

2021

Официальный журнал
Российского Научного Общества Иммунологов

25
лет

**РОССИЙСКИЙ
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ**

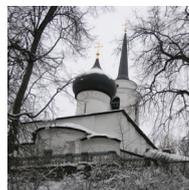


**RUSSIAN JOURNAL
OF IMMUNOLOGY**

Official Journal
of Russian Society of Immunology

Volume 24
Number 2

2021



XII Всероссийская школа по клинической иммунологии «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

Тематика «Инфекционная Иммунология»

30 января – 5 февраля 2022 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 получают 14 зачетных единиц (кредитов) по специальности: «аллергология и иммунология»

Координатор проекта:

**Председатель СПб РО РААКИ, академик РАН,
Тотolian 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

Заявки подавать до 1 декабря 2021 года.

Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна
Тел./факс: (812) 233-08-58, e-mail: shkola@spbraaci.ru
Адрес для корреспонденции:
197101, Санкт-Петербург, а/я 130, СПб РО РААКИ
www.spbraaci.ru, www.allergologi-immunologi.ru

В XII Всероссийской школе по клинической иммунологии «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ», тематика «Инфекционная Иммунология», которая будет проходить с 30 января по 5 февраля 2022 года, Пушкинские Горы, Псковская область, могут участвовать только вакцинированные от коронавируса с QR-кодом, действующим на данный момент!



РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИММУНОЛОГОВ
(РНОИ)

РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

апрель-июнь

2021, том 24

№. 2

Основан в 1996 году

RUSSIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY
(RSI)

**RUSSIAN
JOURNAL OF IMMUNOLOGY**

**ROSSIYSKIY
IMMUNOLOGICHESKIY
ZHURNAL**

April-June

2021, volume 24

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. Sizyakina – 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. Shmigel – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Professor, Department of Immunology, Perm State 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 02.09.2021. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing. Printed sheets 25.5. Circulation 2000 copies. (1st 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

- Иванов П.А., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Малащенко В.В., Шунькин Е.О., Норкин И.К., Хлусов И.А., Литвинова Л.С.
РОЛЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ/СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕГУЛЯЦИИ КРОВЕТВОРЕНИЯ В 3D-КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*..... 153
- Гаверилова Т.В., Оралова Д.А., Гейн О.Н., Черешнева М.В.
РОЛЬ МИЕЛОПЕПТИДА МП-4 В РЕГУЛЯЦИИ АНТИТЕЛОГЕНЕЗА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ ПРИ СТРЕССЕ..... 161
- Забокрицкий Н.А.
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЦИТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МЕТАБОЛИТОВ И КРИТЕРИИ ОТБОРА ШТАММОВ *VACILLUS SUBTILIS* ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ НОВОГО ИММУНОТРОПНОГО БИОГЕПАТОПРОТЕКТОРА 167
- Логина Н.П., Тройнич Я.Н., Чарушина Ю.А., Заморина С.А.
ВЛИЯНИЕ ГЛИКОДЕЛИНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ВТОРИЧНЫХ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO* 175
- Осиков М.В., [Симомян Е.В.], Агеева А.А., Никушкина К.В.
ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА В СОСТАВЕ ОРИГИНАЛЬНОЙ ДЕРМАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ НА ПОКАЗАТЕЛИ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ 181
- Плехова Н.Г., Зиновьев С.В., Просекова Е.В., Радьков И.В.
ЭПИПЛЕКСУСНЫЕ И ПАРЕНХИМАТОЗНЫЕ МАКРОФАГИ НЕРВНОЙ ТКАНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ УШИБЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЛЕГКОЙ СТЕПЕНИ 189
- Храмцова Ю.С., Тюменцева Н.В., Арташян О.С., Юшков Б.Г.
ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ИММУНОПРИВИЛЕГИРОВАННОГО ОРГАНА (СЕМЕННИКА) НА ПОВРЕЖДЕНИЕ..... 195
- Шаравьева И.Л., Гейн С.В.
ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СТРЕССА НА АПОПТОЗ CD4⁺CD8⁺ ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ *IN VIVO* 203
- Давыдова Е.В., Осиков М.В., Бакеева А.Е., Кайгородцева Н.В.
АУТОИММУННЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ..... 209
- Кузьмичева Н.А., Михайлова И.В., Чайникова И.Н., Пушкарева Л.А., Филиппова Ю.В., Смолягин А.И.
ВОЗДЕЙСТВИЕ ПАССИВНОГО КУРЕНИЯ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРЫС ВИСТАР И ИХ ПОТОМСТВА 215
- Гриценко В.А., Тяпаева Я.В., Добрынина М.А., Зурочка А.В.
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИЦИДНЫХ СВОЙСТВ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ – ZP2 В ОТНОШЕНИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ РАЗНОЙ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ 221
- Суховей Ю.Г., Костоломова Е.Г., Унгер И.Г., Акунеева Т.В.
ИНДУЦИРОВАНИЕ РЕГЕНЕРАТОРНО-ОСТЕОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК PDLSC *IN VITRO* 229
- Кныш С.В., Маркелова Е.В., Зенина А.А., Костюшко А.В., Федянина Л.Н.
РОЛЬ БЕЛКА S100b И BDNF В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ У ЛИЦ С ИНДУЦИРОВАННОЙ ИММУНОКОМПРОМЕТАЦИЕЙ 237
- Бердюгина О.В.
ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОФИЛЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ УДАЛЕНИИ ТУБЕРКУЛЕМЫ ЛЕГКИХ..... 243
- Филиппова Ю.Ю., Бурмистрова А.Л.
ЦИТОКИНО-НЕЙРОЭНДОКРИННАЯ СИГНАТУРА ПЕРИФЕРИИ В КОНТЕКСТЕ ФЕНОМЕНА «УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ» ПРИ РАССТРОЙСТВАХ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА И ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА..... 249
- Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Пашинина О.А., Морозова Н.В.
АНТИЦИТОКИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ И СПОСОБНОСТЬ К ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ СТАФИЛОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СЕКРЕТА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У МУЖЧИН С СИМПТОМАМИ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ 257
- Сорокин Ю.А., Гизингер О.А.
ДИНАМИКА КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ВУЛЬВОВАГИНАЛЬНЫМ КАНДИДОЗОМ НА ФОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЙ КАВИТИРОВАННЫМ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ РАСТВОРОМ 261

<i>Зиганшина М.М., Хайдуков С.В.</i> ВИЗУАЛИЗАЦИЯ V10-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ.....	269
<i>Кодинцева Е.А., Аклеев А.А., Блинова Е.А., Аклеев А.В.</i> ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ЛЮДЕЙ, ХРОНИЧЕСКИ ОБЛУЧЕННЫХ <i>IN UTERO</i> И ПОСТНАТАЛЬНО, В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ.....	275
<i>Лагерева Ю.Г., Палицына О.В., Ищенко Н.В.</i> ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БАЗОВОГО СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В НЕСТИМУЛИРОВАННЫХ ОБРАЗЦАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ	283
<i>Бекпергенова А.В., Бондаренко Т.А., Перунова Н.Б., Челпаченко О.Е., Никифоров И.А.</i> СВЯЗЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СПЕРМОГРАММЫ МУЖЧИН С ХРОНИЧЕСКИМ БАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРОСТАТИТОМ С УРОВНЕМ ЛОКАЛЬНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ФАКТОРОВ	291
<i>Коркмазов М.Ю., Дубинец И.Д., Ленгина М.А., Солодовник А.В.</i> ЛОКАЛЬНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А У ПАЦИЕНТОВ С АДЕНОИДИТОМ, РИНОСИНОСИТОМ И ОБОСТРЕНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ГНОЙНОГО СРЕДНЕГО ОТИТА НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ	297
<i>Хисамова А.А., Гизингер О.А., Корнова Н.В., Зырянова К.С., Коркмазов А.М., Белошангин А.С.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ КУРКУМИНОМ И МЕТИОНИНОМ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ РАЗРАБАТЫВАЕМЫХ КАПСУЛ	305
<i>Королевская Л.Б., Сайдакова Е.В., Власова В.В., Шмагель К.В.</i> ОСОБЕННОСТИ ПОТРЕБЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ СУБПОПУЛЯЦИЯМИ CD4⁺T-ЛИМФОЦИТОВ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ, ПОЛУЧАЮЩИХ АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ	311
<i>Саркисян Н.Г., Чумаков Н.С., Хлыстова К.А., Дроздова Л.И., Юффа Е.П.</i> СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМИ МЕТОДИКАМИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПЕПТИДСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА И ПОЛИОКСИДОНИЯ.....	317
<i>Латюшина Л.С., Малышева Л.Ю., Пиотрович А.В., Бережная Е.С.</i> ВЛИЯНИЕ ТОПИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ МУКОЗАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКОЙ СТОМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ.....	323
<i>Иванова Е.В., Воронкова И.П., Бондаренко Т.А., Таренкова И.В.</i> ИММУНОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ С РАЗЛИЧНЫМ МИКРОЭЛЕМЕНТНЫМ СОСТАВОМ.....	331
<i>Гизингер О.А., Лакницкая А.О., Зиганшин О.Р.</i> ДИНАМИКА ФАКТОРОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ, ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СТРЕПТОДЕРМИЕЙ, МЕТОДЫ КОРРЕКЦИИ	337
Юбилей.....	343
Правила для авторов	345
Авторский указатель	348
Предметный указатель.....	348

CONTENTS

Short communications

<i>Ivanov P.A., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Malaschenko V.V., Shunkin E.O., Norkin I.K., Khlusov I.A., Litvinova L.S.</i> ROLE OF MESENCHYMAL STROMAL/STEM CELLS IN REGULATION OF HEMOSTASIS IN 3D <i>IN VITRO</i> CULTURE	153
<i>Gavrilova T.V., Oralova D.A., Gein O.N., Chereshneva M.V.</i> ROLE OF MP-4 MYELOPEPTIDE IN REGULATION OF ANTIBODY PRODUCTION AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF MACROPHAGES UNDER STRESS CONDITIONS	161
<i>Zabokritskiy N.A.</i> EXPERIMENTAL EVALUATION OF CYTOPROTECTIVE EFFECT OF PROBIOTIC METABOLITES AND SELECTION CRITERIA OF <i>BACILLUS SUBTILIS</i> STRAINS FOR DEVELOPMENT OF NEW IMMUNOTROPIC BIOHEPATOPROTECTOR	167
<i>Loginova N.P., Troynich Ya.N., Charushina Yu.A., Zamorina S.A.</i> INFLUENCE OF GLYCODELIN ON MORPHOFUNCTIONAL STATE OF SECONDARY IMMUNE ORGANS IN EXPERIMENTAL MODEL OF ALLOGENEIC TRANSPLANTATION	175
<i>Osikov M.V., [Simonyan E.V.], Ageeva A.A., Nikushkina K.V.</i> EFFECT OF MELATONIN INCLUDE INTO ORIGINAL DERMAL FILM UPON ADAPTIVE IMMUNITY IN EXPERIMENTAL THERMAL TRAUMA	181
<i>Plekhova N.G., Zinoviev S.V., Prosekova E.V., Radkov I.V.</i> EPILEPTIC PHAGOCYTES OF NERVOUS TISSUE IN EXPERIMENTAL BRAIN CONTUSION	189
<i>Khramtsova Yu.S., Tyumentseva N.V., Artashyan O.S., Yushkov B.G.</i> REACTION TO DAMAGE OF CONNECTIVE TISSUE IN IMMUNOPRIVILEGED ORGAN (TESTIS)	195
<i>Sharavieva I.L., Gein S.V.</i> INFLUENCE OF DIFFERENT KINDS OF STRESS ON APOPTOSIS OF CD4⁺/CD8⁺ LYMPHOCYTES UPON <i>IN VIVO</i> BLOCKAGE OF OPIATE RECEPTORS	203
<i>Davydova E.V., Osikov M.V., Bakeeva A.E., Kaigorodtseva N.V.</i> AUTOIMMUNE PROFILE OF RAT BLOOD IN EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS	209
<i>Kuzmicheva N.A., Mikhailova I.V., Chaynikova I.N., Pushkareva L.A., Filippova Yu.V., Smolyagin A.I.</i> EFFECT OF SECOND-HAND SMOKE ON THE IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF WISTAR RATS AND THEIR OFFSPRING	215
<i>Gritsenko V.A., Tyapaeva Ya.V., Dobrynina M.A., Zurochka A.V.</i> COMPARATIVE ANALYSIS OF BACTERICIDAL PROPERTIES OF SYNTHETIC PEPTIDES FROM THE ACTIVE CENTER OF GM-CSF – ZP2 AGAINST DIFFERENT GRAM-NEGATIVE BACTERIA	221
<i>Sukhovoy Yu.G., Kostolomova E.G., Unger I.G., Akuneeva T.V.</i> <i>IN VITRO</i> INDUCTION OF REGENERATIVE AND OSTEOGENIC ACTIVITY OF PDLSC CELLS	229
<i>Knysh S.V., Markelova E.V., Zenina A.A., Kostyushko A.V., Fedyanina L.N.</i> ROLE OF S100β PROTEIN AND BDNF IN IMMUNOPATHOGENESIS OF NEUROINFLAMMATION IN THE PATIENTS WITH INDUCED IMMUNOCOMPROMISED STATE	237
<i>Berdyugina O.V.</i> TRANSFORMATION OF THE T-LYMPHOCYTE PROFILE IN PERIPHERAL BLOOD UPON RESECTION OF TUBERCULOUS LUNG GRANULOMA	243
<i>Filippova Yu.Yu., Burmistrova A.L.</i> CYTOKINE-NEUROENDOCRINE PERIPHERAL SIGNATURE IN THE CONTEXT OF THE “ACCELERATED AGEING” PHENOMENON IN AUTISM SPECTRUM AND SCHIZOPHRENIA SPECTRUM DISORDERS	249
<i>Kartashova O.L., Pashkova T.M., Pashinina O.A., Morozova N.V.</i> ANTICYTOKINE ACTIVITY AND THE ABILITY TO PRODUCE CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES OF STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM THE PROSTATIC SECRETIONS IN MEN WITH SYMPTOMS OF UROGENITAL INFECTION	257
<i>Sorokin Yu.A., Gizinger O.A.</i> DYNAMICS OF CELLULAR FACTORS OF INNATE IMMUNITY AND ANTIOXIDANT PROTECTION IN THE PATIENTS WITH CHRONIC RECURRENT VULVOVAGINAL CANDIDOSIS UPON EXPOSURE TO CAVITATED PHYSIOLOGICAL SOLUTION	261
<i>Ziganshina M.M., Khaidukov S.V.</i> VISUALIZATION OF B10 REGULATORY CELLS IN PERIPHERAL BLOOD IN PHYSIOLOGICAL PREGNANCY	269

