemistry, Immunoglobulin E (IgE). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (Florida): StatPearls Publishing; 2020.
8. Nassar M.Y.H., Salah M.M., Al-Shamahy H.A.A., Al-Magrami R.T.F., Al-Moyed K.A. Immunoglobulin levels (IgG, IgM and IgA): normal values for healthy infants and children in Sana'a City Yemen. *GJPNC*, 2019, Vol. 1, no. 5. doi: 10.33552/GJPNC.2019.01.000525.
9. North C.M., Ezendam J., Hotchkiss J.A., Maier C., Aoyama K., Enoch S., Goetz A., Graham C., Kimber I., Karjalainen A., Pauluhn J., Roggen E.L., Selgrade M., Tarlo S.M., Chen C.L. Developing a framework for assessing respiratory sensitization: A workshop report. *Regul. Toxicol. Pharm.*, 2016. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.06.006.
10. Sullivan K.M., Enoch S.J., Ezendam J., Sewald K., Roggen E.L., Cochrane S. An adverse outcome pathway for sensitization of the respiratory tract by low-molecular-weight chemicals: building evidence to support the utility of *in vitro* and *in silico* methods in a regulatory context. *Appl. In Vitro Toxicol.*, 2017, Vol. 3, no. 3, pp. 213-226.

---

**Авторы:**

**Долгих О.В.** — д.м.н., заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора, г. Пермь, Россия

**Дианова Д.Г.** — д.м.н., старший научный сотрудник отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора, г. Пермь, Россия

---

**Authors:**

**Dolgikh O.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Immunobiological Methods of Diagnostics, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

**Dianova D.G.**, PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Immunobiological Methods of Diagnostics, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

---

Поступила 03.06.2020  
Принята к печати 01.08.2020

---

Received 03.06.2020  
Accepted 01.08.2020

## ХАРАКТЕРИСТИКА СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К ИНГАЛЯЦИОННЫМ И ПИЩЕВЫМ АЛЛЕРГЕНАМ У ДЕТЕЙ

Емелина Ю.Н.

ГАУЗ СО «Свердловская областная детская клиническая больница», г. Екатеринбург, Россия

**Резюме.** Проведен ретроспективный анализ сенсibilизации, выявленной при проведении кожного тестирования у детей в возрасте 3-17 лет, обратившихся на прием к аллергологам в течение года. Достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) положительные результаты выявлялись при проведении исследований с бытовыми (70,2%), пищевыми (72,7%) и пыльцевыми аллергенами (67,9%) в сравнении с группой эпидермальных аллергенов (58,6%). В группе ингаляционных аллергенов чаще других выявлялась сенсibilизация к домашней (43,6%) и библиотечной пыли (25,7%), шерсти морской свинки (22,6%), шерсти кошки (21,8%), перхоти лошади (19,6%), шерсти овцы (16,8%), а также к пыльце деревьев (82,4%), луговых (64,0%) и сорных трав (64,1%).

В группе пищевых аллергенов при проведении кожных тестов наиболее часто выявлялась сенсibilизация к куриному яйцу, рыбе, молоку и курице. Среди пищевых злаков наиболее часто положительные реакции отмечались на пшеницу (9,9%) и ячменную крупу (9,1%) в сравнении с овсяной крупой (4,4%), ржаной мукой (5,0%) и гречей (5,6%).

При оценке результатов во всех группах аллергенов наиболее часто фиксировалась слабopоложительная реакция с диаметром волдыря 2-3 мм. Частота выявления положительных результатов на все группы аллергенов значимо менялась в разные календарные месяцы и в зависимости от серии используемого аллергена. Выраженность волдырных реакций достоверно не различалась у детей с аллергическими заболеваниями и детей из группы риска по формированию аллергопатологии.

*Ключевые слова:* сенсibilизация, аллергены, кожные тесты, дети

## SENSITIZATION TO INHALED AND FOOD ALLERGENS IN CHILDREN

Emelina Yu.N.

Sverdlovsk Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** A retrospective analysis of the annual allergen sensitization detected during skin testing in children aged 3-17 years was performed. Significant positive data were more frequently ( $p < 0.01$ ) detected after testing for indoor (70.2%), food (72.7%) and pollen allergens (67.9%) compared to epidermal allergens (58.6%). Sensitization to house dust (43.6%) and library dust (25.7%), guinea pig hair (22.6%), cat hair (21.8%), horse dandruff (19.6%), sheep wool (16.8%), as well as pollen of trees (82.4%), meadow grasses (64.0%) and weeds (64.1%) was most common in group of inhaled allergens.

Skin testing in the group of food allergens revealed that children were more sensitized to chicken eggs, fish, milk, chicken and wheat. Among food cereals, peak percentage of positive reactions was observed for wheat (9.9%) and barley groats (9.1%) compared to oatmeal (4.4%), rye flour (5.0%) and buckwheat (5.6%).

### Адрес для переписки:

Емелина Юлия Николаевна  
ГАУЗ СО «Свердловская областная детская клиническая  
больница»  
620149, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, 32.  
Тел.: 8 (963) 270-76-16.  
E-mail: eyun75@mail.ru

### Address for correspondence:

Emelina Yulia N.  
Sverdlovsk Regional Children's Clinical Hospital  
620149, Russian Federation, Yekaterinburg,  
S. Deryabina str., 32.  
Phone: 7 (963) 270-76-16.  
E-mail: eyun75@mail.ru

### Образец цитирования:

Ю.Н. Емелина «Характеристика сенсibilизации  
к ингаляционным и пищевым аллергенам у детей»  
// Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23,  
№ 2. С. 217-224.  
doi: 10.46235/1028-7221-262-STI  
© Емелина Ю.Н., 2020

### For citation:

Yu.N. Emelina "Sensitization to inhaled and food allergens  
in children", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23,  
no. 2, pp. 217-224.  
doi: 10.46235/1028-7221-262-STI  
DOI: 10.46235/1028-7221-262-STI

While assessing the data in all allergen groups it was found that low positive reaction with 2-3 mm blister in diameter was most common. The frequency of detected positive data for all allergen groups varied markedly on different calendar months and also depended on allergen preparation batch. Intensity of reactions did not significantly differ in children with allergic diseases vs. those at risk of developing allergopathology.

*Keywords: sensitization, allergens, skin tests, children*

## Введение

С увеличением роста аллергических заболеваний кожи и органов дыхания у детей возрастает значимость специфической диагностики с целью разработки персонализированных превентивных мероприятий для профилактики развития атопического марша с одной стороны и достижения лучшего контроля над симптомами имеющейся аллергопатологии с другой [1, 2, 3, 5, 7]. Также проведение специфической аллергодиагностики является необходимым этапом перед назначением лечебной элиминационной диеты у детей с проявлениями пищевой аллергии и при выборе препарата для иммунотерапии при наличии аллергических болезней кожи и органов дыхания [1, 2].

В рутинной практике аллергологов наиболее доступно кожное тестирование, проводимое методом прик-тестов или скарификационных кожных проб, и являющееся стандартом диагностики сенсibilизации [1, 2]. При этом характер сенсibilизации различается в разных странах и климатогеографических зонах, а также зависит от экологических факторов и особенностей образа жизни населения [5, 6, 7, 8, 10]. Поэтому понимание региональных особенностей сенсibilизации необходимо для разработки профилактических и лечебных мероприятий у детей.

**Цель исследования** — оценить особенности сенсibilизации, выявляемой по результатам скарификационных кожных проб у детей, проживающих на территории Свердловской области.

## Материалы и методы

Был проведен ретроспективный анализ сенсibilизации у детей в возрасте 3-17 лет, обратившихся на консультативный прием к аллергологам-иммунологам в ГАУЗ СО «СОДКБ 1» в 2019 году.

Скарификационные кожные пробы (СКП) с бытовыми, эпидермальными, пищевыми и пылевыми аллергенами проводились по стандартной методике, рекомендованной производителем, с аллергенами производства Ставропольского института вакцин и сывороток, стандартизированными по содержанию единиц белкового азота (PNU). Положительный результат оценивался при появлении волдыря (папулы) через 20 минут после нанесения аллергена, выраженность волдырной реакции фиксировалась в журнале учета СКП. Оценку полученных результатов проводили в соответствии с инструк-

цией по применению аллергенов. Результат «+» фиксировался при выявлении папулы (волдыря) диаметром 2-3 мм, «++» — при визуализации волдыря диаметром 4-5 мм, «+++» — при определении волдыря диаметром 6-10 мм и «++++» — при диаметре папулы > 10 мм.

В ходе проведения ретроспективного анализа подсчитывали абсолютное и относительное количество выявленных положительных результатов, при сравнении показателей для оценки достоверности различий использовали параметрический критерий Стьюдента, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты

При анализе нозологической структуры пациентов, обратившихся на консультативный прием к аллергологам-иммунологам и нуждающихся в проведении СКП, было отмечено, что более половины пациентов (68,4%) уже имели проявления респираторной аллергии в виде аллергического ринита (круглогодичного — 11,0% или сезонного — 12,4%) и бронхиальной астмы (45,0%). Данная категория пациентов требовала проведения специфического аллергологического обследования для выявления причинно-значимых аллергенов, последующего проведения элиминационных мероприятий и решения вопроса об аллерген-специфической иммунотерапии, а также разработки комплекса профилактических мероприятий, направленных на снижение риска новых обострений и возможного утяжеления проявлений имеющегося аллергического заболевания.