<i>Kodintseva E.A., Akleyev A.A., Blinova E.A., Akleyev A.V.</i> CYTOKINE PROFILE IN THE SUBJECTS AFTER LONG-TERM <i>IN UTERO</i> AND POSTNATAL EXPOSURE TO CHRONIC IRRADIATION	275
<i>Lagereva Yu.G., Palitsyna O.V., Ischenko N.V.</i> AGE-DEPENDENT PATTERNS OF THE BASELINE CYTOKINE LEVELS IN UNSTIMULATED PERIPHERAL BLOOD SAMPLES	283
<i>Bekpergenova A.V., Bondarenko T.A., Perunova N.B., Chelpachenko O.E., Nikiforov I.A.</i> RELATIONSHIPS BETWEEN SPERMOGRAM INDEXES IN MALES WITH CHRONIC BACTERIAL PROSTATITIS AND THE LEVELS OF LOCAL ANTIMICROBIAL FACTORS	291
<i>Korkmazov M.Yu., Dubinets I.D., Lengina M.A., Solodovnik A.B.</i> LOCAL CONCENTRATIONS OF SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A IN PATIENTS WITH ADENOIDITIS, RHINOSINUSITIS AND EXACERBATION OF CHRONIC PURULENT OTITIS MEDIA WHEN USING PHYSIATRIC METHODS IN COMPLEX THERAPY	297
<i>Khisamova A.A., Gizinger O.A., Kornova N.V., Zyryanova K.S., Korkmazov A.M., Beloshangin A.S.</i> STUDIES OF IMMUNOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL EFFICIENCY OF THE THERAPY OF CURCUMIN AND METHIONINE IN THE DEVELOPED CAPSULES	305
<i>Korolevskaya L.B., Saidakova E.V., Vlasova V.V., Shmagel K.V.</i> GLUCOSE UPTAKE BY CD4⁺T CELL SUBSETS IN HIV-INFECTED PATIENTS RECEIVING HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY (HAART)	311
<i>Sarkisyan N.G., Chumakov N.S., Khlystova K.A., Drozdova L.I., Yuffa E.P.</i> COMPARATIVE ANALYSIS OF TREATMENT EFFICIENCY IN CHRONIC PERIODONTITIS USING EXPERIMENTAL THERAPIES WITH PEPTIDE-CONTAINING PREPARATION AND POLYOXIDONIUM	317
<i>Latyushina L.S., Malysheva L.Yu., Piotrovich A.V., Berezhnaya E.S.</i> EFFECT OF LOCAL IMMUNOTHERAPY ON THE INDEXES OF MUCOSAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH SURGICAL DENTAL PATHOLOGY	323
<i>Ivanova E.V., Voronkova I.P., Bondarenko A.I., Tarenkova I.V.</i> IMMUNOTROPIC EFFECT OF MEDICINAL PLANTS WITH DIFFERENT MICROELEMENTAL COMPOSITION	331
<i>Gizinger O.A., Laknitskaya A.O., Ziganshin O.R.</i> DYNAMICS OF ANTIOXIDANT PROTECTION FACTORS, CYTOKINES IN PATIENTS WITH CHRONIC STREPTODERMIA, CORRECTION METHODS	337
Anniversary	343
Instructions to Authors	345
Author index	348
Subject index	348

РОЛЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ/СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕГУЛЯЦИИ КРОВЕТВОРЕНИЯ В 3D-КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Иванов П.А.¹, Юрова К.А.¹, Хазиахматова О.Г.¹, Шуплецова В.В.¹, Малащенко В.В.¹, Шунькин Е.О.¹, Норкин И.К.¹, Хлусов И.А.^{1,2}, Литвинова Л.С.¹

¹ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Резюме. Статья посвящена исследованию роли мезенхимных стромальных/стволовых клеток (МСК) в формировании микроокружения для гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в условиях, имитирующих физиологическое костное ремоделирование в присутствии искусственных трехмерных матриц (Ra = 2-3 мкм) с кальций-фосфатным покрытием *in vitro*. Исследование проводилось с использованием экспериментальных образцов искусственных имплантатов, полученных в электролите из наночастиц гидроксиапатита (ГАП), изготовленных в институте физики прочности и материаловедения СО РАН. В работе были использованы культуральные и инструментальные методы исследования. Оценку фенотипического потенциала клеток проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Определение уровней цитокинов/хемокинов в супернатантах клеточных культур оценивали методом проточной флуориметрии. Выявление содержания кроветворных клеток в полях зрения, а также участков минерализации межклеточного матрикса проводили с использованием цитоморфометрии.

В ходе проведенного исследования было выявлено, что трехмерные матрицы с кальций-фосфатным покрытием *in vitro* инициируют формирование специфического микроокружения МСК, потенцирующего увеличение количества ГСК с фенотипом CD45⁺CD34⁺ (14-е сутки), рост числа клеток с морфологией гемопоэтических и появление очагов минерализации межклеточного матрикса (21-е сутки). Изменение числа кроветворных клеток в полях зрения происходило, преимущественно за счет опосредованного влияния гемопоэтинов SCF и G-CSF, на фоне снижения проапоптотического фактора TRAIL. Также было установлено, что МСК снижают уровень провоспалительных цитокинов (IFN γ , TNF α , IP-10, IL-2, IL-6) в среде культивирования в присутствии искусственных 3D-матриц с кальций-фосфатным покрытием. Выявленные особенности функционирования МСК в условиях, имитирующих физиологическое костное ремоделирование, при сокультивировании с трехмерными матриксами (Ra = 2-3 мкм) показывают значимое влияние МСК на регуляцию локального микро-

Адрес для переписки:

Литвинова Лариса Сергеевна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта»
236001, Россия, г. Калининград, ул. Гайдара, б,
к. 302.
Тел.: 8 (4012) 595-595 (доб. 6134).
E-mail: larisalitinova@yandex.ru

Address for correspondence:

Litvinova Larisa S.
Immanuel Kant Baltic Federal University
236001, Russian Federation, Kaliningrad, Gaidar str.,
6,302.
Phone: 7 (4012) 595-595 (acc. 6134).
E-mail: larisalitinova@yandex.ru

Образец цитирования:

П.А. Иванов, К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова, В.В. Шуплецова, В.В. Малащенко, Е.О. Шунькин, И.К. Норкин, И.А. Хлусов, Л.С. Литвинова «Роль мезенхимных стромальных/стволовых клеток в регуляции кроветворения в 3D-культуре *in vitro*» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 153-160.
doi: 10.46235/1028-7221-992-ROS

© Иванов П.А. и соавт., 2021

For citation:

P.A. Ivanov, K.A. Yurova, O.G. Khaziakhmatova, V.V. Shupletova, V.V. Malaschenko, E.O. Shunkin, I.K. Norkin, I.A. Khlusov, L.S. Litvinova "Role of mesenchymal stromal/stem cells in regulation of hemopoiesis in 3D *in vitro* culture", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 153-160.
doi: 10.46235/1028-7221-992-ROS

DOI: 10.46235/1028-7221-992-ROS

окружения ГСК посредством модулирующего эффекта цитокинов, хемокинов и факторов роста, обеспечивающих межклеточное взаимодействие.

Появление участков минерализации межклеточного матрикса, наблюдаемое при культивировании МСК в присутствии 3D-матрикса, имитирующего минеральное вещество костной ткани, свидетельствует также о формировании остеобластных ниш в условиях культивирования *in vitro*.

Полученные результаты имеют важное значение для выявления особенностей функционирования нишевых территорий ГСК и роли МСК в их формировании и поддержании микроокружения.

Полученные результаты могут найти практическое применение при разработке новых классов медицинских изделий, способных обеспечить эффективную остеоинтеграцию.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные/стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, остеобласты, очаги минерализации, костная ткань, костное ремоделирование

ROLE OF MESENCHYMAL STROMAL/STEM CELLS IN REGULATION OF HEMOTORATION IN 3D *IN VITRO* CULTURE

Ivanov P.A.^a, Yurova K.A.^a, Khaziakhmatova O.G.^a, Shupletsova V.V.^a, Malaschenko V.V.^a, Shunkin E.O.^a, Norkin I.K.^a, Khlusov I.A.^{a, b}, Litvinova L.S.^a

^a Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

^b Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. The article is devoted to studying the role of mesenchymal stromal cells in formation of microenvironment for hematopoietic stem cells under the conditions mimicking physiological bone remodeling in presence of artificial three-dimensional matrices ($Ra = 2-3 \mu m$). The study was carried out using experimental samples of artificial implants obtained in electrolyte from hydroxyapatite nanoparticles (HAP) produced at the Institute of Strength Physics and Materials Science (Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences). The work included cultural and instrumental research techniques. Phenotypic profile of cells was assessed by flow cytometry. Determination of cytokine/chemokine levels from cell culture supernatants was assessed by flow fluorimetry. Detection of hematopoietic cells in the vision fields, as well as areas of extracellular matrix mineralization was carried out by means of cytomorphometry.

It was revealed that the 3D matrices with a calcium phosphate coating initiate the *in vitro* formation of specific microenvironment of MSCs, resulting in the increased numbers of HSCs with the $CD45^+CD34^+$ phenotype (at 14 days), an increased number of cells with hematopoietic morphology and evolving foci of extracellular matrix mineralization of the (at 21 days). Changed numbers of hematopoietic cells per vision field occurred, mainly, due to indirect effect of hematopoietic factors (SCF and G-CSF), along with decrease of proapoptotic factor TRAIL. It was also found that MSCs reduce the level of proinflammatory cytokines ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IP-10, IL-2, IL-6) in culture medium in the presence of artificial 3D calcium-phosphate-coated matrices. The revealed features of MSC functioning under the conditions simulating physiological bone remodeling, upon co-cultures with three-dimensional matrices ($Ra = 2-3 \mu m$), have shown a significant effect of MSCs upon regulation of HSCs by local microenvironment, through distinct modulating effects of cytokines, chemokines, and growth factors that provide intercellular interactions. Development of extracellular matrix mineralization areas during MSC cultivation in the presence of 3D matrices imitating mineral substance of bone tissue also indicates the formation of osteoblastic niches under the *in vitro* cultivation conditions.

The results obtained are important in order to assess functions of hematopoietic niches and the role of MSCs in their development and maintenance of the microenvironment.

The results obtained may find practical application in development of new classes of medical devices able to provide effective osseointegration.

Keywords: mesenchymal stromal/stem cells, hematopoietic stem cells, osteoblasts, mineralization foci, bone tissue, bone remodeling

Работа выполнена при финансовой поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-2495.2020.7 (Балтийский федеральный университет им. И. Канта).

Введение

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – важные структурные элементы в физиологии костной ткани, обеспечивающие формирование остеокластов. Последние являются ключевыми компонентами физиологического процесса костного ремоделирования в фазу резорбции [11]. Основными регуляторами ниши ГСК являются остеобласты – костно-формирующие клетки, которые обеспечивают поддержание покоящейся популяции примитивных ГСК в костном мозге [12].

В то же время роль мезенхимных стромальных/стволовых клеток (МСК) в создании и поддержании микроокружения для существования ниш ГСК до конца не ясна. Тем не менее их функция в обеспечении выживаемости ГСК и регуляции их дифференцировочного потенциала за счет секреции факторов роста, межклеточного взаимодействия и продукции матричных структурных белков является очевидной [10].

Исследование структурных и молекулярных особенностей нишевых микротерриторий МСК играет важную роль для выявления особенностей процессов их дифференцировки и аспектов молекулярного регулирования репарации костной ткани.

Таким образом, направленное изучение компонентов микроокружения МСК и их роли в регуляции гемопоэтической ниши является перспективным направлением, актуальным в контексте изучения фундаментальных механизмов биологии стволовых клеток, а также для эффективного развития регенеративной медицины.

В связи с вышесказанным **целью проведенного исследования** явилась оценка роли клеточно-молекулярных факторов МСК в формировании микроокружения для гемопоэтических стволовых клеток в 3D-культуре *in vitro*.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила культура МСК, выделенных из жировой ткани человека, сокультивируемых с трехмерным матриксом с кальций-фосфатным покрытием, что моделирует границу раздела «кость/надкостница/костный мозг».

Работа с первичными культурами МСК, полученными из подкожной жировой клетчатки

человека, проводилась с соблюдением всех биоэтических норм и в соответствии с разрешением локального этического комитета Инновационного парка БФУ имени И. Канта (протокол № 1 от 22.03.2021) с получением информированного согласия на участие в исследовании и использовании биопроб.

Для проведения эксперимента использовались клетки с доказанной принадлежностью к популяции МСК в соответствии с минимальными критериями, установленными Международным обществом клеточной терапии (ISCT) [3]. МСК имели фибробластоидную морфологию и адгезировались к пластику при стандартных условиях культивирования. По результатам фенотипической идентификации более 97% клеток экспрессировали молекулы CD73⁺, CD90⁺ или CD105⁺ и менее 3% клеток в культуре несли на своей поверхности маркеры гемопоэтических клеток – CD45, CD34, CD20 и CD14. Дифференцировочная идентификация клеток при окрашивании монослоя, после 21 дневного культивирования в дифференцировочной среде, выявила способность выделенных клеток к дифференцировке в клетки мезодермальной природы (остео-, адипо- и хондро направлением). Жизнеспособность всех исследуемых культур была 95%.

Исследование проводилось с использованием экспериментальных образцов искусственных имплантатов, имитирующих модель костного ремоделирования, с микродуговым кальций-фосфатным покрытием [9], полученных в электролите из наночастиц гидроксиапатита (ГАП), изготовленных в институте физики прочности и материаловедения СО РАН [4].

Культивирование МСК проводили в соответствии с задачами исследования, с соблюдением основных условий культивирования клеточной культуры при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ в течение 21 суток. Для постановки эксперимента подготавливали полную питательную среду (ППС) для культивирования (5% FBS, 400 Е/мкг/мл пенициллин/стрептомицин, 2 мМ L-глутамин, αMEM).

Группа контроля: культуры МСК жировой ткани, культивируемые *in vitro* на пластике без трехмерного матрикса в полной питательной среде на основе αMEM. Экспериментальная группа: культуры МСК жировой ткани, культивируемые *in vitro*, в присутствии искусственных 3D-матрикса (Ra = 2–3 мкм) в полной питательной среде на основе αMEM.

Оценку жизнеспособности, подсчет числа клеток, а также фенотипическую идентификацию основных показателей стромальных и гемо-

поэтических клеток (поверхностных маркеров CD105, CD73, CD90, CD45, CD14, CD20, CD34) проводили на 14-е сутки культивирования методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре MACS Quant FL7 system (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Германия), согласно протоколам производителя (Guava ViaCount reagent (Millipore, США), Phenotyping Kit human (Miltenyi Biotec, Германия).

Количественное определение цитокинов/хемокинов с супернатантах клеточных культур оценивали на 14-е сутки культивирования методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-Plex Assays, Bio-Rad, США).

По истечении 21 дня культивирования производили морфологическую оценку клеточных культур для определения участков минерализации межклеточного матрикса, окрашивая клеточные культуры 2% раствором ализаринового красного S (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции фирмы-производителя, предварительно фиксируя клеточный монослой в забуференном 10% формалине, затем высушивали на воздухе. Далее определяли клетки, имеющие морфологию кровяных (диаметр – 10-15 мкм, наличие ядра).

Для выявления остеогенного потенциала, проводили скрининговый морфометрический анализ с использованием фиксированных культур МСК жировой ткани, прошедших остеогенную дифференцировку в среде StemPro Osteogenesis Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на пластике (2D-модель) и в присутствии искусственных 3D-матрикса (Ra = 2-3 мкм) с оценкой содержания кровяных клеток и участков минерализации межклеточного матрикса. В качестве контроля были использованы МСК, культивируемые на пластике без 3D-матрикса в полной ростовой среде на основе α MEM.

Цитологические препараты фотографировали в проходящем свете на микроскопе AxioScope 40 (Carl Zeiss, Jena, Germany) при увеличении 40-100 с помощью фотоаппарата Canon PowerShot G10 (Canon Inc., Япония) с разрешением 14,7 мегапикселей и фирменного аппаратно-программного комплекса AxioVision 4.6 (Carl Zeiss). Светочувствительность камеры на микроскопе была одинакова на протяжении всего эксперимента. Цитоморфометрическое исследование (площади, числа и оптической плотности окрашенных участков) проводили с использованием инструментов компьютерной программы Adobe Photoshop CS6 (Adobe Inc., США).

Статистическая обработка полученных результатов была проведена с использованием методов статистического описания, а также методов проверки статистических гипотез, использующиеся в стандартных пакетах IBM SPSS Statistics 20. Для анализа исследуемых выборок данных применяли гипотезу нормальности распределения (Колмогорова–Смирнова). Рассчитывали параметры распределений: медиану (Me), 25%-ный ($Q_{0,25}$) и 75%-ный ($Q_{0,75}$) квартили. Оценка статистической достоверности различий между исследуемыми выборками, которые не подчиняются закону нормального распределения, был использован критерий Манна–Уитни для независимых выборок. Для выявления корреляционных взаимосвязей между исследуемыми значениями был проведен корреляционный анализ Спирмена (r). Различия считали статистически значимыми на уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В контрольной культуре по истечении 14 суток культивирования, содержание клеток CD45⁺CD34⁺ было равным 0,32 (0,25-0,35) %. В экспериментальной 3D-культуре число ГСК CD45⁺CD34⁺ было в 2 раза (0,61 (0,060-0,082) %) выше контрольных значений. Повышение числа ГСК происходило на фоне снижения содержания клеток с фенотипом CD73⁺CD90⁺CD105⁺.

Нами была выявлена обратная корреляционная взаимосвязь между числом клеток CD45⁺CD34⁺ и содержанием клеток, экспрессирующих на мембране молекулы CD90 ($r = -0,80$; $p < 0,01$; $n = 12$) и CD105 ($r = -0,76$; $p < 0,01$; $n = 12$).

По истечении 14 суток культивирования было выявлено статистически значимое снижение уровня провоспалительных факторов (IFN γ , TNF α , IP-10, IL-6) ($p_1 < 0,05$) и проапоптотического медиатора TRAIL ($p_1 < 0,05$) в 3D-культуре по сравнению с контрольными значениями (табл. 1). Содержание гемопоэтических факторов (G-CSF и SCF), напротив, повышалось по сравнению со значениями, полученными при оценке контрольных 2D-культур ($p_1 < 0,05$).

Корреляционный анализ позволил выявить прямую зависимость между содержанием факторов G-CSF и SCF и числом гемопоэтических клеток CD45⁺CD34⁺ ($r = 0,68$; $r = 0,75$, $p < 0,05$; $n = 12$).

При проведении морфометрического исследования культур МСК (21-е сутки) в остеогенной дифференцировочной среде (2D-модель) количество клеток с морфологией кровяных соответствовало контрольным значениям, однако

ТАБЛИЦА 1. СЕКРЕЦИЯ ЦИТОКИНОВ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ 14 СУТОК КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С МОДЕЛЬНЫМИ ОБРАЗЦАМИ, НЕСУЩИМИ МИКРОДУГОВОЕ ПОКРЫТИЕ РАЗНОЙ ШЕРОХОВАТОСТИ НА ТИТАНОВОЙ ПОДЛОЖКЕ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. SECRETION OF CYTOKINES BY MSCS FROM HUMAN ADIPOSE TISSUE AFTER 14 DAYS OF CULTIVATION WITH MODEL SAMPLES BEARING A MICROARC COATING OF DIFFERENT ROUGHNESS ON A TITANIUM SUBSTRATE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Варианты культивирования МСК Variants of cultivation of MSCs	G-CSF	SCF	IFN γ	TNF α	IP-10	IL-2	IL-6	TRAIL
2D-контроль роста клеток в стандартной ППС 2D control of cell growth in standard complete nutrient medium n = 6	15,83 (14,47-63,61)	3,92 (3,61-4,66)	65,46 (52,69-157,60)	2,12 (2,035-3,940)	19,25 (16,595-48,460)	3,25 (3,210-3,305)	484,83 (359,375-601,915)	4,37 (3,04-5,37)
3D-культура в присутствии модельных матриц 3D culture in the presence of model matrices, n = 3	24,39* (15,82-36,31) $p_1 < 0,05$	11,27* (4,68-11,30) $p_1 < 0,05$	28,07* (20,60-35,07) $p_1 < 0,05$	1,17* (0,81-1,82) $p_1 < 0,05$	8,23* (7,21-9,33) $p_1 < 0,05$	–	380* (286-505) $p_1 < 0,05$	2,71* (2,49-2,71) $p_1 < 0,05$

Примечание. p_1 – статистически достоверные различия по сравнению с контрольными значениями, полученными при оценке 2D-культур, в соответствии с критерием Манна–Уитни на уровне значимости $p < 0,05$.

Note. p_1 , statistically significant differences compared to the control values obtained when evaluating 2D cultures, in accordance with the Mann–Whitney test at a significance level of $p < 0.05$

ТАБЛИЦА 2. ПЛОЩАДЬ МИНЕРАЛИЗАЦИИ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА И ЧИСЛО КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК В 21-ДНЕВНОЙ *IN VITRO* КУЛЬТУРЕ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. MINERALIZATION AREA OF THE EXTRACELLULAR MATRIX AND THE NUMBER OF HEMATOPOIETIC CELLS IN A 21-DAY *IN VITRO* CULTURE OF ADIPOSE TISSUE MSCS OF HEALTHY VOLUNTEERS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Варианты культивирования МСК Variants of cultivation of MSCs	Суммарная площадь узлов минерализации (при окраске ализариновым красным), мм ² на лунку Total area of mineralization nodules (when stained with alizarin red), mm ² per well	Количество кроветворных клеток на 100 см ² снимка с поверхности лунок планшета Number of hematopoietic cells per 100 cm ² image taken from the surface of the plate wells
2D-контроль роста клеток в стандартной ППС 2D control of cell growth in standard complete nutrient medium n = 6	0 (0-0,15)	24 (18-27) $n_1 = 27$
3D-культура в присутствии модельных матриц 3D culture in the presence of model matrices n = 3	59,64 (21,26-88,47)* $p < 0,001$	98 (76-119)* $n_1 = 193$ $p < 0,001$

Примечание. n – число исследованных лунок; n_1 – число снимков

Note. n is the number of wells examined; n_1 , number of pictures.

отмечалось наличие участков минерализации межклеточного матрикса в полях зрения, суммарным размером 3,95 (1,86–6,61) см². Анализ культуры МСК жировой ткани в присутствии остеогенной среды и 3D-матрикса (Ra = 2–3 мкм) позволил выявить достоверное увеличение количества кроветворных клеток, по сравнению с контрольными значениями (на 190%) и культурами МСК в остеогенной дифференцировочной среде на пластике (195%).

Важно отметить отсутствие островков минерализации в контрольных культурах во всех направлениях поля зрения.

Также выявлено, что в полной ростовой среде на основе α MEM, в присутствии 3D-матрикса (Ra = 2–3 мкм) происходит формирование участков минерализации и регистрируется увеличение количества кроветворных клеток по сравнению с контрольными 2D-культурами ($p < 0,05$) (табл. 2).

Исследования подтверждают роль остеобластов в регуляции ниши ГСК. В ходе ряда проведенных экспериментальных работ было выявлено, что экспансия остеобластов связана с увеличением количества ГСК и, наоборот, условное удаление остеобластов связано с потерей ГСК в костном мозге и экстрамедуллярным гемопоэзе. Несмотря на эти работы, вклад остеобластных клеток, особенно зрелых остеобластов в поддержании ГСК является спорным [1]. Клеточные составляющие, формирующие нишу гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге остаются до конца неизвестны [5].

МСК обладают специфическими функциями, обеспечивая паракринное взаимодействие и формирование клеточных контактов, необходимых для сохранения и поддержания пула HSCs [8], что, вероятно, характеризует их как критических модуляторов микроокружения ниши ГСК.

По результатам проведенного исследования было выявлено, что искусственные 3D-матрицы влияют на моделирование фенотипического состава МСК, статистически достоверно повышая количество ГСК в культуре, на фоне снижения числа клеток, презентующих на клеточной мембране молекулы CD90⁺ и CD105⁺. Наличие отрицательных корреляционных взаимосвязей между содержанием клеток, несущих маркеры CD45⁺CD34⁺ с числом клеток с фенотипом CD90 ($r = -0,80$; $p < 0,01$; $n = 12$) и CD105 ($r = -0,76$; $p < 0,01$; $n = 12$), свидетельствует о сопряженности клеточно-молекулярных процессов, происходящих как в популяции стромальных, так и гемопоэтических клеток.

Снижение числа клеток, презентующих молекулы CD90⁺ и CD73⁺, на фоне увеличения

суммарной площади участков минерализации межклеточного матрикса, может свидетельствовать о дифференцировке стромальных клеток в остеобласты в присутствии искусственных 3D-матрикса (Ra = 2–3 мкм), имитирующих модель костного ремоделирования, что соответствует результатам, полученным ранее [4].

Изменение секрета МСК в присутствии трехмерных матрикса (по сравнению с контрольными значениями) свидетельствует об активном модулирующем влиянии искусственных имплантатов на МСК.

Как уже упоминалось ранее, МСК представляют собой гетерогенную популяцию мультипотентных клеток, которые обладают мощным иммуномодулирующим потенциалом, оказывая противовоспалительный эффект на соседние стромальные и гематопоэтические клетки [7]. В подтверждение вышесказанному, нами было выявлено снижение содержания провоспалительных цитокинов (IFN γ , TNF α , IP-10, IL-2, IL-6) в супернатантах 3D-модели на 14-е сутки культивирования.

Исследования последнего десятилетия показали, что при воздействии воспалительной среды МСК могут управлять местными и системными врожденными и адаптивными иммунными реакциями посредством высвобождения различных медиаторов, включая иммуносупрессивные молекулы, факторы роста, экзосомы, хемокины, компоненты комплемента и различные метаболиты. В частности, МСК жировой ткани мыши способны поддерживать рост и дифференцировку ГСК *ex vivo*, участвуя в формировании сосудистой кроветворной ниши [2].

По истечении 14 суток культивирования, в 3D-культурах было выявлено статистически значимое повышение продукции МСК фактора стволовых клеток (SCF) и колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF), по сравнению с контрольными значениями. G-CSF и SCF, являясь одними из ключевых членов семейства гемопоэтических факторов роста, регулируют кроветворение, способствуя увеличению клеток-предшественников периферической крови [6]. Подтверждением вышесказанному явились выявленные нами взаимосвязи между содержанием SCF и G-CSF и количеством клеток CD45⁺CD34⁺ в 3D-культурах. Следует также отметить, что увеличение пула клеток с морфологией кроветворных *in vitro* и образование островков минерализации межклеточного матрикса происходит на фоне пониженного уровня апоптотического фактора TRAIL.

Выводы

Таким образом, согласно проведенному исследованию, трехмерные матриксы (Ra = 2-3 мкм) с кальций-фосфатным покрытием способствуют формированию участков минерализации межклеточного матрикса (т.е. дифференцировке МСК в остеобласты), росту числа клеток, несущих маркеры пула ГСК в клеточной культуре на 14-е сутки, и увеличению плотности распределения

морфологически распознаваемых кроветворных клеток на 21-е сутки. Вероятно, усиленная остеогенная дифференцировка МСК в присутствии 3D-модельных матриксов, имитирующих минеральное вещество костной ткани, способствует также формированию *in vitro* остеобластных ниш, за счет секреции цитокинов и факторов роста и, возможно, межклеточного взаимодействия с кроветворными клетками.

Список литературы / References

1. Anthony B.A., Link D.C. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells Trends. *Immunol.*, 2014, Vol. 35, no. 1, pp. 32-37.
2. Corselli M., Chin C.J., Parekh C., Sahaghian A., Wang W., Ge S., Evseenko D., Wang X., Montelatici E., Lazzari L., Crooks G.M., Péault B. Perivascular support of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 15, pp. 2891-2901.
3. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, Vol. 8, no. 4, pp. 315-317.
4. Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Malashchenko V.V., Melashchenko E.S., Todosenko N.M., Khlusova M.Y., Sharkeev Y.P., Komarova E.G., Sedelnikova M.B., Shunkin E.O., Khlusov I.A. Behavioral Changes of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Contact with Synthetic Calcium Phosphates *in vitro*. *Cell Tissue Biol.*, 2018, Vol. 12, no. 2, pp. 112-119.
5. Méndez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., Macarthur B.D., Lira S.A., Scadden D.T., Ma'ayan A., Enikolopov G.N., Frenette P.S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 2010, Vol. 466, no. 7308, pp. 829-834.
6. Mickiene G., Dalgėdienė I., Zvirblis G., Dapkunas Z., Plikusiene I., Buzavaite-Verteliene E., Balevičius Z., Rukšėnaitė A., Pleckaityte M. Human granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)/stem cell factor (SCF) fusion proteins: design, characterization and activity. *PeerJ.*, 2020, Vol. 8, e9788. doi: 10.7717/peerj.9788.
7. Munir H., Ward L.S.C., McGettrick H.M. Mesenchymal stem cells as endogenous regulators of inflammation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2018, Vol. 1060, pp. 73-98.
8. Tasian S.K., Bornhäuser M., Rutella S. Targeting leukemia stem cells in the bone marrow niche. *Biomedicines*, 2018, Vol. 6, no. 1, pii: E22. doi: 10.3390/biomedicines6010022.
9. Terleeva O.P., Sharkeev Yu.P., Slonova A.I., Mironov I.V., Legostaeva E.V., Khlusov I.A., Matykina E., Skeldon P., Thompson G.E. Effect of parameters of microplasma modes and electrolyte composition on characteristics of calcium phosphate coatings on pure titanium for medical use. *Surf. Coat. Technol.*, 2010, Vol. 205, pp. 1723-1729.
10. Tuljapurkar S.R., Jackson J.D., Brusnahan S.K., O'Kane B.J., Sharp J.G. Characterization of a mesenchymal stem cell line that differentiates to bone and provides niches supporting mouse and human hematopoietic stem cells. *Stem Cell Discov.*, 2012, Vol. 2, no. 1, pp. 5-14.
11. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat. Med.*, 2007. Vol. 13, no. 7, pp. 791-801.
12. Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W.-G., Ross J., Haug J., Johnson T., Feng J.Q., Harris S., Wiedemann L.M., Mishina Y., Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 2003, Vol. 425, no. 6960, pp. 836-841.