Также в нозологической структуре достаточно большую часть составили дети, относящиеся к группе риска по формированию аллергических болезней органов дыхания (АБОД):

- дети с проявлениями рецидивирующего бронхита с бронхо-обструктивным синдромом (6,3%);
- дети с рецидивирующим ларинготрахеитом и гиперреактивностью дыхательных путей (14,7%);
- дети с атопическим дерматитом и пищевой аллергией (7,1%);
- а также дети с проявлениями транзиторной иммунной недостаточности (3,5%).

Эта группа детей нуждалась в проведении специфической диагностики для выявления возможных причинно-значимых аллергенов с целью снижения аллергенной нагрузки в окружении пациента и минимизации риска формирования АБОД.

При проведении СКП с бытовыми аллергенами (табл. 1) положительные результаты выявлялись у 70,2% детей, достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) волдырная реакция отмечалась на домашнюю (43,6%) и библиотечную (25,7%) пыль в сравнении с пухом/пером (17,4 %) и клещом домашней пыли (19,2%).

При проведении кожных тестов с эпидермальными аллергенами положительные результаты определялись у 58,6% детей. При этом достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) выявлялась сенсибилизация к шерсти морской свинки (22,6%), шерсти кошки (21,8%), перхоти лошади (19,6%) и шерсти овцы (16,8%) в сравнении с шерстью собаки (9,9%), волосом человека (5,6%), шерстью кролика (11,9%) и дафниями (11,1%).

При проведении СКП с пищевыми аллергенами положительный результат выявлялся у 72,7% детей (табл. 1), достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) выявлялась сенсибилизация к белку куриного яйца (18,1%), хеку (13,7%), молоку (13,1%) и кукурузе (13,0%). При анализе частоты выявления положительных реакций на пищевые злаки было отмечено, что наиболее часто определялась реакция на пшеницу (9,9%) и ячменную крупу (9,1%) в сравнении с овсяной крупой (4,4%), ржаной мукой (5,0%) и гречей (5,6%).

Положительные результаты при проведении кожных тестов с пыльцевыми аллергенами отмечались у 67,9% обследованных детей, достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) выявлялась сенсибилизация к пыльце деревьев (82,4%) в сравнении с пыльцой луговых (64,0%) и сорных (64,1%) трав.

Таким образом, частота выявления сенсибилизации при проведении скарификационных кожных проб составила 58,6-72,7% в зависимости от группы исследуемых аллергенов. Достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) положительные результаты выявлялись при проведении исследований с бытовыми (70,2%), пищевыми (72,7%) и пыльцевыми аллергенами (67,9%) в сравнении с группой эпидермальных аллергенов (58,6%).

Следует отметить, что при проведении СКП с бытовыми и эпидермальными аллергенами чаще других выявлялась слабоположительная реакция, что соответствовало диаметру папулы 2-3 мм (табл. 2).

Частота выявления положительных реакций (++) с диаметром волдыря 4-5 мм в группе бытовых аллергенов варьировала от 1,5 % (с аллергеном пуха/пера) до 7,6% (с аллергеном домашней пыли), резко положительных реакций с папулой 6-10 мм (++++) – от 0,3% (с аллергеном библиотечной пыли) до 3,3% (с аллергеном домашней пыли). В группе эпидермальных аллергенов частота выявления положительных реакций составила от 0,6% (на шерсть кролика) до 5,2% (на шерсть кошки), резко положительных (++++) – от 0,1% (на шерсть собаки и волос человека) до 2,8% (на перхоть лошади). Очень резко положительных реакций (++++) с диаметром папулы

> 10 мм при проведении СКП с группой бытовых и эпидермальных аллергенов не выявлялось.

На все пищевые аллергены за исключением гречи достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) выявлялась слабоположительная реакция, что соответствовало диаметру папулы 2-3 мм. Частота выявления положительной реакции (++) с диаметром папулы 4-5 мм варьировала от 0,3% (на треску, ржаную муку, овсяную крупу и говядину) до 2,4% (на белок куриного яйца), и соответственно еще реже фиксировались резко положительные результаты (+++) с волдырной реакцией 6-10 мм – от 0 до 2,1% (на хек). Очень резко положительных реакций (++++) с диаметром волдыря > 10 мм при проведении кожных проб с пищевыми аллергенами не отмечалось.

При проведении кожного тестирования с пыльцой деревьев, луговых и сорных трав достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) выявлялись слабоположительные реакции – 49,7, 44,0 и 37,8% соответственно (табл. 2). При этом частота выявления положительных (++) и резко положительных (++++) реакций в группе пыльцевых аллергенов была выше, чем в других группах аллергенов. Частота выявления положительных реакций на пыльцу деревьев, луговых и сорных трав составила соответственно 16,3, 11,0 и 9,9%, резко положительных реакций – 7,6, 4,5 и 4,0% и очень резко положительных реакций – 4,8, 3,9 и 4,0% соответственно.

Необходимо отметить, что частота выявления положительных реакций на все группы аллергенов значимо менялась в разные календарные месяцы и в зависимости от серии используемого аллергена, выраженность волдырных реакций достоверно не различалась у детей с имеющимися аллергическими заболеваниями и детей из группы риска по формированию аллергопатологии, что соответствует литературным данным [1, 2, 9].

## Обсуждение

В ходе проведения ретроспективного анализа отмечена различная частота выявляемой сенсибилизации при проведении скарификационных кожных проб с разными группами аллергенов. Достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) положительные результаты выявлялись при проведении исследований с бытовыми (70,2%), пищевыми (72,7%) и пыльцевыми аллергенами (67,9%) в сравнении с группой эпидермальных аллергенов (58,6%), что соответствует данным других авторов [4, 6, 8].

В группе ингаляционных аллергенов наиболее часто выявлялась сенсибилизация к домашней и библиотечной пыли, шерсти морской свинки, шерсти кошки, перхоти лошади, шерсти овцы, а также к пыльце деревьев и трав, что не противоречит данным других исследований, представленным в литературе [4, 6, 8].

В группе пищевых аллергенов при проведении кожного тестирования наиболее часто выявля-

**ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА ВЫЯВЛЯЕМОСТИ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОЖНЫХ ТЕСТОВ С БЫТОВЫМИ, ЭПИДЕРМАЛЬНЫМИ, ПИЩЕВЫМИ И ПЫЛЬЦЕВЫМИ АЛЛЕРГЕНАМИ (АБСОЛЮТНОЕ ЧИСЛО, %)**

TABLE 1. SENSITIVITY RATE OF SENSITIZATION DURING SKIN TESTS WITH HOUSEHOLD, EPIDERMAL, FOOD AND POLLEN ALLERGENS (ABSOLUTE NUMBER, %)

Вид аллергена Kind of allergen	«+» результаты Positive results	
<b>Бытовые аллергены</b> Household allergens n = 2830	<b>абс.</b> abs.	<b>%</b>
<b>всего «+» результатов n = 1985, из них:</b> total positive results n = 1985, among them:	1985	70,2*
<b>с домашней пылью</b> with house dust	865	43,6 <sup>1</sup>
<b>с пухом/пером</b> with down/feather	345	17,4
<b>с библиотечной пылью</b> with library dust	509	25,7 <sup>2</sup>
<b>с клещом домашней пыли</b> with a house dust mite	380	19,2
<b>Примечание. <sup>1</sup> – p &lt; 0,01 в сравнении с пухом/пером, библиотечной пылью и клещом домашней пыли, <sup>2</sup> – p &lt; 0,01 в сравнении с пухом/пером и клещом домашней пыли</b> Note. <sup>1</sup> , p < 0.01 compared to down/feather, library dust and house dust mite; <sup>2</sup> , p < 0.01 compared to down/feather and house dust mite		
<b>Эпидермальные аллергены</b> Epidermal allergens n = 2393	<b>абс.</b> abs.	<b>%</b>
<b>всего «+» результатов n = 1401, из них:</b> total positive results n = 1401, among them:	1401	58,6
<b>с перхотью лошади</b> with horse dandruff	274	19,6 <sup>1</sup>
<b>с шерстью кошки</b> with cat hair	305	21,8 <sup>1</sup>
<b>с шерстью собаки</b> with dog hair	138	9,9 <sup>2</sup>
<b>с волосом человека</b> with human hair	79	5,6
<b>с шерстью овцы</b> with sheep's hair	235	16,8 <sup>1</sup>
<b>с шерстью кролика</b> with rabbit fur	167	11,9 <sup>2</sup>
<b>с шерстью морской свинки</b> with guinea pig hair	317	22,6 <sup>1</sup>
<b>с дафниями</b> with daphnia	155	11,1 <sup>2</sup>
<b>Примечание. <sup>1</sup> – p &lt; 0,01 в сравнении с шерстью собаки, волосом человека, шерстью кролика и дафниями, <sup>2</sup> – p &lt; 0,01 в сравнении с волосом человека</b> Note. <sup>1</sup> , p < 0.01 compared to dog hair, human hair, rabbit hair and daphnia; <sup>2</sup> , p < 0.01 in comparison with human hair		
<b>Пищевые аллергены</b> Food allergens n = 965	<b>абс.</b> abs.	<b>%</b>
<b>всего «+» результатов n = 701, из них:</b> total positive results n = 701, among them:	701	72,7*
<b>с треской</b> with cod	72	10,3 <sup>4, 5</sup>

Таблица 1 (окончание)  
Table 1 (continued)