Авторы:

Иванов П.А. — инженер-исследователь Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Юрова К.А. — к.м.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Authors:

Ivanov P.A., Engineer-Researcher, Centre of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Yurova K.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Хазиахматова О.Г. — к.б.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Шуплецова В.В. — к.б.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Малащенко В.В. — инженер-исследователь Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Шуныкин Е.О. — младший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Норкин И.К. — биолог Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Хлусов И.А. — д.м.н., профессор кафедры морфологии и общей патологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск; главный научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Литвинова Л.С. — д.м.н., директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Khaziakhmatova O.G., PhD (Biology), Senior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Shupletsova V.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Malaschenko V.V., Engineer-Researcher, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Shunkin E.O., Junior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Norkin I.K., Biologist, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Khlusov I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk; Main Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Litvinova L.S., PhD, MD (Medicine), Head, Center of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 17.06.2021

РОЛЬ МИЕЛОПЕПТИДА МП-4 В РЕГУЛЯЦИИ АНТИТЕЛОГЕНЕЗА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ ПРИ СТРЕССЕ

Гаврилова Т.В.^{1,5}, Оралова Д.А.², Гейн О.Н.³, Черешнева М.В.⁴

¹ ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера»
Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

² ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

³ ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ,
г. Пермь, Россия

⁴ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

⁵ 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. Миелопептиды представляют собой эндогенные низкомолекулярные пептиды, обладающие иммунорегуляторной активностью. Каждый из миелопептидов обладает индивидуальной пептидной последовательностью и играет определенную роль в коррекции нарушений иммунной системы. В проведенных нами ранее исследованиях было показано иммуномодулирующее действие миелопептидов МП-3, МП-5, МП-6 на функции перитонеальных макрофагов в условиях иммобилизационного и холодового стрессов. Цель настоящей работы – исследовать влияние миелопептида МП-4 на антителогенез, продукцию активных форм кислорода, и поглотительную активность перитонеальных макрофагов мышей на фоне двух и шестичасового иммобилизационного стресса *in vivo*.

Эксперименты в системе *in vivo* выполнены на 24 мышцах-самцах породы Swiss, массой 17-22 г. В качестве стрессорного воздействия использовался двух- и шестичасовой иммобилизационный стресс. МП-4 вводили внутривентриально за 30 минут до начала стресса в дозе 40 мкг/кг. Животные были разделены на 4 группы: 1 – контрольная; 2 – стресс; 3 – стресс + МП-4; 4 – введение МП-4. На 5-е сутки оценивали клеточность и количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы по Jerne. Оценку продукции активных форм кислорода перитонеальными клетками производили с помощью реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Оценку поглотительной активности перитонеальных макрофагов проводили стандартным методом с использованием проточно-лазерного цитометра BDFACSCalibur. В качестве объектов фагоцитоза использовали меченые *St. aureus* в конечной концентрации 10⁸ кл/мл. Статистический анализ проводили с помощью непарного t-критерия Стьюдента.

Адрес для переписки:

Гаврилова Татьяна Валерьевна
ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера»
Министерства здравоохранения РФ
614000, Россия, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26.
Тел.: 8 (902) 471-62-08.
E-mail: gavrilova.tv@mail.ru

Address for correspondence:

Gavrilova Tatyana V.
E. Wagner Perm State Medical University
614000, Russian Federation, Perm, Petropavlovskaya str., 26.
Phone: 7 (902) 471-62-08.
E-mail: gavrilova.tv@mail.ru

Образец цитирования:

Т.В. Гаврилова, Д.А. Оралова, О.Н. Гейн, М.В. Черешнева «Роль миелопептида МП-4 в регуляции антителогенеза и функциональной активности макрофагов при стрессе» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 161-166. doi: 10.46235/1028-7221-989-ROM
© Гаврилова Т.В. и соавт., 2021

For citation:

T.V. Gavrilova, D.A. Oralova, O.N. Gein, M.V. Chereshneva "Role of MP-4 myelopeptide in regulation of antibody production and functional activity of macrophages under stress conditions", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 161-166. doi: 10.46235/1028-7221-989-ROM
DOI: 10.46235/1028-7221-989-ROM

Установлено, что двухчасовой иммобилизационный стресс не влиял на поглотительную активность перитонеальных лейкоцитов, в то время как шестичасовой стресс угнетал фагоцитоз. Введение на фоне стресса МП-4 не приводило к изменениям фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов. МП-4 не корригировал стрессиндуцированное угнетение количества антителообразующих клеток в селезенке при шестичасовой иммобилизации и стрессиндуцированное усиление абсолютного количества АОК в условиях двухчасового иммобилизационного стресса. В группе животных, получавших МП-4, на фоне двухчасовой иммобилизации зафиксировано увеличение количества ЯСК по сравнению с контрольной группой. Таким образом, в отличие от ранее исследуемых миелопептидов МП-4 не проявлял выраженных иммуномодулирующих эффектов в отношении изучаемых показателей.

Ключевые слова: миелопептиды, антителообразование, цитокины, стресс, макрофаги, фагоцитоз

ROLE OF MP-4 MYELOPEPTIDE IN REGULATION OF ANTIBODY PRODUCTION AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF MACROPHAGES UNDER STRESS CONDITIONS

Gavrilova T.V.^{a, e}, Oralova D.A.^b, Gein O.N.^c, Chereshneva M.V.^d

^a E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

^b Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

^c Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russian Federation

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

^e Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. Myelopeptides are endogenous low-molecular weight peptides with immunoregulatory activity. Each of these myelopeptides has an individual sequence and plays a role in correction of immune system disorders. In our earlier studies, we have shown immunomodulatory effect of MP-3, MP-5, MP-6 myelopeptides upon functioning of peritoneal macrophages under the conditions of immobilization and cold stresses. The aim of this work was to investigate the effect of MP-4 myelopeptide upon antibody formation, production of reactive oxygen species, and absorptive activity of peritoneal macrophages in mice under the immobilization stress. Materials and methods. The *in vivo* experiments were carried out in 24 male Swiss mice weighing 17–22 g. Two- or six-hour immobilization stress was produced in the animals. MP-4 was injected intraperitoneally 30 min before the onset of stress, at a dose of 40 µg/kg. The animals were divided into 4 groups: 1, control; 2, stress; 3, stress + MP-4; 4, MP-4 injection. On day +5, cellularity and the number of antibody-forming cells (AOC) in spleen were assessed by the method of local hemolysis in an agarose gel according to Jerne. Production of reactive oxygen species by peritoneal cells was assessed using the luminol-dependent chemiluminescence (LZHL) reaction. The absorption capacity of peritoneal macrophages was assessed using a standard method using a BDFACSCalibur laser flow cytometer. Labeled *St. aureus* at a final concentration of 108 cells/ml were used as phagocytosis targets. Statistical analysis was performed using the unpaired Student's t-test. Results. It was found that two-hour immobilization stress did not affect the absorption activity of peritoneal leukocytes, whereas six-hour stress suppressed phagocytosis. Injection of MP-4 in stress-exposed animals did not lead to changes in phagocytic activity of peritoneal macrophages. MP-4 did not correct the stress-induced decrease in the number of antibody-forming cells from the spleen during six hours of immobilization, nor stress-induced increase in absolute amounts of AOC under the two-hour immobilization stress. In the group of animals receiving MP-4 and immobilized for two-hours, an increase in the number of nucleated cells was increased, as compared with the control group. Thus, in contrast to the previously studied myelopeptides, MP-4 did not show pronounced immunomodulatory effects upon these parameters.

Keywords: myelopeptides, antibody formation, cytokines, stress, macrophages, phagocytosis

Исследования проведены в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы № АААА-А18-118020590108-7.

Введение

Миелопептиды представляют собой эндогенные низкомолекулярные пептиды, обладающие иммунорегуляторной активностью. Известны 6 основных биологически активных миелопептидов, которые первоначально были выделены методом твердофазной экстракции с последующим разделением жидкостной хроматографией, а впоследствии были получены и синтетическим путем. Каждый из миелопептидов обладает своей индивидуальной пептидной последовательностью и играет определенную роль в коррекции нарушений иммунной системы [1, 4, 5, 7].

В проведенных нами ранее исследованиях было показано иммуномодулирующее действие отдельных миелопептидов (МП-3, МП-5, МП-6) на функции перитонеальных макрофагов в условиях иммобилизационного и холодового стрессов. Так, было установлено, что миелопептиды МП-3, МП-5 и МП-6 нивелировали вызванное двухчасовым иммобилизационным стрессом угнетение продукции активных форм кислорода и IL-1 β перитонеальными макрофагами [2, 3]. МП-5 и МП-6 также нивелировали угнетающее влияние 6 ч иммобилизационного стресса на индуцированную зимозаном продукцию АФК перитонеальными макрофагами и образование АОК в селезенке, также указанные миелопептиды (МП-5 и МП-6) отменяли усиление продукции IL-10, вызванное 10-минутным холодовым стрессом [3]. Выраженным модулирующим действием на стрессиндуцированное изменение показателей иммунной системы обладал МП-3 [2].

Однако влияние миелопептида МП-4 на антителогенез, продукцию цитокинов и активных форм кислорода перитонеальными макрофагами на фоне иммобилизационного стресса ранее не изучалось.

Цель настоящей работы – исследовать влияние миелопептида МП-4 на антителогенез, продукцию активных форм кислорода, и поглотительную активность перитонеальных макрофагов мышей на фоне двух – и шестичасового иммобилизационного стресса *in vivo*.

Материалы и методы

Эксперименты в системе *in vivo* выполнены на 24 мышах-самцах породы Swiss, массой 17–22 г. В качестве стрессорного воздействия использовался двух- и шестичасовой иммобилизационный стресс. МП-4 вводили внутрибрюшинно за 30 минут до начала стресса в дозе 40 мкг/кг. Животные были разделены на 4 группы: 1 – контрольная;

2 – стресс; 3 – стресс + МП-4; 4 – введение МП-4. Одну половину животных после окончания стрессорного воздействия иммунизировали ЭБ внутрибрюшинно однократно (10^8 клеток в 0,2 мл 0,9% NaCl). На 5-е сутки оценивали клеточность и количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы по Jerne [6]. Вторую половину животных после окончания стрессорного воздействия животных выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом. Для получения перитонеальных макрофагов животным внутрибрюшинно вводили 2 мл раствора Хэнкса с добавлением гепарина 20 ед/мл и ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка) 50 мкл/мл. Оценку продукции активных форм кислорода перитонеальными клетками производили с помощью реакции люминолзависимой хемиллюминесценции (ЛЗХЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах (Greiner, Германия), каждая лунка содержала клетки в концентрации 2×10^5 клеток/0,2 мл раствора Хэнкса. В качестве индуктора ЛЗХЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛЗХЛ использовался люминол 10^{-5} М. Регистрация результатов велась в течение часа с интервалом в 5 минут с помощью многофункционального спектрофотометра (Tecan Trading AG, Швейцария).

Для оценки поглотительной активности в качестве объекта исследования использовали фракцию перитонеальных лейкоцитов. К 80 мкл клеток добавляли 10 мкл МП-4 и 10 мкл суспензии FITC-меченого *St. aureus* в конечной концентрации 10^8 кл/мл, пробы инкубировали 30 мин при 37 °С. Затем к клеткам добавляли лизирующий раствор (0,15М NH₄Cl; 0,01М NaHCO₃; 0,0001М ЭДТА, рН = 7,2) и после 5 мин инкубации центрифугировали 5 мин при 250 г с охлаждением 4 °С. После снимали супернатант, добавляли PBS-0,02% ЭДТА и снова центрифугировали 5 мин при 250 г с охлаждением 4 °С. Далее вновь снимали супернатант, добавляли 400 мкл PBS-0,02% ЭДТА. После этого пробы анализировали на проточно-лазерном цитометре BD FACS Calibur.

Статистический анализ проводили с помощью непарного t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Установлено, что интенсивность спонтанной продукции активных форм кислорода при шестичасовой иммобилизации статистически значимо не изменялась. Эффектов МП-4 на спонтанную продукцию АФК по сравнению с контролем не зарегистрировано (данные не приводятся). Стимулированная зимозаном продукция АФК при шестичасовом стрессе угнеталась по сравнению

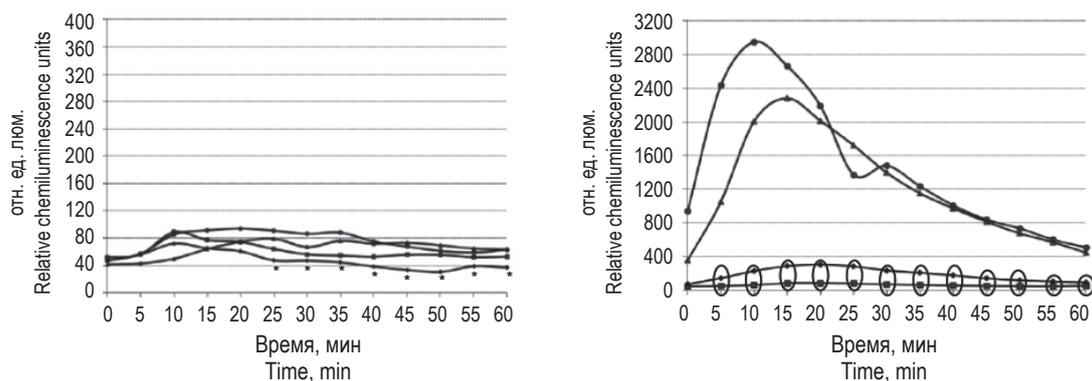


Рисунок 1. Влияние МП-4 на спонтанную (А) и стимулированную (Б) продукцию АФК перитонеальными макрофагами при двухчасовом иммобилизационном стрессе *in vivo*

Примечание. ● – контроль; ■ – стресс; ◆ – стресс + МП-4; ▲ – МП-4. * и 0 – обозначены значения кривых, где $p < 0,05$ по сравнению с контролем (n = 9).