Пищевые аллергены Food allergens n = 965	абс. abs.	%
с хеком with hake	96	13,7 <sup>1,2</sup>
с белком куриного яйца with protein of chicken eggs	127	18,1 <sup>1,3</sup>
с желтком куриного яйца with yolk of chicken eggs	86	12,3 <sup>2</sup>
с молоком with milk	92	13,1 <sup>1,2</sup>
с пшеницей with wheat	69	9,9 <sup>4,5</sup>
с ржаной мукой with rye flour	35	5,0
с овсяной крупой with oatmeal	31	4,4
с гречей with buckwheat	39	5,6
с рисом with rice	57	8,1
с ячменной крупой with barley grits	64	9,1 <sup>4,5</sup>
с курой with chicken	91	13,0 <sup>1,2</sup>
с говядиной with beef	63	9,0 <sup>4,5</sup>
со свиной with pork	49	7,0
с цитрусовыми with citrus	59	8,4
Примечание. <sup>1</sup> – p < 0,01 в сравнении с ржаной мукой, овсяной крупой, гречей, рисом, свиной, <sup>2</sup> – p < 0,05 в сравнении с говядиной, ячменной крупой, <sup>3</sup> – p < 0,01 в сравнении с треской, желтком куриного яйца, пшеницей, ячменной крупой, говядиной и цитрусовыми, <sup>4</sup> – p < 0,01 в сравнении с овсяной крупой и ржаной мукой, <sup>5</sup> – p < 0,05 в сравнении с гречей Note. <sup>1</sup> , p < 0.01 in comparison with rye flour, oatmeal, buckwheat, rice, pork; <sup>2</sup> , p < 0.05 in comparison to beef, barley grits; <sup>3</sup> , p < 0.01 in comparison to cod, yolk of chicken eggs, wheat, barley, beef and citrus; <sup>4</sup> , p < 0.01 in comparison to oatmeal and rye flour; <sup>5</sup> , p < 0.05 in comparison to buckwheat		
Пыльцевые аллергены Pollen allergens n = 1952	абс. abs.	%
всего «+» результатов n = 1326, из них: total positive results n = 1326, among them:	1326	67,9*
с пылью деревьев with pollen of trees	1092	82,4 <sup>1</sup>
с пылью луговых трав with pollen of meadow grasses	849	64,0
с пылью сорных трав with pollen of weeds	850	64,1
Примечание. <sup>1</sup> – p < 0,01 в сравнении с пылью луговых и сорных трав, * – p < 0,01 в сравнении с группой эпидермальных аллергенов Note. <sup>1</sup> , p < 0.01 in comparison with pollen of meadow and weed grasses; *, p < 0.01 in comparison with a group of epidermal allergens.		

Примечание. p – достоверность различий между показателями рассчитана согласно параметрического критерия Стьюдента, различия считали достоверными и статистически значимыми при p < 0,05.

Note. p, significance of differences between indicators is calculated according to the parametric Student's criterion, the differences are considered reliable and statistically significant when p < 0.05.

**ТАБЛИЦА 2. ВЫРАЖЕННОСТЬ ВОЛДЫРНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОЖНЫХ ТЕСТОВ С БЫТОВЫМИ, ЭПИДЕРМАЛЬНЫМИ, ПИЩЕВЫМИ И ПЫЛЬЦЕВЫМИ АЛЛЕРГЕНАМИ (АБСОЛЮТНОЕ ЧИСЛО, %)**

TABLE 2. SEVERITY OF THE BLISTERING REACTION DURING SKIN TESTS WITH HOUSEHOLD, EPIDERMAL, FOOD AND POLLEN ALLERGENS (ABSOLUTE NUMBER, %)

Вид аллергена Kind of allergen	Выраженность волдырной реакции Severity of blister reaction							
	+		++		+++		++++	
Бытовые аллергены Household allergens всего «+» результатов n = 1985, из них: total positive results n = 1985, among them:	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
с домашней пылью with house dust	650	32,7 <sup>1</sup>	150	7,6	65	3,3	–	
с пухом/пером with down/feather	301	15,2 <sup>1</sup>	30	1,5	14	0,7	–	
с библиотечной пылью with library dust	439	22,1 <sup>1</sup>	65	3,3	5	0,3	–	
с клещом домашней пыли with a house dust mite	290	14,6 <sup>1</sup>	69	3,5	21	1,1	–	
Примечание. <sup>1</sup> – p < 0,01 в сравнении с другой степенью выраженности волдырной реакции Note. <sup>1</sup> , p < 0.01 in comparison with another degree of severity of the blistering reaction								
Эпидермальные аллергены Epidermal allergens всего «+» результатов n = 1401, из них: total positive results, n = 1401, among them:	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
с перхотью лошади with horse dandruff	188	13,4 <sup>1</sup>	47	3,4	39	2,8	–	
с шерстью кошки with cat fur	221	15,8 <sup>1</sup>	73	5,2	11	0,8	–	
с шерстью собаки with dog hair	120	8,6 <sup>1</sup>	17	1,2	1	0,1	–	
с волосом человека with human hair	63	4,5 <sup>1</sup>	15	1,1	1	0,1	–	
с шерстью овцы with sheep's hair	221	15,8 <sup>1</sup>	14	1,0	0	–	–	
с шерстью кролика with rabbit fur	155	11,1 <sup>1</sup>	8	0,6	4	0,3	–	
с шерстью морской свинки with guinea pig hair	268	19,1 <sup>1</sup>	44	3,1	5	0,4	–	
с дафниями with daphnia	131	9,4 <sup>1</sup>	17	1,2	7	0,5	–	
Примечание. <sup>1</sup> – p < 0,01 в сравнении с другой степенью выраженности волдырной реакции Note. <sup>1</sup> , p < 0.01 in comparison with another degree of severity of the blistering reaction								
Пищевые аллергены Food allergens всего «+» результатов n = 701, из них: total positive results n = 701, among them:	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
с треской with cod	68	9,7 <sup>1</sup>	2	0,3	2	0,3	–	
с хеком with hake	76	10,8 <sup>1</sup>	5	0,7	15	2,1	–	

Таблица 2 (окончание)  
Table 2 (continued)

Пищевые аллергены Food allergens всего «+» результатов n =701, из них: total positive results n = 701, among them:	+		++		+++		++++	
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
с белком куриного яйца with protein of chicken eggs	104	14,8 <sup>1</sup>	17	2,4	6	0,9	–	
с желтком куриного яйца with yolk of chicken eggs	73	10,4 <sup>1</sup>	10	1,4	3	0,4	–	
с молоком with milk	81	11,6 <sup>1</sup>	9	1,3	2	0,3	–	
с пшеницей with wheat	64	9,1 <sup>1</sup>	3	0,4	2	0,3	–	
с ржаной мукой with rye flour	33	4,7 <sup>1</sup>	2	0,3	0	–	–	
с овсяной крупой with oatmeal	28	4,0 <sup>1</sup>	2	0,3	1	0,1	–	
с гречей with buckwheat	29	4,1	10	1,4	0	–	–	
с рисом with rice	51	7,3 <sup>1</sup>	4	0,6	2	0,3	–	
с ячменной крупой with barley grits	56	8,0 <sup>1</sup>	7	1,0	1	0,1	–	
с курой with chicken	84	12,0 <sup>1</sup>	6	0,9	1	0,1	–	
с говядиной with beef	61	8,7 <sup>1</sup>	2	0,3	0	–	–	
со свиной with pork	46	6,6 <sup>1</sup>	3	0,4	0	–	–	
с цитрусовыми with citrus	49	7,0 <sup>1</sup>	8	1,1	2	0,3	–	
<b>Примечание. <sup>1</sup> – p &lt; 0,01 в сравнении с другой степенью выраженности волдырной реакции</b>								
Note. <sup>1</sup> , p < 0.01 in comparison with another degree of severity of the blistering reaction								
Пыльцевые аллергены Pollen allergens всего «+» результатов n = 1326, из них: total positive results n = 1326, among them:	+		++		+++		++++	
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
с пылью деревьев with pollen of trees	659	49,7 <sup>1</sup>	216	16,3	101	7,6	63	4,8
с пылью луговых трав with pollen of meadow grasses	584	44,0 <sup>1</sup>	146	11,0	60	4,5	52	3,9
с пылью сорных трав with pollen of weeds	501	37,8 <sup>1</sup>	131	9,9	53	4,0	53	4,0
<b>Примечание. <sup>1</sup> – p &lt; 0,01 в сравнении с другой степенью выраженности волдырной реакции</b>								
Note. <sup>1</sup> , p < 0.01 in comparison with another degree of severity of the blistering reaction								

**Примечание. p – достоверность различий между показателями рассчитана согласно параметрического критерия Стьюдента, различия считали достоверными и статистически значимыми при p < 0,05.**

Note. p, significance of differences between indicators is calculated according to the parametric Student's criterion, the differences are considered reliable and statistically significant when p < 0.05.

лась сенсibilизация к куриному яйцу, рыбе, молоку, кукурузе и пшенице, что соответствует литературным данным о распространенности аллергии к данным аллергенам [1, 5, 8].

Полученные данные необходимо использовать при разработке профилактических и ле-

чебных мероприятий у детей с аллергическими заболеваниями кожи и дыхательных путей, а также у детей из группы риска с целью снижения аллергенной нагрузки в окружении пациента и минимизации риска формирования аллергопатологии.