Figure 1. Influence of MP-4 on spontaneous (A) and stimulated (B) ROS production by peritoneal macrophages at 2 h *in vivo* immobilization stress

Note. ●, control; ■, stress; ◆, stress + MP-4; ▲, MP-4. * and 0, the values of the curves are indicated, where $p < 0.05$ in comparison with the control (n = 9).

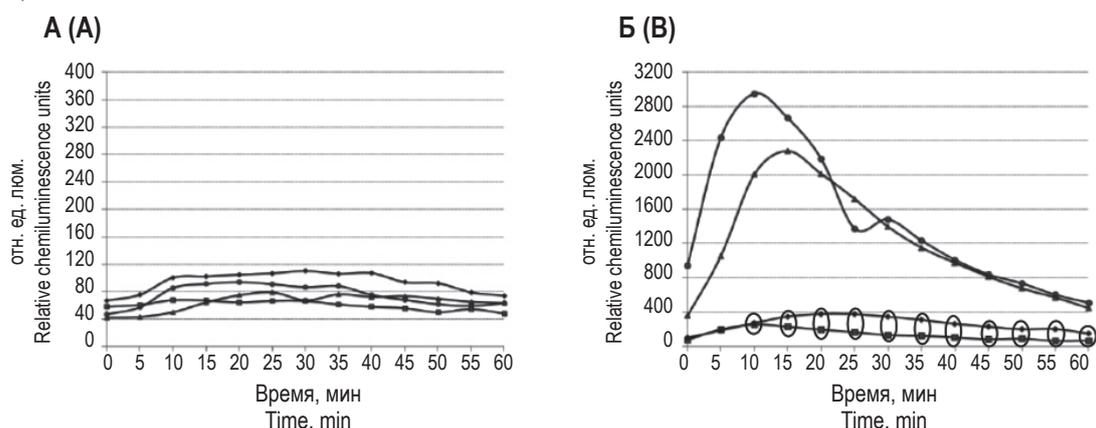


Рисунок 2. Влияние МП-4 на спонтанную (А) и стимулированную (Б) продукцию АФК перитонеальными макрофагами при шестичасовом иммобилизационном стрессе *in vivo*

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Influence of MP-4 on spontaneous (A) and stimulated (B) ROS production by peritoneal macrophages at 6 h immobilization stress *in vivo*

Note. As for Figure 1.

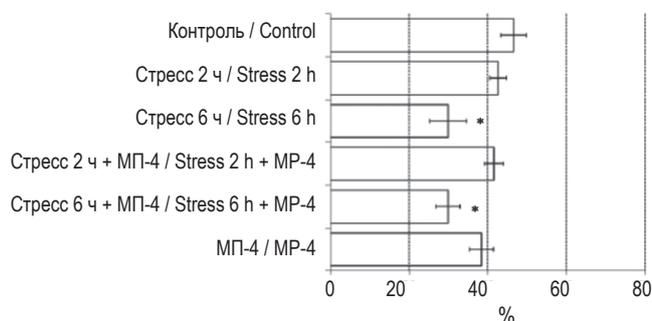


Рисунок 3. Влияние МП-4 на процент фагоцитоза клеток перитонеальной полости мышей при двух- и шестичасовом иммобилизационном стрессе *in vivo*

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем (n = 9).

Figure 3. Influence of MP-4 on the percentage of phagocytosis of cells of the peritoneal cavity of mice at 2 and 6 hours of immobilization stress *in vivo*

Note. *, $p < 0.05$ compared to control (n = 9).

с животными контрольной группы практически в течение всего периода наблюдений, введение мышам МП-4 на динамику респираторного взрыва влияния не оказывало. В условиях двухчасового стресса наблюдалось угнетение спонтанной продукции АФК в группе животных, получавших МП-4 на фоне стрессорного воздействия. Стимулированную продукцию АФК двухчасовой иммобилизационный стресс снижал. Как и в случае с шестичасовым стрессом, введение мышам МП-4 не проводило к изменению динамики респираторного взрыва (рис. 1, 2).

Установлено, что двухчасовой иммобилизационный стресс не влиял на поглотительную активность перитонеальных лейкоцитов, в то время как шестичасовой стресс угнетал фагоцитоз. Введение на фоне стресса МП-4 не приводило к изменениям фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов (рис. 3).

При изучении влияния МП-4 на количество АОК в селезенке выявлено отсутствие корректирующего влияния данного пептида на стрессиндуцированное угнетение абсолютного и относительного количества антителообразующих клеток в селезенке при шестичасовой иммобилизации, а также на стрессиндуцированное уси-

ление абсолютного количества АОК в условиях двухчасового иммобилизационного стресса (данные не приводятся).

Как шестичасовая иммобилизация, так и введение МП-4 не приводили к изменению количества ЯСК в селезенке. Однако в группе животных, получавших МП-4, на фоне двухчасовой иммобилизации зафиксировано увеличение количества ЯСК по сравнению с контрольной группой (данные не приводятся).

Выводы

Таким образом, в отличие от ранее исследуемых миелопептидов, МП-4 не проявлял выраженных иммуномодулирующих эффектов в отношении изучаемых показателей. Возможно, особенность подобного действия связана со структурными особенностями МП-4, а именно более длинной пептидной цепочкой, не позволяющей пептиду проникать в клетку и дающей возможность реализации его эффектов только через взаимодействие с мембранными рецепторами [8]. Подобное предположение может являться предпосылкой для дальнейшего изучения молекулярных механизмов реализации эффектов миелопептидов, а именно МП-4.

Список литературы / References

1. Гаврилова Т.В., Гейн С.В. Иммунорегулирующие эффекты миелопептидов при экспериментальном проникающем ранении глаза. Екатеринбург: УрОРАН, 2004. 102 с. [Gavrilova T.M., Gein S.V. Immunoregulatory effects of myelopeptides in experimental penetrating wounds of the eye]. – Yekaterinburg: Ural Branch, Russian Academy of Sciences, 2004. 102 p.
2. Гаврилова Т.В., Гейн О.Н., Гейн С.В., Черешнева М.В., Черешнев В.А. Миелопептиды в регуляции функциональной активности макрофагов при стрессе *in vivo* // Вестник Пермского федерального исследовательского центра, 2020. № 1. С. 53-60. [Gavrilova T.V., Gein O.N., Gein S.V., Cheresheva M.V., Chereshev V.A. Myelopeptides in the regulation of the functional activity of macrophages under stress *in vivo*. *Vestnik Permskogo federalnogo issledovatel'skogo tsentra = Bulletin of the Perm Federal Research Center*, 2020, no. 1, pp. 53-60. (In Russ.)]
3. Гейн С.В., Гаврилова Т.В., Журавлёва Л.С., Черешнева М.В., Черешнев В.А., Кирилина Е.А. Влияние МП-3 на динамику респираторного взрыва и продукцию IL-1 β и TNF- α перитонеальными макрофагами мыши при стрессе *in vivo*. Доклады Академии наук, 2014. Т. 455, № 2. С. 232-234. [Gein S.V., Gavrilova T.M., Zhuravleva L.S., Cheresheva M.V., Kirilina E.A., Chereshev V.A. The Effect of MP-3 on Mouse Peritoneal Macrophage Respiratory Boost Activity and Production of IL-1 β and TNF- α under *in vivo* Stress. *Doklady Akademii nauk = Proceedings of the Academy of Sciences*, 2014, Vol. 455, no. 2, pp. 232-234. (In Russ.)]
4. Петров Р.В., Михайлова А.А., Фомина Л.А., Степаненко Р.Н. Миелопептиды. М.: Наука, 2000. 181 с. [Petrov R.V., Mikhailova A.A., Fonina L.A., Stepanenko R.N. Myelopeptides]. Moscow: Science, 2000. 181 p.
5. Фомина Л.А., Трещалина Е.М., Белевская Р.Г., Азьмуко А.А., Ефремов М.А., Седакова Л.А., Кирилина Е.А. Синтез и противоопухолевые свойства миелопептида МП-1. Биоорганическая химия, 2012. Т. 38, № 4. С. 406-412. [Fonina L.A., Tretschalina E.M., Belevskaya R.G., Az`muko A.A., Efremov M.A., Sedakova L.A., Kirilina E.A. Synthesis and Anti-Tumor Properties of Myelopeptide MP-1. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry*, 2012, Vol. 38, no. 4, pp. 406-412. (In Russ.)]
6. Jerne N.K., Nordin A.A. Plaque Formation in Agar by Single Antibody-Producing Cells. *Science*, 1963, Vol. 140, no. 3365, 405. doi: 10.1126/science.140.3565.405.

7. Mikhailova A., Fonina L., Kirilina E., Shanurin S., Gur'yanov S., Malakhov A., Nesmeyanov V., Petrov R. Immunoregulatory properties of hexapeptide isolated from porcine bone marrow cell culture. *Regul. Pept.*, 1994, Vol. 53, Iss. 3, pp. 203-209.
8. Marinova Z., Vukojevic V., Surcheva S., Yakovleva T., Cebers G., Pasikova N., Usynin I., Hugonin L., Fang W., Hallberg M., Hirschberg D., Bergman T., Langel U., Hauser K.F., Pramanik A., Aldrich J.V., Gräslund A., Terenius L., Bakalkin G. Translocation of dynorphin neuropeptides across the plasma membrane. A putative mechanism of signal transmission. *J. Biol Chem.*, 2005, Vol. 280, no. 28, pp. 26360-26370.

Авторы:

Гаврилова Т.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой офтальмологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ; ведущий научный сотрудник, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Оралова Д.А. — студентка биологического факультета ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Гейн О.Н. — к.б.н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Черешнева М.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Gavrilova T.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Ophthalmology, Perm State National Research University; Leading Research Associate, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Oralova D.A., Student, Faculty of Biology, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Gein O.N., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Pharmacology, Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russian Federation

Chereshneva M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 16.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 16.06.2021

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЦИТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МЕТАБОЛИТОВ И КРИТЕРИИ ОТБОРА ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ НОВОГО ИММУНОТРОПНОГО БИОГЕПАТОПРОТЕКТОРА

Забокрицкий Н.А.

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

Резюме. Настоящая работа посвящена изучению цитопротекторного действия БАВ (метаболитов, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами рода *Bacillus*) стерильного фугата культуры пробиотических микроорганизмов ВКПМ *Bacillus subtilis* В-3679 (штамм является продуцентом биоспорицина) на культуру выделенных гепатоцитов при моделировании у них токсического поражения. Получение стерильного фугата культуры ВКПМ *Bacillus subtilis* В-3679 проводили путем стерилизующей фильтрации культуральной жидкости данного штамма. Работа проводилась с использованием перевиваемой линии клеточной культуры Л-41, позволяющая оценивать токсичность различных субстратов на культурах клеток и выдерживающая токсическое воздействие в разных концентрациях. На первом этапе исследований, для решения поставленных задач, были определены максимальная нетоксическая доза стерильного фугата и минимальная токсическая доза СС14 по отношению к клеткам культуры Л-41. На следующем этапе исследований было изучено и доказано цитопротекторное действие БАВ, входящих в состав фугата штамма *Bacillus subtilis* В-3679 по отношению к клеткам линии Л-41. На модели токсического поражения культуры выделенных гепатоцитов было продемонстрировано цитопротекторное и регенеративное действия БАВ в составе фугата штамма *Bacillus subtilis* В-3679. В доклинических исследованиях по оценке токсичности и безопасности экспериментального образца нового биогепаптопротектора на экспериментальных животных было установлено, что комплекс биологически активных веществ (метаболитов), вводимый внутривентрикулярно и интрабрюшинно, является нетоксичным и безопасным для лабораторных животных и не вызывает у них каких-либо патологических изменений во внутренних органах и тканях. Основой нового биогепаптопротектора, обладающего полифункциональным механизмом действия, позволяющего эффективно восстанавливать угнетенные функции печени, с одновременной нормализацией иммунологических показателей, является входящий в его состав активный биокомпонент – метаболиты пробиотических спорообразующих бактерий, которые при введении в организм продуцируют комплекс биологически активных метаболитов (антибиотики, протеолитические, амилаолитические и др. ферменты, иммуноглобулины, а также интерлейкины, витамины, протеины, аминокислоты и другие биоактивные ве-

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,
Pervomaiskaya str., 106.
Phone: 7 (922) 110-11-14.
E-mail: pharmusma@rambler.ru

Образец цитирования:

Н.А. Забокрицкий «Экспериментальная оценка цитопротекторного действия пробиотических метаболитов и критерии отбора штаммов *Bacillus subtilis* для конструирования нового иммунотропного биогепаптопротектора» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 167-174.
doi: 10.46235/1028-7221-990-ЕЕО

© Забокрицкий Н.А., 2021

For citation:

N.A. Zabokritskiy “Experimental evaluation of cytoprotective effect of probiotic metabolites and selection criteria of *Bacillus subtilis* strains for development of new immunotropic biohepatoprotector”, Russian Journal of Immunology/ Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 167-174.
doi: 10.46235/1028-7221-990-ЕЕО

DOI: 10.46235/1028-7221-990-ЕЕО

щества). Экспериментально установленное цитопротекторное действие комплекса БАВ, входящих в состав фугата культуры бактерий штамма *Bacillus subtilis* B-3679, позволит в дальнейшем обоснованно разрабатывать новые перспективные медицинские иммунобиологические препараты, обладающие защитным действием в отношении органов и тканей человека.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что БАВ в составе фугата штамма *Bacillus subtilis* B-3679 не только обладают выраженным цитопротекторным действием, но и положительно влияют на регенеративные способности клеток печени, что является значимым фактором для дальнейшего использования данного штамма в качестве биоконпонента нового иммуно-тропного биогепа-топротектора.

Ключевые слова: метаболиты, цитопротектор, пробиотические микроорганизмы, клеточные культуры, гепатоциты

EXPERIMENTAL EVALUATION OF CYTOPROTECTIVE EFFECT OF PROBIOTIC METABOLITES AND SELECTION CRITERIA OF *BACILLUS SUBTILIS* STRAINS FOR DEVELOPMENT OF NEW IMMUNOTROPIC BIOHEPATOPROTECTOR

Zabokritskiy N.A.

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

Abstract. The present work concerns a study of cytoprotective effect of biologically active substances (BAS) produced by probiotic microorganisms from the *Bacillus* genus. These substances were obtained from a sterile fugate of probiotic *Bacillus subtilis* VKPM B-3679 culture (a biosporicin-producing strain) and added to the culture of isolated hepatocytes, when modeling their in vitro toxic damage. Sterile buffered culture of *Bacillus subtilis* B-3679 was prepared by sterilizing filtration of the culture supernatant of this strain. The work was carried out using a passageable L-41 cell culture strain, which allows to assess toxicity of various substrates upon cell cultures and protection against toxic effects at different concentrations. At the first stage of study, the maximal non-toxic dose of sterile fugate and the minimal toxic dose of CCl₄ established for the cultured L-41 cells. At the next stage, cytoprotective effect of BAS originating from the of *B. subtilis* B-3679 strain fugate, was studied and tested with L-41 cell line. Cytoprotective and regenerative effects of BAS containing in the fugate of *B. subtilis* B-3679 strain were demonstrated in the model of toxic damage using the culture of isolated hepatocytes. In preclinical studies, to assess the toxicity and safety of the experimental sample of a new biohepatoprotector for experimental animals, we have found that the complex of biologically active substances (metabolites) is non-toxic and safe for laboratory animals when administered intragastrically and intraperitoneally, and it does not cause any pathological changes in their internal organs and tissues. The basis of the new biohepatoprotection effect, which may provide a multifunctional action, allowing to effectively restore depressed liver functions, with simultaneous normalization of immunological parameters, is its active biocomponent, i.e., metabolites of probiotic spore-forming bacteria, which, when if brought to the body, produce a complex of biologically active metabolites (antibiotics, proteolytic, amylolytic, and other enzymes, immunoglobulins, as well as interleukins, vitamins, proteins, amino acids, and others bioactive substances). Due to experimentally established cytoprotective effect of the complex of BAS, the components of fugate culture of *B. subtilis* strain B-3679, will allow us to develop new promising medical immunobiological drugs that may provide a protective effect on human organs and tissues. As a result it was found that BAS, as components of fugate from *B. subtilis* B-3679 strain show both a pronounced cytoprotective effect, and a positive action upon regenerative abilities of liver cells, which is a significant factor for the future use of this strain as a biocomponent of a new immunotropic biohepatoprotector.

Keywords: metabolites, cytoprotector, probiotic microorganisms, cell culture, hepatocytes

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

Введение

На сегодняшний день разработка новых лекарственных кандидатов, изучение специфических фармакологических механизмов их действия на различных биологических моделях, экстраполяции фармакологических показателей на человека, доклинического изучения безопасности созданных экспериментальных образцов являются весьма актуальной задачей современного здравоохранения.

Оценивая сложившуюся к настоящему времени экологическую обстановку в нашей стране, можно констатировать, что загрязнения токсичными химическими веществами регистрируются на всей территории России. Стойкие органические загрязнители, такие как полициклические ароматические углеводороды, полихлорированные дифенилы, диоксины, фураны, ряд пестицидов определяются в окружающей среде почти практически повсеместно.

Воздействия на организм человека неблагоприятных экологических, климатогеографических, социальных (алкоголизация населения, бытовые отравления и др.) и профессиональных факторов, а также неблагоприятная эпидемиологическая обстановка могут приводить к нарушению функций ряда систем, органов и тканей макроорганизма, что обуславливает, в конечном итоге, рост заболеваемости и смертности среди населения Российской Федерации. Как правило, в патогенезе различных нозологических единиц важная роль отводится повреждению клеточных элементов тканей.

В последнее десятилетие существенно возрос интерес как ученых, так и практических врачей к пробиотическим препаратам. Значительно расширилось их применение, успешно разрабатываются оригинальные композиции и лекарственные формы пробиотиков, расширяется их производство, исследуются новые, перспективные области применения данных препаратов [1, 3, 5].

Все более широко в лечебную практику внедряются новые пробиотики на основе аэробных спорообразующих бацилл (биоспорин, споробактерин, бактисубтил и др.), но до последнего времени, по данным литературы, не рассматривалось цитопротекторное действие пробиотических спорообразующих бактерий [2, 4, 7].

В связи с этим представляет значительный интерес изучение цитопротекторного действия комплекса биологически активных веществ (БАВ),

продуцируемых пробиотическими бациллами рода *Bacillus* [7].

Цель исследования — оценка цитопротекторного действия БАВ (метаболитов, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами рода *Bacillus*) стерильного фугата культуры пробиотических микроорганизмов ВКПМ *Bacillus subtilis* B-3679 на культуру выделенных гепатоцитов при моделировании у них токсического поражения.

Материалы и методы

В работе использовали микроорганизмы штамма ВКПМ *Bacillus subtilis* B-3679.

Паспортные характеристики штамма:

Штамм ВКПМ *Bacillus subtilis* B-3679 депонирован в БРЦ ВКПМ.

Клетки — аэробные грамположительные палочки. На питательных средах клеточная культура растет обильно, образуя через сутки большие, до 15–20 мм в диаметре, желтовато-бежевые шероховатые колонии с выростами, край колонии волнистый, колонии в агар не врастают, легко снимаются петлей. На жидких средах культура клеток образует плотную пленку с ярко выраженной складчатостью, бульон в течение всего срока культивирования остается прозрачным, при встряхивании пленка плохо разбивается.

В мазках из суточной культуры, выращенной на среде Гаузе 2, обнаруживаются прямые палочковидные клетки размером 2,1–2,3 × 0,9–1,2 мкм, располагающиеся одиночно или в виде коротких цепочек. Клетки подвижные, содержат центрально расположенные споры овальной формы. При спорообразовании клетки не раздуваются.

Культура не растет в анаэробных условиях. Диапазон рН для роста — 6,5–7,5, оптимальная температура — 32 °С. Продуцирует каталазу, реакция Фогеса–Проскауэра положительная, хорошо растет в присутствии 7% NaCl. Гидролизует аррорут крахмал, казеин, желатину разжижает медленно, не разлагает мочевины, не образует сероводород и индол. Нитраты восстанавливает, цитрат натрия не утилизирует. Ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, сахарозу, фруктозу. Галактозу и мальтозу не использует. Не обладает лецитиназной и коагулазной активностью, не нуждается для роста в аминокислотах и витаминах.

Культура обладает выраженной ферментативной активностью, характеризуется высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Антагонистические свойства штамма, выявленные с помощью метода перпендикулярных штрихов на агаризированной среде Гаузе 2, в отношении тест-культур составляют: *E. coli* — 6–8

мм, *S. typhimurium* – 8–10 мм, *S. aureus* – 13–16 мм, *P. aeruginosa* – 6–8 мм, *C. albicans* – 5–10 мм.

Штамм является продуцентом биоспорицина. Не является генетически модифицированным. Согласно классификации микроорганизмов, приведенных в Санитарных правилах СП 1.2.731-99, штамм относится к микроорганизмам, не патогенным для человека, и поэтому работа со штаммом требует специальных мер предосторожности.

Характеристики указанного штамма в процессе культивирования и хранения не изменяются и в полной мере соответствуют показателям, описанным в паспорте на данный штамм.

Работа проводилась также с использованием перевиваемой линии клеточной культуры Л-41 КД/84 (Авторское свидетельство 3981708/28-13/159566; ФС-42-3724-99, рег. № до по РЛС – 94/161/171), находящейся на хранении в музейной коллекции соматических клеток человека и животных ЕНИИВИ.

В работе использовали фугат, полученный путем стерилизующей фильтрации культуральной жидкости штамма пробиотических микроорганизмов *B. subtilis B-3679*.

Получение стерильного фугата культуры *B. subtilis B-3679* проводили путем стерилизующей фильтрации культуральной жидкости данного штамма.

Культивирование штамма *B. subtilis B-3679* осуществляли глубинным способом на качалке (220 об/мин⁻¹ рядом при 37 °С) в течение 30 ч. При этом готовили посевной материал в концентрации 1×10^6 кл·см⁻³. В колбы объемом 100,0 см³ вносили по 20,0–25,0 см³ питательной среды, после чего добавляли посевной материал в указанной дозе и помещали на качалку [6].

По окончании цикла глубинного культивирования содержимое всех колб сливали в одну емкость, определяли концентрацию КОЕ (БК) в 1,0 см³ культуральной жидкости и помещали в холодильник на 24 ч (4±2 °С).

Перед этапом стерилизующей фильтрации проводили центрифугирование культуральной жидкости на центрифуге ОПН-3 при 3000 об/мин⁻¹ в течение 10 мин.

Для получения стерильного фугата монтировали системы для фильтрации и стерилизовали их в автоклаве в стандартном режиме. Вакуумную фильтрацию осуществляли последовательно, через целлюлозные фильтры (d = 11 мкм, 0,30 мкм и 0,22 мкм). Стерильность полученного фильтрата проверяли путем высева 0,1 см³ на тигмоколевую среду и среду 199. Срок наблюдения составлял 5 суток. Полученный фугат считали стерильным, если по окончании срока наблюде-

ния не наблюдался рост микрофлоры в туказанных средах (замутнение во флаконах) [5].

Гепатоциты получали из печени мышей-сусунков, которых умерщвляли путем шейной цервикальной шейных позвонков. Печень диспергировали в смеси равных объемов растворов трипсина и Версена. Суспензию клеток вносили в пенициллиновые флаконы и культивировали в среде «Игла» с двойной концентрацией аминокислот, витаминов и 20%-ной бычьей сывороткой. Выделенные (эксплантированные) гепатоциты в количестве $(5-8) \times 10^6$ кл/см⁻³ инкубировали в течение 96 ч в криостате термостате при (37±1) °С. Монослой гепатоцитов на стенках пенициллиновых флаконов был представлен в виде тонкой, белесоватого цвета пленки, плотно прилегающей к стеклу. Микроскопически гепатоциты хорошо распластаны на стекле, плотно прилегают друг к другу, имеют веретенообразную форму, четкие границы и ядро по центру клетки, группы клеток образуют однонаправленные тяжи.

Токсичность исследуемых опытов проб оценивали *in vitro* по изменению пролиферативной активности клеток культуры Л-41. Методика определения токсичности основана на установлении различий между интенсивностью прироста числа клеток культуры Л-41 на разных сроках наблюдения (24, 72 и 96 ч) [4, 6].

Пролиферативную активность клеток культуры Л-41 оценивали по следующим 3 показателям:

- коэффициент эффективности прикрепления клеток, который рассчитывали по отношению количества клеток в культуре через 24 ч к «посадочной дозе» клеток;
- коэффициент пролиферации рассчитывали по отношению количества клеток через 72 ч к количеству клеток через 24 ч;
- определяли предельную плотность клеточной популяции, которую рассчитывали отношением количества клеток в испытуемой пробе к количеству клеток в контрольной пробе через 96 ч после начала опыта.

Критерием проявления минимального токсического действия считали снижение более чем на 20% величины как минимум одного из трех показателей пролиферативной активности испытуемых проб по сравнению с контролем.

Максимальную нетоксическую дозу определяли также по сравнению показателей пролиферативной активности в испытуемых пробах и в контроле. Критерием проявления максимального нетоксического действия считали снижение не более чем на 20% величин определяемых показателей пролиферации в опытных группах, по сравнению с контролем.

Непосредственно перед выполнением анализа готовили рабочую клеточную культуру Л-41. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева при микроскопии в 3 повторностях. Из трех полученных результатов подсчета клеток рассчитывали среднее арифметическое значение, которое принимали за среднюю концентрацию клеток в рабочей культуре. Количество клеток в рабочей клеточной культуре доводили до $(4-5) \times 10^4$ кл/см³.

Для проведения одного анализа в 10 пенициллиновых флаконов вносили по 2,0 см³ взвеси рабочей клеточной культуры и добавляли в каждый флакон по 0,11 см³ исследуемой опытной пробы. Одновременно готовили 10 пенициллиновых флаконов для контрольных проб, в которые помещали по 2,0 см³ рабочей клеточной цивилизации культуры и по 0,11 см³ стерильной дистиллированной воды. Все флаконы с опытными и контрольными пробами инкубировали в термостате при термоустойчивых температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Через 24, 72 и 96 ч из каждого трех флаконов опытных и контрольных проб сливали ростовую среду (среда «Игла» и среда 199, в равных пропорциях, с добавлением 20%-ной сыворотки крови крупного рогатого скота) и добавляли во флаконы до по 2,0 см³ раствора Версена. Далее пробы выдерживали в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 15-25 мин, после чего проводили ресуспендирование путем интенсивного встряхивания в течение 1 мин. Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева для каждой из шести (трех опытных и трех контрольных) проб не менее трех раз. Вычисляли средние величины концентрации клеток в 1,0 см³ ростовой среды.

Для исследования цитопротекторного действия стерильного фугата штамма *B. subtilis* В-3679 по отношению к клеточной тест-системе (популяция клеток Л-41), с воспроизведенной моделью токсического поражения, вводили однократную и от однократной максимальные нетоксические дозы.

Токсическое поражение популяции клеток линии Л-41 осуществляли путем введения в пенициллиновые флаконы однократной и двукратной минимальных токсических доз СС14.

Цитопротекторную эффективность стерильного фугата в условиях моделирования токсического поражения выделенных гепатоцитов определяли по изменению плотности монослоя клеток. Регенеративную способность выделенных гепатоцитов определяли по изменению митотического индекса. Клетки культивировали на покровных стеклах в чашках Петри. После образования монослоя в культуральную среду

добавляли СС14 в концентрации однократной и двукратной минимальной токсической дозы. В течение опыта (через 24, 72 и 96 ч) клетки фиксировали и окрашивали гематоксилином-эозином. Для определения митотического индекса подсчитывали количество митозов в 800-1000 клетках на 1 покровное стекло. В каждом препарате просчитывали 20 полей зрения, в трех повторностях. Изменение плотности монослоя определяли по изменению среднего числа клеток в поле зрения микроскопа.

Для исследования цитопротекторного действия БАВ стерильного фугата штамма *B. subtilis* В-3679 в клеточную тест-систему, представленную популяцией выделенных гепатоцитов, с воспроизведенной моделью токсического поражения вводили однократную и от максимальной нетоксической дозы.

Воспроизведение токсического поражения популяции гепатоцитов осуществляли путем введения в пенициллиновые флаконы однократной и двукратной минимальных токсических доз СС14.

Общая продолжительность наблюдения за пролиферативной активностью выделенных гепатоцитов после введения СС14 и стерильного фугата составляла 96 ч.

Морфологические изменения клеток изучали в световом микроскопе на живых культурах и окрашенных препаратах.

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 и обсуждение

На данном этапе изучали цитопротекторное действие стерильного фугата штамма *B. subtilis* В-3679 на клетки линии Л-41 в условиях моделирования токсического (СС14) поражения клеточной популяции.

Для исследования цитопротекторного действия стерильного фугата штамма *B. subtilis* В-3679 по отношению к клеточной тест-системе (популяция клеток Л-41), с воспроизведенной моделью токсического поражения, вводили однократную и от однократной максимальные нетоксические дозы.

Воспроизведение токсического поражения популяции клеток линии Л-41 осуществляли путем введения в пенициллиновые флаконы однократной и двукратной минимальных токсических доз СС14.