## Список литературы / References

1. Аллергология и клиническая иммунология: Клинические рекомендации / под ред. Р.М. Хаитова, Н.И. Ильиной. М.: ГОЭТАР-Медиа, 2019. 352с. [Allergology and clinical immunology. Clinical recommendations. Ed. by R.M. Khaitov, N.I. Ilyina]. Moscow: GOETAR-Media, 2019. 352 p.
2. Балаболкин И.И., Мачарадзе Д.Ш. Кожные пробы: показания и противопоказания // Вопросы современной педиатрии, 2013. Т. 12, № 3. С. 31-37. [Balabolkin I.I., Macharadze D.S. Skin tests: Indications and contraindications. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2013, Vol. 12, no. 3, pp. 31-37. (In Russ.)]
3. Варламов Е.Е., Пампура А.Н., Асманов А.И. Значение эпидермального барьера и сенсibilизации к бытовым аллергенам на развитие атопического марша в обосновании первичной профилактики // Бюллетень Сибирской медицины, 2018. Т. 17, № 2. С. 114-120. [Varlamov E.E., Pampura A.N., Asmanov A.I. Significance of the epidermal barrier and sensitization to household allergens to the development of atopic march for primary prevention. *Byulleten Sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2018, Vol. 17, no. 2, pp. 114-120. (In Russ.)]
4. Надей Е.В., Совалкин В.И., Нечаева Г.И. Оценка результатов кожного тестирования с ингаляционными аллергенами у больных коморбидной аллергической бронхиальной астмой на фоне аллерген-специфической иммунотерапии // Медицинский вестник Северного Кавказа, 2019. Т. 14, № 2. С. 345-349. [Nadey E.V., Sovalkin V. I., Nechaeva G. I. Follow up of skin testing with inhalation allergens in patients with comorbid allergic bronchial asthma and allergen-specific. *Meditinskiy vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus*, 2019, Vol. 14, no. 2, pp. 345-349. (In Russ.)]
5. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». 5-е изд., перераб. и доп. М.: Оригинал-макет, 2017. 160 с. [National program "Bronchial asthma in children. Treatment Strategy and Prevention". 5<sup>th</sup> ed., rev. and add.]. Moscow: Original-maket, 2017. 160 p.
6. Нилова М.Ю., Туш Е.В., Елисеева Т.И. Структура сенсibilизации к аэроаллергенам у детей с атопической бронхиальной астмой // Аллергология и иммунология в педиатрии, 2019. № 2 (57). С. 17-23. [Nilova M. Yu., Tush E.V., Eliseeva T.I. Structure of sensitization to aeroallergens in children with atopic bronchial asthma. *Allergologiya i immunologiya v pediatrii = Allergology and Immunology in Pediatrics*, 2019, no. 2 (57), pp. 17-23. (In Russ.)]
7. Пампура А.Н., Варламов Е.Е., Конюкова Н.Г. Сенсibilизация к аллергенам домашних животных // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2018. Т. 63, № 2. С. 22-26. [Pampura A.N., Varlamov E.E., Konyukova N.G. Sensitization to pet allergens. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2018, Vol. 63, no. 2, pp. 22-26. (In Russ.)]
8. Хоха Р.Н. Сенсibilизация детей с бронхиальной астмой. Анализ 10-летней динамики // Журнал Гродненского государственного медицинского университета, 2019. Т. 17, № 3. С. 289-295. [Khokha R.N. Sensitization of children with bronchial asthma. Analysis of 10-year dynamics. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Journal of the Grodno State Medical University*, 2019, Vol. 17, no. 3, pp. 289-295. (In Russ.)]
9. Чувирова А.Г., Ярцев М.Н. Роль атопической сенсibilизации при рецидивирующем ларинготрахеите у детей // Аллергология и иммунология в педиатрии, 2018. № 1 (52). С. 33-40. [Chuvirova A.G., Yartsev M.N. The impact of atopic sensitization on recurrent laryngotracheitis in children. *Allergologiya i immunologiya v pediatrii = Allergology and Immunology in Pediatrics*, 2018, no. 1 (52), pp. 33-40. (In Russ.)]
10. Шахова, Н.В., Камалтынова Е.М., Лобанов Ю.Ф., Кашинская Т.С. Распространенность аллергической и неаллергической бронхиальной астмы и спектр сенсibilизации среди детей дошкольного возраста, проживающих в городских условиях Алтайского края: популяционное одномоментное исследование // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2019. Т. 64, № 1. С. 88-93. [Shakhova N.V., Kamaltynova E.M., Lobanov Yu.F., Kashinskaya T.S. The prevalence of allergic and non-allergic bronchial asthma and the spectrum of sensitization among children of preschool age living in urban areas of the Altai Territory: a momentary population study. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2019, Vol. 64, no. 1, pp. 88-93. (In Russ.)]

---

**Автор:**

Емелина Ю.Н. — к.м.н., врач аллерголог-иммунолог  
ГБУЗ СО «Свердловская областная детская клиническая  
больница», г. Екатеринбург, Россия

---

**Author:**

Emelina Yu.N., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist,  
Sverdlovsk Regional Children's Clinical Hospital,  
Yekaterinburg, Russian Federation

---

Поступила 02.06.2020

Принята к печати 01.08.2020

---

Received 02.06.2020

Accepted 01.08.2020

## КОРРЕЛЯЦИИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АДАПТИВНОГО И ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ХРОНИЧЕСКИ ОБЛУЧЕННЫХ ЛЮДЕЙ В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ

Кодинцева Е.А.<sup>1,2</sup>, Аклеев А.А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, г. Челябинск, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Резюме.** Радиационно-индуцированные изменения со стороны иммунной системы развиваются достаточно рано после начала радиационного воздействия и сохраняются спустя длительное время после прекращения облучения. При хроническом радиационном воздействии с мощностью дозы меньше 0,1 Гр/год порог годовой дозы облучения красного костного мозга для угнетения иммуногемопоеза составляет 0,3-0,5 Гр. Показано, что при хроническом действии ионизирующего излучения в кроветворной системе запускаются адаптационные механизмы. В данной работе количественно и качественно охарактеризованы взаимосвязи между отдельными звеньями врожденного и адаптивного иммунитета, что важно для понимания особенностей гомеостаза и адаптационных возможностей иммунной системы у хронически облученных лиц в отдаленные сроки. В основную группу было включено 376 жителей населенных пунктов, расположенных в бассейне реки Течи, загрязненной радиоактивными отходами в 1949-1960 гг. Средняя величина дозы облучения красного костного мозга у них составляла  $1,08 \pm 0,04$  Гр (диапазон доз был широким: 0,08-4,46 Гр), возраст варьировал в диапазоне от 58 до 88 лет (среднее значение –  $70,3 \pm 0,3$  года). Группа сравнения была представлена 162 необлученными людьми, возраст которых колебался в пределах от 58 до 90 лет (среднее значение –  $69,3 \pm 0,5$  лет). Методом корреляционного анализа по Кендаллу в основной группе выявлено 82 статистически значимые корреляции (коэффициент корреляции более 0,3,  $p$  – менее 0,05) между отдельными показателями иммунитета относительно 65 аналогичных корреляций в группе сравнения. Для большинства выявленных взаимосвязей в обеих группах коэффициент корреляции составил от 0,3 до 0,5 (57 связей – в основной группе, 41 – в группе сравнения), корреляций с коэффициентом от 0,5 до 0,7 насчитывалось 16 в основной группе и 14 – в группе сравнения, в то же время значение коэффициента корреляции свыше 0,7 было отмечено для 9 взаимосвязей в основной группе и для 10 – в группе сравнения. Анализ методом  $\chi$ -квадрат не позволил отметить статистически значимых различий в общем количестве корреляций и количестве корреляций разной силы в сравниваемых группах. Полученные результаты согласуются с результатами ранее проведенных исследований и подтверждают, что изменения в иммунной системе у людей, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному

### Адрес для переписки:

Кодинцева Екатерина Александровна  
ФГБУН «Уральский научно-практический центр  
радиационной медицины» ФМБА России  
454076, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 68а.  
Тел.: 8 (351) 232-79-22.  
E-mail: ovcharova.cat@mail.ru

### Address for correspondence:

Kodintseva Ekaterina A.  
Ural Research Center for Radiation Medicine  
454076, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 68a.  
Phone: 7 (351) 232-79-22.  
E-mail: ovcharova.cat@mail.ru

### Образец цитирования:

Е.А. Кодинцева, А.А. Аклеев «Корреляции показателей адаптивного и врожденного иммунитета у хронически облученных людей в отдаленные сроки» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 225-230. doi: 10.46235/1028-7221-399-DCP

© Кодинцева Е.А., Аклеев А.А., 2020

### For citation:

E.A. Kodintseva, A.A. Akleyev "Delayed correlated parameters of adaptive and innate immunity in chronically irradiated subjects", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 225-230. doi: 10.46235/1028-7221-399-DCP

DOI: 10.46235/1028-7221-399-DCP

радиационному воздействию, в отдаленные сроки носят невыраженный характер и свидетельствуют о наличии у них компенсаторных механизмов регуляции по принципу прямой и обратной связи.