В соответствии с вышеприведенной схемой эксперимента формировали следующие испытуемые пробы:

– I(C) проба – клетки линии Л-41 с добавлением двукратной минимальной токсической дозы СС14 и максимальной нетоксической дозы стерильного фугата;

– II(C) проба – клетки линии Л-41 с добавлением двукратной минимальной токсической дозы СС14 и максимальной нетоксической дозы стерильного фугата;

– III(C) проба – клетки линии Л-41 с добавлением минимальной токсической дозы СС14 и максимальной нетоксической дозы стерильного фугата;

– IV(C) проба – клетки линии Л-41 с добавлением минимальной токсической дозы СС14 и максимальной нетоксической дозы стерильного фугата;

– V(C) проба (контрольная) – клетки линии Л-41 с добавлением равного количества дистиллированной воды.

Результаты исследования пролиферативной активности в опытных и контрольной пробах через 24 ч свидетельствуют, что происходит снижение пролиферативной активности в большей степени проявляется в испытуемых пробах I(C), II(C) и в меньшей степени в пробах III(C) и IV(C), коэффициент прикрепления 0,58, 0,74 и 0,91, 0,98 соответственно.

Таким образом, было показано, что на эти сроки наблюдения более выраженным цитопротекторным действием обладает стерильный фугат штамма *B. subtilis B-3679* в дозе максимальной нетоксичной, при одновременном введении минимальной токсичной дозы СС14 (испытуемая проба IV(C)).

Результаты исследования пролиферативной активности в опытных и контрольной пробах через 72 ч после начала эксперимента свидетельствуют о том, что пролиферативная активность в большей степени проявлялась в испытуемых пробах III(C) и IV(C), в которых моделирование токсического поражения клеток Л-41 достигалось введением однократной минимальной токсической дозы СС14 (коэффициент пролиферации 1,04 и 1,17 соответственно), по сравнению с контрольной пробой V(C) (коэффициент пролиферации 1,00). В пробах I(C) и II(C) отмечали тенденцию к выравниванию пролиферации клеток Л-41, что выражалось в достаточно высоких

величинах коэффициента пролиферации (0,93 и 0,99 соответственно).

Результаты исследования пролиферативной активности в опытных и контрольной пробах через 96 ч показывают, что после начала эксперимента, происходит выравнивание относительной предельной плотности культуры клеток Л-41 во всех пробах. Причем количество клеток в пробах III(C) и IV(C) было выше, чем в контрольной пробе V(C) – предельная плотность относительно контроля 1,04, 1,09 и 1,00 соответственно.

Полученные обобщающие экспериментальные данные, отражающие эффективность цитопротекторного действия стерильного фугата в условиях моделирования токсического поражения перевиваемой клеточной культуры Л-41, свидетельствуют, что в испытуемых пробах I(C) и II(C), в которых моделировали токсическое поражение клеток Л-41 путем добавления двойной минимальной токсической дозы СС14, наблюдается значительное угнетение пролиферативной активности на ранних сроках эксперимента, с последующим ее восстановлением в более поздние сроки.

В пробах III(C) и IV(C) на ранние сроки эксперимента наблюдали незначительное снижение пролиферативной активности клеток Л-41, а на 72 ч наблюдения увеличение коэффициента пролиферации до 1,04 и 1,17 соответственно. Через 96 ч наблюдения отмечали в пробах III(C) и IV(C) увеличение предельной плотности клеточной популяции относительно контроля. Причем необходимо отметить, что потенцирование пролиферативной активности клеток Л-41 было более выражено в пробе IV(C), что объясняется не только цитопротекторным эффектом минимальной нетоксической дозы фугата штамма *B. subtilis B-3679*, но также и возможным регенеративным действием, что требует дальнейшего изучения.

На первом этапе, для решения поставленных задач, были определены максимальная нетоксическая доза стерильного фугата и минимальная токсическая доза СС14 по отношению к клеткам культуры Л-41.

На следующем этапе исследований было изучено и доказано цитопротекторное действие БАВ, входящих в состав фугата штамма *B. subtilis B-3679* по отношению к клеткам линии Л-41.

На модели токсического поражения культуры выделенных гепатоцитов было показано цитопротекторное и регенеративное действия БАВ в составе фугата штамма *B. subtilis B-3679*.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что БАВ (метаболиты) в составе фугата штамма *B. subtilis B-3679* не только обладают выраженным цитопротекторным дей-

ствием, но и положительно влияют на регенеративные способности клеток печени, что является значимым фактором для дальнейшего перспективного использования данного штамма в качестве биокомпонента нового лечебно-профилактического препарата.

Заключение

Проведены исследования по оценке цитопротекторного действия БАВ, входящих в состав стерильного фугата, полученного из культуральной жидкости штамма *B. subtilis* B-3679, являющегося активным биокомпонентом экспериментального

образца нового гепатопротекторного препарата. Экспериментально обоснованы минимальная токсическая доза СС14 (500 мкл • см-3) и максимальная нетоксическая доза стерильного фугата штамма *B. subtilis* B-3679 (0,1 %).

Таким образом, полученные результаты по изучению защитного действия комплекса БАВ стерильного фугата культуры пробиотических бактерий рода *Bacillus* на линию перевиваемых клеток Л-41 и выделенных гепатоцитов свидетельствуют об их выраженном цитопротекторном и регенеративном действии, что делает штамм *B. subtilis* B-3679 перспективным для конструирования нового биогепапротектора.

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 a probiotic concept. *Retsept = Recipe*, 2019, Vol. 2, no. 22, pp. 291-298. (In Russ.)]
2. Забокрицкий Н.А. Оценка иммуотропного 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 immunologicheskiy 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, № 5. С. 85-86. [Zabokritskiy N.A. Principal directions of scientific research on the justification and development of new immunobiological drugs. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya = Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, 2018, Vol. 81, no. 5, pp. 85-86. (In Russ.)]
4. Забокрицкий Н.А., Сарапульцев П.А. Экспериментальное обоснование возможности создания нового метаболитического препарата // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12, № 3. С. 295-300. [Zabokritskiy N.A., Sarapultsev P.A. Experimental justification of the possibility of creating the new metabolic drug. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12, no. 3, pp. 295-300. (In Russ.)]
5. Забокрицкий Н.А. Фармакологическая оценка иммуотропной активности нового гелевого метаболитика на факторы клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном моделировании термических ожогов кожи // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 125-132. [Zabokritskiy N.A. Pharmacological assessment of immunotropic activity of new gel metabiotic on cellular and humoral immunity in experimental modeled thermal skin burns. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 125-132. (In Russ.)]
6. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С., Булаева Г.В., Вертиев Ю.В., Винокуров А.Е., Горобец О.Б., Дарбеева О.С., Жиленков Е.Л., Зверьков Д.А., Иванова С.М., Иванова Т.С., Корн М.Я., Кривопапова Н.С., Лукин И.Н., Мельникова В.А., Нехорошева А.Г., Романова Ю.М., Сидоренко С.В., Скаженик 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., Krivopapova N.S., Lukin I.N., Melnikova V.A., Nekorosheva A.G., Romanova Yu.M., Sidorenko S.V., Skazhenik V.Yu., Skala L.Z., Trukhina G.M. *Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований*. – СПб.: Лань, 2016. 588 с.]

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.

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 17.05.2021
Принята к печати 16.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 16.06.2021

ВЛИЯНИЕ ГЛИКОДЕЛИНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ВТОРИЧНЫХ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

Логинова Н.П.¹, Тройнич Я.Н.¹, Чарушина Ю.А.¹, Заморина С.А.^{2,3}

¹ ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера»
Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

² Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал
ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»,
г. Пермь, Россия

³ ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Резюме. Гликоделин (PP14, PAEP, альфа-2-микроглобулин, димерный гликопротеин с молекулярной массой 42 до 56 кД) является маркером рецептивности репродуктивной ткани. Иммунорегуляторный потенциал гликоделина позволяет рассматривать его как один из ключевых факторов, формирующих иммунную толерантность организма матери к развивающемуся эмбриону. В целом гликоделин имеет перспективы применения в биомедицине в качестве фармакологического препарата для лечения посттрансплантационных осложнений.

Целью работы явилось изучение влияния гликоделина на морфофункциональное состояние вторичных органов иммунной системы при аллогенной трансплантации суспензии клеток красного костного мозга крысам Wistar в динамическом эксперименте *in vivo*. В эксперименте были задействованы белые крысы самцы линии Wistar в возрасте от 2-3 месяцев ($m = 250$ г). Животные содержались в условиях вивария ПГНИУ в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами». Выведение животных из эксперимента проводилось на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки путем декапитации в соответствии с международными правилами проведения работ с экспериментальными животными. В контрольной группе животных ($n = 6$) одноразово вводили суспензию клеток костного мозга, обработанных камптотечином, в опытной группе животным ($n = 12$) вводили суспензию клеток костного мозга в комплексе с 4-кратным введением гликоделина.

В работе использовали рекомбинантный гликоделин («MyBioSource», Германия), который вводили животным в концентрации, соответствующей беременности (0,75 мкг/мл). Внутривентриальное введение клеток костного мозга на фоне гликоделина в динамике эксперимента (21 сут.) показало, что аллогенная трансплантация вызвала гиперплазию селезенки и лимфатических узлов. В функциональных зонах органов развивались явления пролиферации и дифференцировки клеток иммунной системы. Введение гликоделина на ранних сроках эксперимента 3-7-е сут. вызвало усиление пролиферативных процессов в Т- и В-зонах обоих органов. При этом в органах отсутствовали признаки воспаления и гибели клеток путем апоптоза. С четырнадцатых суток эксперимента в органах обна-

Адрес для переписки:

Заморина Светлана Анатольевна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Address for correspondence:

Zamorina Svetlana A.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.
Phone: 7 (342) 280-77-94.
E-mail: mantissa7@mail.ru

Образец цитирования:

Н.П. Логинова, Я.Н. Тройнич, Ю.А. Чарушина,
С.А. Заморина «Влияние гликоделина на
морфофункциональное состояние вторичных органов
иммунной системы при аллогенной трансплантации в
эксперименте *in vivo*» // Российский иммунологический
журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 175-180.
doi: 10.46235/1028-7221-991-IOG

© Логинова Н.П. и соавт., 2021

For citation:

N.P. Loginova, Troynich Ya.N., Yu.A. Charushina,
S.A. Zamorina "Influence of glycodelin on morphofunctional
state of secondary immune organs in experimental model of
allogeneic transplantation", Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2,
pp. 175-180.
doi: 10.46235/1028-7221-991-IOG

DOI: 10.46235/1028-7221-991-IOG

руживалась эозинофильная инфильтрация, что является косвенным положительным признаком реакции на трансплантат. К концу исследования в органах наблюдали доминирование процессов дифференцировки над пролиферацией. Таким образом, гликоделин стабилизирует пролиферативные процессы и способствует появлению новой генерации клеток, поддерживающей реакцию организма по отношению к трансплантату. По-видимому, гликоделин способен участвовать в развитии адапционно-приспособительного механизма во вторичных органах иммунной системы.

Ключевые слова. аллогенный трансплантат, гликоделин, красный костный мозг, селезенка, брыжеечные лимфатические узлы

INFLUENCE OF GLYCODELIN ON MORPHOFUNCTIONAL STATE OF SECONDARY IMMUNE ORGANS IN EXPERIMENTAL MODEL OF ALLOGENEIC TRANSPLANTATION

Loginova N.P.^a, Troynich Ya.N.^a, Charushina Yu.A.^a, Zamorina S.A.^{b, c}

^a E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

^b Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

^c Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Abstract. Glycodelin (PP14, PAEP, alpha-2-microglobulin, dimeric glycoprotein with a molecular weight of 42 to 56 kDa) is a marker of reproductive tissue receptivity. Immunoregulatory potential of glycodelin allows us to consider it among key factors that promote maternal immune tolerance to the developing embryo. In general, glycodelin has prospects for use in biomedicine as a biopharmaceutical to treat post-transplant complications. This work aimed to study the effect of glycodelin on morpho-functional state of the secondary organs of immune response in the course of *in vivo* experiment during allogeneic transplantation of bone marrow cell suspension to Wistar rats. The experiment was performed in white male Wistar rats aged 2-3 months (body mass, 250 g). The animals were kept at the Perm State National Research University animal clinic under GOST 33216-2014 "Rules for working with laboratory rodents and rabbits". The animals were sacrificed on the 3rd, 7th, 14th, and 21st days according to international rules for working with experimental animals. In the control group, animals (n = 6) were injected once with a suspension of camptothecin-treated bone marrow cells; in experimental group, the animals (n = 12) were injected with a bone marrow cells in combination with glycodelin administered 4 times.

We used recombinant glycodelin (MyBioSource, Germany), which was administered to the animals at a concentration corresponding to pregnancy state (0.75 µg/mL). Intraperitoneal injection of bone marrow cells simultaneously with glycodelin over the terms of experiment (21 days) showed that allogeneic transplantation caused hyperplasia of spleen and lymph nodes. In the functional zones of organs, proliferation and differentiation of immune cells developed. Injection of glycodelin at the early stages of experiment (3-7 days) caused an increase in proliferative processes in the organs of both T- and B-dependent immunity. Moreover, there were no signs of inflammation and apoptotic cell death in the organs. Since the 14th day of the experiment, eosinophilic infiltration of the organs was evident, being an indirect positive sign of response to the transplanted cells. By the end of study, differentiation processes dominated over proliferation in the organs. Thus, glycodelin stabilizes proliferative processes and promotes emergence of a new cell generation, thus supporting host response to the transplant. Apparently, glycodelin can participate in development of adaptive mechanism in secondary organs of immune system.

Keywords: allogeneic transplant, glycodelin, red bone marrow, spleen, mesenteric lymph nodes

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

Введение

Гликоделин (PP14, PAEP, альфа-2-микроглобулин, димерный гликопротеин с молекулярной

массой 42 до 56 кД) рассматривается как маркер рецептивности репродуктивной ткани [2]. Иммуномодулирующие эффекты гликоделина заключаются в ингибировании пролиферации Т- и В-лимфоцитов, подавлении цитотоксичности НК-клеток, индукции апоптоза активированных CD4⁺-клеток, моноцитов и НК-клеток, угнете-

нии активности цитотоксических Т-лимфоцитов и подавлении функциональной активности макрофагов и дендритных клеток. Помимо этого, гликоделин повышает уровень регуляторных Т-лимфоцитов, сдвигает баланс Th1/Th2 в сторону Th2 и индуцирует толерантный фенотип в дендритных клетках [1]. Иммунорегуляторный потенциал гликоделина позволяет рассматривать его как один из ключевых факторов, формирующих иммунную толерантность организма матери к развивающемуся эмбриону. В целом, очевидно, что гликоделин имеет перспективы применения в биомедицине в качестве фармакологического препарата для лечения аутоиммунных заболеваний, посттрансплантационных осложнений и «перепрограммирования» аутореактивных клонов Т-лимфоцитов *in vitro* для дальнейшей клеточной иммунотерапии. В 2018 г. стало известно, что гликоделин препятствует отторжению трансплантата в эксперименте [3], что открывает для него фармакологические перспективы. Предположение о возможном применении гликоделина в случае трансплантации легкого, было сделано также Schneider и соавт. [4, 5].