*Ключевые слова:* хроническое облучение, река Теча, врожденный иммунитет, адаптивный иммунитет, цитокины, корреляционный анализ

## DELAYED CORRELATED PARAMETERS OF ADAPTIVE AND INNATE IMMUNITY IN CHRONICALLY IRRADIATED SUBJECTS

Kodintseva E.A.<sup>a, b</sup>, Akleyev A.A.<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup> Ural Research Center for Radiation Medicine, Federal Medical-Biological Agency, Chelyabinsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

<sup>c</sup> South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Abstract.** Radiation-induced changes in the immune system develop quite early after the onset of radiation exposure and persist over a long time after it's removal. In case of chronic radiation exposure at dose rate lower than 0.1 Gy/year, the threshold of annual dose to suppress red bone marrow hemato- and immunopoiesis reaches 0.3-0.5 Gy. It was shown that adaptation mechanisms are triggered under the chronic impact of ionizing radiation in the hematopoietic system. In our study we quantitatively and qualitatively analyzed relationships between individual arms of the immune system which is important for understanding features of homeostasis and the adaptation capacity of immune system in chronically irradiated subjects at later time points. The main group included 376 persons exposed to chronic irradiation due to 1949-1960 industrial pollution with radioactive waste residing in Techa River basin. Average radiation dose for the red bone marrow in this group was  $1.08 \pm 0.04$  (0.08-4.46) Gy. The comparison group included 162 unexposed persons. The mean age of people in the main and comparison group was  $70.3 \pm 0.3$  (58-88) and  $69.3 \pm 0.5$  (58-90) years, respectively. The Kendall correlation analysis identified 82 statistically significant correlations (correlation coefficient higher than 0.3,  $p < 0.05$ ) between individual immune parameters versus 65 similar correlations found in the comparison group. The majority of identified correlation links in both groups ranged from 0.3 to 0.5 (main group – 57 correlations, comparison group – 41 correlations). There were found 16 and 14 correlations in the main and comparison group, respectively, with a coefficient ranged from 0.5 to 0.7. The correlation coefficient value higher than 0.7 was noted for 9 correlations in the main group and for 10 – in the comparison group. The  $\chi$ -square analysis revealed no significant differences between total number of correlations and number of correlations of varying strength both in the main and comparison groups. The obtained data are consistent with previous studies and confirm that delayed changes in the immune system of subjects exposed to chronic low-rate irradiation were mild and evidenced about developed feedforward and feedback compensatory mechanisms.

*Keywords:* chronic irradiation, Techa river, innate immunity, adaptive immunity, cytokines, correlation analysis

### Введение

Несмотря на то, что риск техногенного облучения в последние годы значительно снизился в связи с внедрением современных безопасных технологий как на предприятиях атомной промышленности, так и в других отраслях человеческой деятельности, в настоящее время не представляется возможным полностью исключить вероятность аварийного облучения больших групп людей [1]. Потенциальным следствием радиационных аварий может стать многолетнее воздействие на людей, проживающих на загрязненных территориях, малых доз ионизирующего излучения. Вместе с тем ежегодно расширяется сфера использования ионизирующей радиации в медицине в диагностических и терапевтических

целях [14]. Регулярность медицинских рентгенологических процедур, а также естественное облучение населения отдельных регионов страны с высоким природным радиационным фоном [15] определяют актуальность исследований медицинских и биологических последствий хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия на организм человека.

Известна высокая радиочувствительность иммунной системы, разнонаправленные пострадиационные изменения в которой регистрируются длительное время после облучения [1, 9, 12]. Показано, что эти изменения обусловлены главным образом сублетальными аномалиями иммунокомпетентных клеток, в частности повышенным уровнем нестабильных хромосом-

ных аберраций [3], TCR-мутациями [11, 13], нарушениями клеточного цикла [7] и, в меньшей степени, ускоренным апоптозом лимфоцитов периферической крови [5]. Изменения в системе иммунитета могут играть значительную роль в патогенезе отдаленных последствий хронического радиационного воздействия и, в первую очередь, канцерогенных эффектов.

Характер отдаленных радиационно-индуцированных изменений иммунитета и механизмы их реализации в настоящее время изучены недостаточно [9, 10]. Ранняя иммуносупрессия после острого облучения в больших дозах обусловлена гибелью иммунокомпетентных клеток, однако патофизиологические механизмы отдаленных изменений в иммунной системе после хронического облучения малоизвестны [12]. Порог годовой дозы облучения красного костного мозга для угнетения иммуногемопоэза при хроническом радиационном воздействии с мощностью дозы меньше 0,1 Гр/год составляет 0,3-0,5 Гр [12]. Показано, что при хроническом действии ионизирующего излучения в кроветворной системе, анатомически и физиологически тесно связанной с иммунной системой, запускаются адаптационные механизмы [1].

Большой интерес для понимания особенностей гомеостаза и адаптационных возможностей иммунной системы при хроническом радиационном воздействии представляет количественная и качественная характеристика взаимосвязей между отдельными звеньями систем врожденного и адаптивного иммунитета у жителей населенных пунктов, расположенных поблизости реки Течи, загрязненной радиоактивными отходами производственного объединения «Маяк», в период реализации отдаленных соматико-стохастических последствий облучения.

Исключительно важной и интересной особенностью характера облучения этой когорты лиц явилось то, что распределение дозы по организму у них было неравномерным. Так, наибольшие дозы облучения пришлось на красный костный мозг, являющийся не только органом, где осуществляется закладка предшественников всех клеток крови, в том числе иммунокомпетентных, но и выполняющим иммунорегуляторные функции. Связано это с тем, что формирование основной части дозы было обусловлено  $^{90}\text{Sr}$ . Данный радиоизотоп, являясь щелочноземельным металлом, аккумулируется в костной ткани, при этом имея достаточно большой период полураспада (порядка 30 лет) [1]. Важно отметить, что на время проведения исследования большинство обследованных людей достигли пожилого и старческого возраста, когда значительно возрастает риск развития онкологических, сердечно-со-

судистых и других заболеваний. По результатам эпидемиологических исследований у жителей радиоактивно загрязненных сел, расположенных в окрестностях реки Течи, отмечен повышенный радиационный риск развития отдаленных соматико-стохастических эффектов, таких как солидные опухоли и лейкозы [7].

**Целью исследования** явился анализ взаимосвязей между показателями иммунного статуса у хронически облученных людей спустя 60-68 лет после радиационного воздействия.

## Материалы и методы

В основную группу было включено 376 жителей сел и деревень, расположенных в бассейне реки Течи, загрязненной радиоактивными отходами в 1949-1960 гг. [1, 8]. Средняя величина дозы облучения красного костного мозга у них составляла  $1,08 \pm 0,04$  Гр (диапазон доз был широким: 0,08-4,46 Гр), возраст варьировал в диапазоне от 58 до 88 лет (среднее значение –  $70,3 \pm 0,3$  года). В группе облученных лиц преобладали женщины (255 человек, 67,8%) над мужчинами (121 человек, 32,2%), а также лица тюркской этнической группы – главным образом татары и башкиры (211 человек, 56,1%) преобладали над славянами (165 человек, 43,9%). Группа сравнения была представлена 162 необлученными людьми, возраст которых колебался в пределах от 58 до 90 лет (среднее значение –  $69,3 \pm 0,5$  лет), в их числе 119 женщин (73,5%), 43 мужчины (26,5%), 89 тюркитов (54,9%) и 73 лица славянской этнической группы (45,1%).

С целью количественного определения иммунокомпетентных клеток в крови применяли способ CD-типирования с учетом методом проточной цитометрии. Определение содержания сывороточных иммуноглобулинов и цитокинов в сыворотке крови осуществляли методом ИФА. Функциональную активность нейтрофилов и моноцитов определяли при помощи стандартных методов.

Корреляционный анализ проводили путем расчета коэффициентов ранговой корреляции Г Кендалла для каждой уникальной пары показателей иммунитета. Силу связи коэффициентов корреляции оценивали по шкале Чеддока. В исследование включали лишь статистически значимые корреляции ( $p < 0,05$ ) с коэффициентом корреляции более 0,3. Значимость различий количества корреляций, выявленных в разных группах, оценивали при помощи критерия  $\chi^2$  (различия расценивали как статистически значимые при уровне  $p$  менее 0,05). Статистическую обработку полученных данных проводили посредством табличного редактора Microsoft Excel, а также программы Statistica.

## Результаты и обсуждение

В основной группе обнаружено 82 статистически значимые корреляции ( $\tau > 0,3$ ;  $p < 0,05$ ) между отдельными показателями иммунитета относительно 65 аналогичных корреляций в группе сравнения. Для большинства выявленных взаимосвязей в обеих группах коэффициент корреляции составил от 0,3 до 0,5 (57 связей в основной группе, 41 – в группе сравнения), корреляций с коэффициентом от 0,5 до 0,7 насчитывалось 16 в основной группе и 14 – в группе сравнения. Выявлено девять взаимосвязей с коэффициентом корреляции от 0,7 до 0,9 в основной группе и 10 – в группе сравнения. Статистически значимых различий между общим количеством корреляций и количеством корреляций разной силы и направленности в сравниваемых группах не обнаружено.

В основной группе выявлены две корреляции между показателями клеточного состава периферической крови, отсутствовавшие в группе сравнения: сегментоядерные нейтрофилы, % – лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  ( $\tau = -0,36$ ;  $p < 0,05$ ) и лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  – нейтрофилы, % ( $\tau = -0,38$ ;  $p < 0,05$ ).

В основной группе отсутствовали четыре корреляции, характерные для группы сравнения, две из которых касались Т-клеточного звена, а две были связаны с содержанием отдельных сывороточных цитокинов:  $\text{CD4}^+$ -лимфоциты, % –  $\text{CD4}^+$ -лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  ( $\tau = 0,36$ ;  $p < 0,05$ ),  $\text{CD8}^+$  лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  –  $\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$  лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  ( $\tau = 0,36$ ;  $p < 0,05$ ),  $\text{CD4}/\text{CD8}$  – IL-17, пг/мл ( $\tau = -0,34$ ;  $p < 0,05$ ), IL-1 $\alpha$ , пг/мл – GM-CSF, пг/мл ( $\tau = 0,38$ ;  $p < 0,05$ ).

Вместе с тем в основной группе были выявлены корреляции, не характерные для группы сравнения. Восемь новых взаимосвязей обнаружено для Т-клеточного звена иммунной системы: сегментоядерные нейтрофилы, % –  $\text{CD3}^+$  лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  ( $\tau = -0,34$ ;  $p < 0,05$ ), нейтрофилы, % –  $\text{CD3}^+$  лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  ( $\tau = -0,35$ ;  $p < 0,05$ ), нейтрофилы, % –  $\text{CD4}^+$ -лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  ( $\tau = -0,31$ ;  $p < 0,05$ ), лимфоциты, % –  $\text{CD8}^+$  лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  ( $\tau = 0,35$ ;  $p < 0,05$ ), лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  –  $\text{CD8}^+$  лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  ( $\tau = 0,50$ ;  $p < 0,05$ ),  $\text{CD4}^+$  лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  –  $\text{CD8}^+$  лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  ( $\tau = 0,33$ ;  $p < 0,05$ ), лейкоциты,  $10^9/\text{л}$  –  $\text{CD16}^+\text{CD56}^+$  лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  ( $\tau = 0,34$ ;  $p < 0,05$ ),  $\text{CD3}^+$  лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  –  $\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$  лимфоциты,  $10^9/\text{л}$  ( $\tau = 0,36$ ;  $p < 0,05$ ). Не обнаружено статистически значимых различий между количеством выявленных в Т-звене иммунной системы корреляций в основной группе (28 из 82) и в группе сравнения (20 из 65).

Помимо этого, в основной группе зарегистрировано девять новых корреляций, связанных с

содержанием отдельных цитокинов в сыворотке крови: IL-1, пг/мл – IL-1ra, пг/мл ( $\tau = 0,36$ ;  $p < 0,05$ ), IL-2, пг/мл – IL-4, пг/мл ( $\tau = 0,32$ ;  $p < 0,05$ ), IL-2, пг/мл – IL-6, пг/мл ( $\tau = 0,32$ ;  $p < 0,05$ ), IL-4, пг/мл – IL-6, пг/мл ( $\tau = 0,31$ ;  $p < 0,05$ ), IL-1ra, пг/мл – IL-10, пг/мл ( $\tau = -0,33$ ;  $p < 0,05$ ), IL-4, пг/мл – IL-17, пг/мл ( $\tau = 0,34$ ;  $p < 0,05$ ), IL-17, пг/мл – G-CSF, пг/мл ( $\tau = 0,31$ ;  $p < 0,05$ ), IL-2, пг/мл – IFN $\gamma$ , пг/мл ( $\tau = 0,31$ ;  $p < 0,05$ ), IL-4, пг/мл – IgG, г/л ( $\tau = -0,30$ ;  $p < 0,05$ ). Не зарегистрировано статистически значимых различий в количестве корреляций с участием цитокинов в основной группе (14 из 82) и в группе сравнения (7 из 65).

Взаимосвязи показателей гуморального звена адаптивного иммунитета с другими показателями иммунной системы по количеству, силе и направленности не отличались в сравниваемых группах.

Корреляции между показателями функциональной активности нейтрофилов и моноцитов в сравниваемых группах были сходны как по числу, так и по своей силе и направленности. Вместе с тем в группе облученных лиц отмечены две новые взаимосвязи, отсутствовавшие у необлученных людей: интенсивность фагоцитоза моноцитов, усл. ед. – фагоцитарное число моноцитов, усл. ед. ( $\tau = 0,46$ ;  $p < 0,05$ ), фагоцитарное число моноцитов, усл. ед. – интенсивность фагоцитоза нейтрофилов, усл. ед. ( $\tau = 0,31$ ;  $p < 0,05$ ).

Таким образом, в ходе исследования не отмечено достоверных различий в общем количестве корреляций между показателями иммунного статуса в основной группе и в группе сравнения.

Уникальные для основной группы корреляции затрагивали преимущественно Т-клеточное звено иммунной системы (исчезли две связи и появилось восемь новых) и цитокиновый профиль (исчезли две связи и появилось девять новых). Корреляции между показателями функциональной активности фагоцитов в основной группе были изменены несущественно относительно группы сравнения (зарегистрированы две новые связи).

Не было обнаружено статистически значимых различий в количестве корреляций в пределах каждого звена иммунной системы между сравниваемыми группами.

В основной группе взаимосвязи (за исключением одной корреляции средней силы), утраченные или возникшие вновь относительно таковых в группе сравнения, характеризовались слабой силой (от 0,3 до 0,5).

Ранее сообщалось о долговременном характере изменений у облученных лиц со стороны Т-клеточного звена иммунной системы и факторов естественной цитотоксичности, наличии признаков иммунной дисрегуляции в отдаленные

сроки после начала хронического радиационного воздействия, что, по-видимому, было обусловлено многолетним облучением красного костного мозга за счет  $^{90}\text{Sr}$  [1].

По прошествии 60–68 лет после начала облучения у жителей радиоактивно-загрязненных населенных пунктов, расположенных на побережье реки Течи, регистрировалось сниженное (относительно группы необлученных людей) содержание лейкоцитов в крови, главным образом за счет нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов, супрессия внутриклеточного кислородзависимого метаболизма моноцитов, признаки активации лизосомальной активности нейтрофилов и провоспалительные сдвиги в системе цитокинов (пониженное содержание IL-4, повышенное — TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  в сыворотке крови) [6]. Обращает внимание стойкость пострadiационных иммунных изменений: даже по прошествии 60 и более лет после начала радиационного воздействия у облученных людей по-прежнему прослеживалось влияние радиационного фактора на отдельные показатели иммунитета [6]. С другой стороны, следует отметить, что выявленные изменения со стороны иммунной системы были, преимуще-

ственно, субклиническими, что свидетельствует о хороших компенсаторно-восстановительных возможностях системы иммуногемопоеза у человека [1, 4, 6, 8, 12].

Статистически незначимое увеличение количества взаимосвязей, преимущественно со стороны Т-клеточного звена иммунной системы и цитокинового профиля, при сохранении силы и направленности корреляций может рассматриваться как свидетельство адаптационных процессов, протекающих в иммунной системе у хронически облученных лиц, направленных на поддержание генетического гомеостаза организма спустя 60 и более лет от начала радиационного воздействия с низкой мощностью дозы.

## Благодарности

Авторы выражают признательность руководителю лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН «УНПЦ РМ» ФМБА России Евгении Андреевне Блиновой и старшему лаборанту лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России Надежде Петровне Литвиненко.

## Список литературы / References

1. Аклев А.В. Хронический лучевой синдром у жителей прибрежных сел реки Теча. Челябинск: Книга, 2012. 464 с. [Akleyev A.V. Chronic radiation syndrome among residents of the Techa River riverside villages. Chelyabinsk: Book, 2012, 464 p.]
2. Аклев А.А., Блинова Е.А., Долгушин И.И. Митотическая активность лимфоцитов и иммунный статус человека в отдаленные сроки после хронического радиационного воздействия // Иммунология, 2018. Т. 39, № 4. С. 202–207. [Akleyev A.A., Blinova E.A., Dolgushin I.I. Mitotic activity of lymphocytes and immunological status of man at later time points after chronic radiation exposure. *Immunologiya = Immunology*, 2018, Vol. 39, no. 4, pp. 202–207. (In Russ.)]
3. Аклев А.А., Возилова А.В. Функциональное состояние иммунной системы у облученных лиц, имеющих повышенный уровень хромосомных aberrаций // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 3. С. 359–360. [Akleyev A.A., Vozilova A.V. The functional state of the immune system in irradiated persons with increased levels of chromosomal aberrations. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 3, pp. 359–360. (In Russ.)]
4. Аклев А.А., Долгушин И.И. Особенности иммунного статуса у людей, перенесших хронический лучевой синдром, в отдаленные сроки // Радиация и риск, 2018. Т. 27, № 2. С. 76–85. [Akleyev A.A., Dolgushin I.I. Immune status of persons with CRS at later time points. *Radiatsiya i risk = Radiation and Risk*, 2018, Vol. 27, no. 2, pp. 76–85. (In Russ.)]
5. Блинова Е.А., Аклев А.А. Анализ показателей апоптотической гибели лимфоцитов у хронически облученных лиц // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 2. С. 107–109. [Blinova E.A., Akleyev A.A. Analysis of the apoptotic death indicators of lymphocytes among the persons exposed to chronic irradiation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 2, pp. 107–109. (In Russ.)]
6. Варфоломеева Т.А., Аклев А.А., Мандрыкина А.С. Показатели гомеостаза в отдаленном периоде у лиц, подвергшихся хроническому облучению на Южном Урале // Медицинская радиология и радиационная безопасность, 2016. Т. 61, № 2. С. 39–45. [Varfolomeyeva T.A., Akleyev A.A., Mandrykina A.S. The characteristics of homeostasis in individuals chronically exposed to radiation in the South Urals at late time after exposure. *Meditsinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost = Medical Radiology and Radiation Safety*, 2016, Vol. 61, no. 2, pp. 39–45. (In Russ.)]
7. Крестинина Л.Ю., Силкин С.С., Дегтева М.О., Аклев А.В. Риск смерти от болезней системы кровообращения в Уральской когорте аварийно-облученного населения за 1950–2015 годы // Радиационная

гигиена, 2019. Т. 12, № 1. С. 52-61. [Krestinina L.Yu., Silkin S.S., Degteva M.O., Akleyev A.V. Risk analysis of the mortality from the diseases of the circulatory system in the Ural cohort of emergency-irradiated population for the years 1950-2015. *Radiatsionnaya gigiyena = Radiation Hygiene*, 2019, Vol. 12, no. 1, pp. 52-61. (In Russ.)]

8. Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи / Под ред. А.В. Аклеева. Челябинск: Книга, 2016. 400 с. [Consequences of radioactive contamination of the river Techa / Ed. by A.V. Akleyev.] Chelyabinsk: Book, 2016. 400 p.

9. Ярилин А.А. Радиация и иммунитет. Вмешательство ионизирующих излучений в ключевые иммунные процессы // Радиационная биология. Радиоэкология, 1999. Т. 39, № 1. С. 181-189. [Yarilin A.A. Radiation and immunity. Interference of ionizing radiation with key immune processes. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology*, 1999, Vol. 39, no. 1, pp. 181-189. (In Russ.)]

10. Ahmed R., Roger L., Costa del Amo P., Miners K.L., Jones R.E., Boelen L., Fali T., Elemans M., Zhang Y., Appay V., Baird D.M., Asquith B., Price D.A., Macallan D.C., Ladell K. Human stem cell-like memory T cells are maintained in a state of dynamic flux. *Cell Rep.*, 2016, Vol. 17, no. 11. pp. 2811-2818.

11. Akleyev A.A., Blinova E.A., Dolgushin I.I. Immunological status of chronically exposed persons with increased level of TCR mutations. *Radiat. Environ. Biophys.*, 2019, Vol. 58, no. 1, pp. 81-88.

12. ICRP, 2012. ICRP Statement on Tissue Reactions / Early and Late Effects of Radiation in Normal Tissues and Organs – Threshold Doses for Tissue Reactions in a Radiation Protection Context. ICRP Publication 118. Ann. ICRP 41(1/2). 322 p.

13. Kotikova A.I., Blinova E.A., Akleyev A.A. Association between immune system's genes polymorphisms and immunity parameters in persons exposed to chronic radiation exposure. *Health Physics*, 2018, Vol. 115, no. S1, p. S47.

14. Tang F.R., Loganovsky K. Low dose or low dose rate ionizing radiation-induced health effect in the human. *J. Environ. Radioactivity*, 2018, Vol. 192, pp. 32-47.

15. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: UNSCEAR 2017. Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation. Report to the General Assembly and Scientific. Annex B. Epidemiological studies of cancer risk due to low-dose-rate radiation from environmental sources. New York: United Nations, 2018, pp. 65-177.

---

**Авторы:**

**Кодинцева Е.А.** – к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России; доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

**Аклеев А.А.** – к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, г. Челябинск, Россия

**Authors:**

**Kodintseva E.A.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Cell Radiobiology, Ural Research Center for Radiation Medicine, Federal Medical-Biological Agency; Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Akleyev A.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural State Medical University; Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Cell Radiobiology, Ural Research Center for Radiation Medicine, Federal Medical-Biological Agency, Chelyabinsk, Russian Federation

---

Поступила 07.06.2020  
Принята к печати 22.07.2020

Received 07.06.2020  
Accepted 22.07.2020

## **КОЗЛОВ ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ (К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)**



20 июля 2020 года исполнилось 80 лет со дня рождения Владимира Александровича Козлова — одного из крупнейших советских и российских иммунологов, академика Российской академии наук, профессора, доктора медицинских наук, заведующего кафедрой клинической иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета, научного руководителя НИИ фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ), заведующего лабораторией клинической иммунопатологии этого же института.

В.А. Козлов родился в городе Новосибирске. В 1963 году Владимир Александрович окончил Новосибирский государственный медицинский институт. С 1963 года он последовательно прошел путь ординатора, аспиранта, младшего и старшего научного сотрудника, заведующего лабораторией, заместителя директора по научной работе, директора института, заместителя председателя Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.

В 1969 году Владимир Александрович защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по теме «Постэмбриональные и пострadiационные сдвиги в иммунокомпетентной ткани животных разных генотипов», в 1981 году им была защищена докторская диссертация на тему «Гуморально-клеточные уровни регуляции основных этапов антителогенеза».

В 1986 году ему было присвоено звание «профессор» по специальности «аллергология и иммунология», в 1994 году избран членом-корреспондентом РАМН по специальности «иммунология», в 2002 году — действительным членом (академиком) Российской академии медицинских наук по специальности «иммунология».

С именем В.А. Козлова связано развитие фундаментальных исследований в области регуляции иммунного гомеостаза во взаимодействии с нервной, эндокринной и кроветворной системами в норме и патологии.

В.А. Козлов внес большой вклад в развитие экспериментальной иммунологии. Им были выявлены разнонаправленные конкурентные механизмы регуляции пролиферации и дифференцировки стволовых кроветворных клеток, а также впервые в мире выдвинута и обоснована гипотеза об участии полипотентных стволовых кроветворных клеток в формировании иммунного ответа.

Впервые в мире В.А. Козловым с сотрудниками описаны иммунорегуляторные функции эритроидных клеток. По результатам этих исследований в 1990 году Госкомитетом СССР по делам изобретений зарегистрировано открытие «Явление регуляции гуморального иммунного ответа гетерогенной

популяцией клеток эритроидного ряда». Впоследствии, из эритробластов был выделен иммунодепрессивный фактор, обладающий ингибирующим эффектом на пролиферацию В-лимфоцитов.

Под руководством В.А. Козлова разработан новый иммуноактивный препарат, не имеющий аналогов в России и за рубежом, Hb $\beta$  (цепь гемоглобина) со свойствами модулятора эритро- и иммунопоеза. Обоснована возможность применения нового ингибитора пролиферации стволовых кроветворных клеток (Hb $\beta$ , а также входящего в его состав пептида PN951) в качестве химиопротекторного средства.

В настоящее время под руководством В.А. Козлова инициированы и успешно ведутся работы по созданию принципиально нового класса препаратов для лечения основных заболеваний человека на основе биомедицинских клеточных продуктов. В этом направлении разрабатываются подходы к использованию в качестве клеточных продуктов не только стволовых клеток, но и различных популяций клеток иммунной системы (дендритно-клеточный вакцины, Т-клеточные вакцины, цитотоксические Т-клетки, M2-макрофаги и др.).

В.А. Козловым создана школа высококвалифицированных специалистов в области иммунологии. Им подготовлено более 70 докторов и кандидатов наук. В течение ряда лет В.А. Козлов является председателем диссертационного совета Д.001.01.01 при НИИФКИ, главным редактором журнала «Клеточная трансплантология и тканевая инженерия» и «Традиционная медицина. Восток и Запад», заместителем главного редактора журнала «Цитокины и воспаление» и «Российский иммунологический журнал», членом редакционных коллегий и советов журналов «Сибирский научный медицинских журнал», «Медицинская иммунология», «Аллергология и иммунология», «Клеточные технологии в биологии и медицине» и «Иммунология».

В.А. Козлов является почетным вице-президентом Российского научного общества иммунологов, вице-президентом Education Instruction Committee of World Federation of Chinese Medicine Societies, почетным членом The World Immunopathology Organization (WIPO), приглашенным профессором в Тяньцзинском университете традиционной китайской медицины.

Огромны заслуги В.А. Козлова в преподавании иммунологии и усилиях выделить иммунологию в самостоятельную научную дисциплину. Он является заведующим кафедрой клинической иммунологии в Новосибирском государственном медицинском университете и инициатором создания курсов «Иммунология и клеточные технологии» в Новосибирском государственном университете.

В.А. Козлов – автор и соавтор более 1200 научных публикаций, в том числе 14 монографий, 5 руководств и учебников. Им получено 34 патента, 9 авторских свидетельств, 1 диплом на открытие.

Владимир Александрович удостоен премии РАМН им. Н.И. Пирогова и Государственной премии Правительства Российской Федерации в области образования, награжден почетным знаком им. акад. В.И. Йоффе и золотой медалью Российского научного общества иммунологов, является Кавалером золотого почетного знака «Общественное признание», имеет почетное звание «Заслуженный ветеран Сибирского отделения РАН», знаками отличия «За заслуги перед Новосибирской областью» и «Отличник здравоохранения».

В эти юбилейные дни редакция журнала «Российский иммунологический журнал» присоединяется к многочисленным поздравлениям в адрес академика В.А. Козлова и желает ему творческого долголетия и активной работы на благо развития клинической и фундаментальной иммунологии.

# ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://rusimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Российский иммунологический журнал» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

## Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

## Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше. Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

## Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную

информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

## Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

### Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 $\beta$  на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64–69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 $\beta$  in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64–69. (In Russ.)]

### Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

### Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503–5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

## Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

## Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем

количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

#### Размеры иллюстраций:

- максимальная высота – 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца – 82 мм, для 2 столбцов – 170 мм

**Таблицы.** Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (\*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (\*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

**Рисунки (графики и фотографии).** В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарицательные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

#### Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Российский иммунологический журнал» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

#### Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Рукопись может быть возвращена авторам, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Российский иммунологический журнал» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии.

Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.

2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.

3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:

1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):

- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).

- Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).

- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.

- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.

- Полное название статьи, направляемой в редакцию.

- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.

- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.

- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);

- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);

- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (В случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное

учреждение. Для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);

- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);

- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках (на русском и английском языках);

- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок\_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).

6) Файл в формате .doc, .docx, .tiff, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, в начале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) — редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

4. Текст набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям, описанным в Правилах для авторов, расположенных на странице «О Журнале».

6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать из раздела Рецензирование, на странице «О Журнале».

## Авторские права

Авторы, публикующие в данном журнале, соглашаются со следующим:

1. Авторы сохраняют за собой авторские права на работу и предоставляют журналу право первой публикации работы на условиях лицензии Creative Commons Attribution License, которая позволяет другим распространять данную работу с обязательным сохранением ссылок на авторов оригинальной работы и оригинальную публикацию в этом журнале.

2. Авторы сохраняют право заключать отдельные контрактные договоренности, касающиеся неэксклюзивного распространения версии работы в опубликованном здесь виде (например, размещение ее в институтском хранилище, публикацию в книге), со ссылкой на ее оригинальную публикацию в этом журнале.

3. Авторы имеют право размещать их работу в сети Интернет (например, в институтском хранилище или персональном сайте) до и во время процесса рассмотрения ее данным журналом, так как это может привести к продуктивному обсуждению и большему количеству ссылок на данную работу (См. The Effect of Open Access).

## Приватность

Имена и адреса электронной почты, введенные на сайте этого журнала, будут использованы исключительно для целей, обозначенных этим журналом, и не будут использованы для каких-либо других целей или предоставлены другим лицам и организациям.

**Вы можете оформить подписку на журнал «Российский иммунологический журнал» через отделения связи:**

**Каталог «Пресса России» — индекс 15590.**

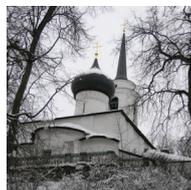
**Подписка на электронную версию журнала на сайте [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)**

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абидов М.Т. ....	145	Забокрицкий Н.А. ....	125	Поздина В.А. ....	145
Абишева Н.Н. ....	187	Заморина С.А. ....	157	Раев М.Б. ....	157
Аклев А.А. ....	225	Зотова М.А. ....	181	Резайкин А.В. ....	195
Алексеев В.Б. ....	203	Зурочка А.В. ....	163	Сазонов С.В. ....	195
Батурина И.Л. ....	181	Зурочка В.А. ....	169	Сарычева Ю.А. ....	153
Бедулева Л.В. ....	187	Иванова Е.В. ....	139	Сергеев А.Г. ....	195
Беляева С.В. ....	191	Кадочникова Я.А. ....	119	Сидоров А.Ю. ....	187
Бочкова М.С. ....	157	Кодинцева Е.А. ....	225	Снимщикова И.А. ....	133
Виноградов А.В. ....	195	Колыванова М.А. ....	153	Тимганова В.П. ....	157
Власова В.В. ....	115	Кузьмичева Н.А. ....	139	Токарева А.А. ....	153
Гейн С.В. ....	119	Кулакова А.С. ....	133	Ужвиюк С.В. ....	157
Гильманова Л.У. ....	187	Литвинова Д.В. ....	195	Файзуллина А.И. ....	163
Гилёва С.Г. ....	175	Лобода А.Н. ....	195	Филиппова Ю.В. ....	139
Горбушина А.Н. ....	187	Логинова Ю.В. ....	181	Фомина Л.О. ....	169
Гриценко В.А. ....	169	Михайлова И.В. ....	139	Фролов Б.А. ....	153
Данилова И.Г. ....	145	Морозов В.Н. ....	153	Чайникова И.Н. ....	139
Дианова Д.Г. ....	203, 209	Никонова Т.И. ....	181	Шардина К.Ю. ....	157
Добрынина М.А. ....	169	Никушкина К.В. ....	181	Шмагель Н.Г. ....	115
Долгих О.В. ....	203, 209	Панфилова Т.В. ....	153	Штиль А.А. ....	153
Емелина Ю.Н. ....	217	Перунова Н.Б. ....	139	Южанинова С.В. ....	175
Емельянов И.В. ....	181	Плотникова М.О. ....	133		

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптивный иммунитет .....	226	корреляционный анализ .....	226	река Теча .....	226
активные формы кислорода .....	120	культура клеток .....	158	секвенирование .....	196
аллергены .....	217	лекарственные растения .....	140	сенсibilизация .....	217
альвеолярные макрофаги .....	146	лечение .....	126	склеростин .....	133
аминодигидрофалазиндион натрия ...	146	лимфоциты .....	176	специфическая сенсibilизация .....	210
антигены .....	163, 169	макрофаги селезенки .....	146	термический ожог .....	126
антитела .....	163	метабиотик .....	126	туберкулез легких .....	191
апоптоз .....	176	миелоидные супрессорные клетки .....	158	фагоцитоз .....	120
белок А .....	163	миелокарициты .....	153	факторы иммуноregуляции .....	187
бета-эндорфин .....	176	милиацин .....	153	флавоноиды .....	140
ванадий .....	203	моноклеары .....	120, 140, 158	хорионический гонадотропин .....	181
водные извлечения .....	140	моноциты .....	120	хроническое облучение .....	226
врожденный иммунитет .....	226	мутагенный эффект .....	153	цитокиноподобные вещества .....	163, 169
гелевая форма .....	126	мутация .....	196	цитокины .....	140, 163, 169, 191, 226
ген TP53 .....	196	невынашивание беременности .....	181	цитокины Th2 .....	210
гормоны .....	169	нейтрофилы .....	120	эндогенная опиоидная система .....	120
гуморальный иммунитет .....	126	ожирение .....	133	эндоморфины .....	120
дети .....	217	опиоидные пептиды .....	176	β-катенин .....	133
динорфин А .....	176	острый миелоидный лейкоз .....	196	В-клетки .....	181
иммунный статус школьников .....	210	плазма .....	187	CD19 <sup>+</sup> лимфоциты .....	210
иммуноглобулины .....	169, 210	полиморфизм генов .....	191	CD4 <sup>+</sup> Т-лимфоциты памяти .....	115
иммунологическая реактивность .....	203	прогноз .....	196	Fc-фрагменты IgG .....	187
иммуномодулятор .....	126	пролиферация .....	176	GM-CSF .....	158
иммуноregуляция .....	120	проточная цитометрия ...	115, 158, 181, 203	IL-6 .....	158
иммуноферментный анализ .....	163, 169	ранние миелоидные супрессорные		LPS .....	158
ионизирующее излучение .....	153	клетки .....	158	PGC-1α .....	115
клеточный иммунитет .....	126	ревматоидный фактор .....	187	S. aureus .....	163, 169
кожные тесты .....	217	регуляторные CD4 <sup>+</sup> Т-лимфоциты .....	115	WNT-сигнальный путь .....	133
конвенциональные					
CD4 <sup>+</sup> Т-лимфоциты .....	115				



## XII Всероссийская школа по клинической иммунологии

### «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

### Тематика «Инфекционная Иммунология»

31 января – 6 февраля 2021 года  
Пушкинские Горы, Псковская область

#### Организаторы:

Министерство здравоохранения  
Российской Федерации

Российская Академия Наук

Федеральная служба по надзору  
в сфере защиты прав потребителей  
и благополучия человека

Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга  
Администрация Псковской области

\*\*\*\*\*

ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России  
Институт экспериментальной медицины  
НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора  
Первый Санкт-Петербургский государственный  
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

\*\*\*\*\*

Российское научное общество иммунологов  
Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов  
Российское цитокиновое общество  
Ассоциация специалистов и организаций  
лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины»  
Санкт-Петербургское региональное отделение Всероссийской Общественной  
Организации – Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов

#### В программе школы:

- Лекции ведущих российских иммунологов
- Лекции зарубежных специалистов
- Семинары по практическим вопросам иммунологии

#### Пакет слушателя включает:

- Посещение лекций и семинаров
- Проживание
- 3-разовое питание
- Трансфер Псков – Пушкинские Горы и обратно

**Всем слушателям будут выданы удостоверения о тематическом усовершенствовании установленного образца и зарегистрированные на сайте НМО [www.sovetnmo.ru](http://www.sovetnmo.ru) получают 14 зачетных единиц (кредитов) по специальности: «аллергология и иммунология»**

#### Координатор проекта:

**Председатель СПб РО РААКИ, академик РАН, Тололян Арег Артемович**

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

тел./факс: (812) 232-00-66

e-mail: [totolian@spbraaci.ru](mailto:totolian@spbraaci.ru)

**Заявки подавать до 1 декабря 2020 года.**

**Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна**

Тел./факс: (812) 233-08-58

e-mail: [shkola@spbraaci.ru](mailto:shkola@spbraaci.ru)

Адрес для корреспонденции: 197101, Санкт-Петербург, а/я 130, СПб РО РААКИ

[www.spbraaci.ru](http://www.spbraaci.ru)

[www.allergologi-immunologi.ru](http://www.allergologi-immunologi.ru)



**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:  
ПРЕССА РОССИИ – 15590**

ISSN 1028-7221



9 771234 567898