Целью работы явилось изучение влияния гликоделина на морфофункциональное состояние вторичных органов иммунной системы при аллогенной трансплантации суспензии клеток красного костного мозга в динамическом эксперименте *in vivo*.

Материалы и методы

В эксперименте задействованы белые крысы самцы линии Wistar ($n = 24$) в возрасте от 2–3 месяцев ($m = 250$ г). Животные содержались в условиях вивария ПГНИУ в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами». Выведение животных из эксперимента проводилось на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сут. путем декапитации в соответствии с международными правилами проведения работ с экспериментальными животными (рис. 1).

Животные были разделены на 2 группы: 1-я ($n = 6$), которым вводили взвесь костного мозга (КМ) (10^7 клеток, обработанных камптотецином (50 мкг/мл, Tocris Bioscience, Великобритания), в 100 мкл среды RPMI-1640 (Sigma, США) внутривенно); 2-я ($n = 12$) вводилась взвесь костного мозга в комплексе с гликоделином. Гликоделин вводили внутримышечно в объеме 14 мг/100 мкл физиологического раствора, в следующем режиме: на 1-е, 5-е, 9-е и 12-е сутки в физиологической концентрации, характерной для периода беременности ($\sim 0,75$ мкг/мл) (рис. 1). В работу взят рекомбинантный гликоделин (E-Coli), MBS718444 (Германия); полученный под заказ с сайта www.mybiosource.com/recombinant-protein/glycodelin-paep/718444.

Гистологическое исследование: изучали селезенку и брыжеечные лимфатические узлы. После забора органы фиксировали в 10%-ном ней-

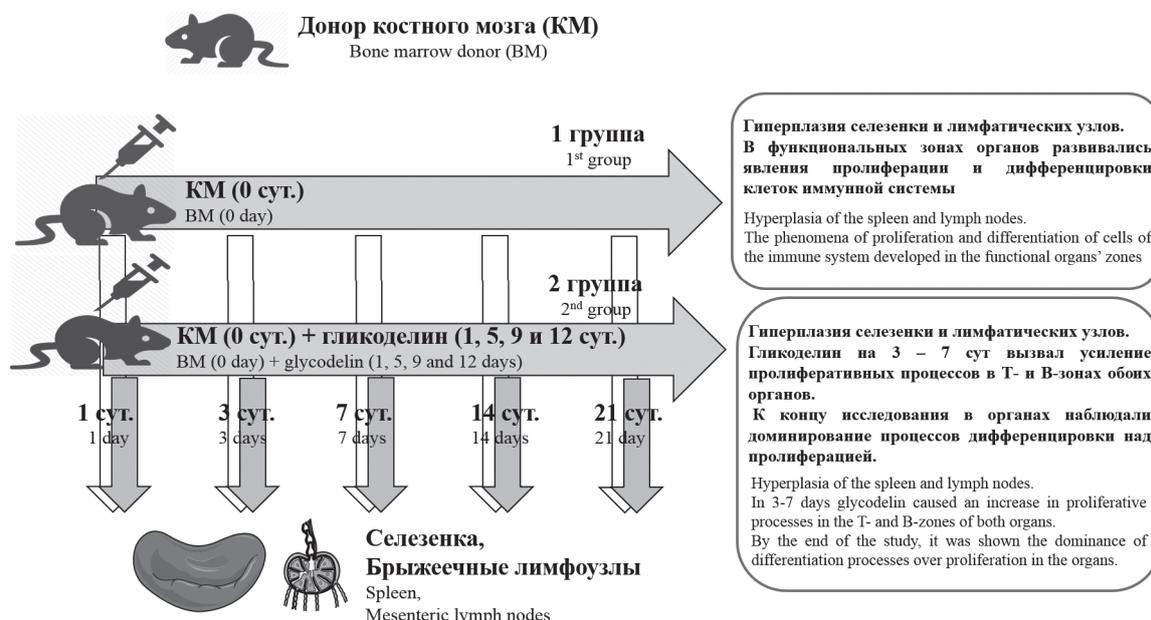


Рисунок 1. Экспериментальная схема по изучению роли гликоделина в регуляции морфофункциональных особенностей вторичных лимфоидных органов

Примечание. КМ – костный мозг.

Figure 1. Experimental scheme for studying the role of glycodelin in the regulation of morphofunctional functions of secondary lymphoid organs

Note. BM, bone marrow.

тральном формалине на фосфатном буфере (рН = 7,2), проводку осуществляли в гистологическом процессоре замкнутого типа с вакуумом Leica ASP 300 (Германия). Заливали в парафин «Histomix» фирма Bio Optica (Германия). На микротоме Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия) готовили серийные срезы толщиной 4-5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином для оценки общей морфологической картины. Оценку гистологических препаратов проводили с использованием микроскопов Leica DM2500 и Carl Zeiss LSM 710 и программных пакетов для захвата и анализа изображений Leica Application Suite и Zen 2010 при увеличении в 10 40 и 10 60.

Результаты и обсуждение

Анализ органов после аллогенной трансплантации фракции клеток костного мозга показал, что во вторичных органах иммунитета наблюдается процесс активации пролиферации и дифференцировки клеток иммунной системы. Так, в селезенке, начиная с 3-х сут., увеличивается объем белой пульпы. В сравнении с группой контроля маргинальная зона широкая, краевой синус умеренно расширен и заполнен клетками. В перартериальной муфте клеток становится больше по сравнению с контрольной группой. На 7-е сут. зоны белой пульпы продолжают заполняться клетками. Лимфоидные узелки очень крупные, все активные. В них верифицируются процессы пролиферации и дифференцировки клеток лимфоидного ряда. В сосудах красной пульпы признаки умеренного стаза клеток крови. До конца эксперимента (21-е сут.) зоны белой пульпы остаются крупными и активными. Во всех зонах органа имеется активность макрофагов. Помимо этого, наблюдалось повышение количества лимфоцитов, в пульпе они формируют диффузные скопления или лимфоцитарные муфточки вокруг кисточковых артериол.

В брыжеечных лимфатических узлах аллогенное введение клеток красного костного мозга на 3-и и 7-е сут. вызвало увеличение лимфоидной массы во всех функциональных зонах органа. Синусы расширены и заполнены лимфоцитами. Имеются процессы миграции клеток через стенку синуса. Т- и В-зависимые зоны заполняются лимфоидными клетками, увеличиваются в объеме, становятся широкие, в них активные процессы бластотрансформации. В крупных лимфоидных узелках процессы пролиферации и дифференцировки клеток, явления плазматогенеза. В светлых центрах скопление активных макрофагов с резко оксифильной цитоплазмой. Межузелковое пространство не просматривается, заполнено лимфоцитами. В посткапиллярных венулах паракортикальной зоны верифицируются признаки

миграции клеток в орган. Зона широкая, в ней также макрофаги формируют скопления.

На 21-е сут. в зонах органа продолжают активные процессы пролиферации и дифференцировки лимфоидных клеток, что отражается на размерах и структуре Т- и В-зависимых зон. Как результат, в паракортикальной зоне и в мозговых тяжах формируются скопления плазматических клеток. В этих участках установлено присутствие активных макрофагов и эозинофилов.

Введение гликоделина дополнительно к аллогенной трансплантации клеток костного мозга показало: на 3-е сутки в лимфатический узел осуществлялась массовая миграция клеток. Синусы органа все расширены и переполнены клетками лимфоидного ряда. На этом фоне идет активация функциональных зон органа. В сравнении с группой контроля, в наружной коре формируются крупные лимфоидные узелки с активными центрами. Узелки сливаются, межузелковые пространства не просматриваются. В паракортикальной зоне (Т-зона) вокруг посткапиллярных венул формируются лимфоцитарные муфты. Помимо лимфоидных клеток, в этой части коры имеются крупные скопления из макрофагов и плазматических клеток. К 14-му дню эксперимента во всех зонах органа численность макрофагов увеличивается. В лимфоидных узелках (В-зона) признаки активной пролиферации В-лимфоцитов, клетки формируют достаточно крупные скопления в базальной части лимфоидного узелка. В паракортикальной зоне и в тяжах мозгового вещества верифицируется скопление макрофагов и плазматических клеток находящихся на разной стадии дифференцировке. Мозговые тяжи перегружены клеточным материалом, клетки на стадии миграции в окружающие синусы (которые также переполнены) — это стирает границы между этими структурами. В целом, к этому сроку исследования все зоны органа перегружены клеточным материалом. На 21-е сут. пролиферативные процессы в В- и Т-зонах продолжают, но имеется тенденция к стабилизации (снижения) активности. Лимфоидные узелки продолжают оставаться крупными, активными. Между ними хорошо просматриваются промежуточные синусы, тенденции к слиянию узелков нет. Синусы широкие, хорошо верифицируются, в просвете синусов лимфоциты, макрофаги и эозинофилы. В паракортикальной зоне (Т-зона) между диффузным скоплением лимфоцитов присутствуют скопления эозинофилов (единичные), макрофагов и плазматические клетки на разной стадии дифференцировке.

В селезенке этой экспериментальной группы, на 3-е сут. в сосудах венозного русла (крупные и мелкие) умеренный стаз клеток крови. Тяжи

красной пульпы также переполнены клетками, преимущественно эритроцитами. Белая пульпа занимает значительную площадь (более 40%). Все зоны развиты, активные. Лимфоидные узелки (В-зона) крупные, в них признаки пролиферации. В центре скопление макрофагов. Т-зоны формируют плотное скопление вокруг центральной артерии, составляя значительную часть белой пульпы. Широкие маргинальные зоны окружены соответствующим синусом с клетками. С 7-х сут. в функциональных зонах появляются плазматические клетки, увеличиваясь в количестве до 21 дня эксперимента. Плазматические клетки скапливаются по краю лимфоидного узелка, в маргинальной зоне. Между ними единично, или по 2-3 клетки, присутствуют эозинофилы. Повсеместно присутствуют клетки макрофагально-го ряда. До конца эксперимента функциональные зоны белой пульпы продолжают оставаться в активном состоянии, но размеры Т- и В-зон становились меньше или не изменялись. Проллиферативные процессы несколько снижались, а повышался дифференцировочный потенциал, что отразилось на численности плазматических клеток. На протяжении всего эксперимента ма-

крофаги присутствуют во всех зонах органа, формируя контакты с клетками лимфоидного ряда.

Заключение

Таким образом, на фоне аллогенной трансплантации клеток костного мозга гликоделин способствует активации клеток иммунной системы, в направлении их пролиферации и дифференцировки. На этом фоне в органах отсутствуют признаки воспаления и гибели клеток путем апоптоза. С 14 дня эксперимента в органах верифицируются эозинофильная инфильтрация, что является косвенным положительным признаком реакции на трансплантат. В целом, гликоделин стабилизирует пролиферативные процессы и способствует появлению новой генерации клеток, поддерживающей реакцию организма по отношению к трансплантату. По-видимому, гликоделин способен участвовать в развитии адаптационно-приспособительного механизма во вторичных органах иммунной системы. Дальнейшей нашей задачей станет изучение состояния первичных органов иммунной системы, а также цитокиновый профиль и фенотип клеток иммунной системы в периферической крови в данной экспериментальной системе.

Список литературы / References

1. Бочкова М.С., Заморина С.А., Тимганова В.П., Храмов П.В., Раев М.Б. Роль гликоделина в регуляции иммунной системы в контексте развивающейся беременности // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 603-616. [Bochkova M.S., Zamorina S.A., Timganova V.P., Khrantsov P.V., Rayev M.B. The role of glycodelin in the regulation of the immune system in the context of developing pregnancy. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 603-616. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-603-616.
2. Посисеева Л.В., Герасимов А.М., Петрова У.Л. Гликоделин в акушерско-гинекологической практике: прошлое, настоящее, будущее // Проблемы репродукции, 2020, Т. 26, № 3. С. 11-22. [Posiseeva L.V., Gerasimov A.M., Petrova U.L. Glycodelin in obstetric and gynecological practice: past, present, future. *Problemy reprodukcii = Reproduction Problems*, 2020, Vol. 26, no. 3, pp. 11-22. (In Russ.)]
3. Dixit A., Balakrishnan B., Karande A.A. Immunomodulatory activity of glycodelin: implications in allograft rejection. *Clin. Exp. Immunol.*, 2018, Vol. 192, no. 2, pp. 213-223.
4. Schneider M., Meister M., Muley T. Glycodelin as diagnostic and prognostic marker and for monitoring treatment of lung diseases. European patent application, Bulletin 2016.06. EP2982765A1.
5. Schneider M.A., Granzow M., Warth A., Schnabel P.A., Thomas M., Herth F.J., Dienemann H., Muley T., Meister M. Glycodelin A new biomarker with immunomodulatory functions in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2015, Vol. 21, no. 15, pp. 3529-3540.

Авторы:

Логинова Н.П. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Тройнич Я.Н. — преподаватель кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Authors:

Loginova N.P., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Histology, Embryology and Cytology, E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Troynich Ya.N., Lecturer, Department of Histology, Embryology and Cytology, E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Чарушина Ю.А. — преподаватель кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Charushina Yu.A., Lecturer, Department of Histology, Embryology and Cytology, E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

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

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; Professor, Microbiology and Immunology Department, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 17.06.2021

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА В СОСТАВЕ ОРИГИНАЛЬНОЙ ДЕРМАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ НА ПОКАЗАТЕЛИ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

Осиков М.В., **Симонян Е.В.**, Агеева А.А., Никушкина К.В.

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

Резюме. Изменения адаптивного иммунитета термической травме (ТТ) увеличивают риск инфекционных осложнений и ограничивают репарацию в очаге повреждения, поэтому поиск и доклиническая апробация эффективных и безопасных средств для локального применения при ТТ, содержащих биорегуляторы, является актуальной задачей современной медицины. Дermalные пленки (ДП) – инновационный и востребованный при ожогах малой площади вариант раневых покрытий, а плейотропные свойства (МТ) позволяют предположить его эффективность при ТТ. Цель работы – исследовать влияние МТ в составе оригинальной ДП на показатели адаптивного иммунитета при экспериментальной ТТ. Эксперимент выполнен на 115 крысах-самцах линии Wistar, ТТ IIIA степени и площадью 3,5% моделировали контактом с кипящей водой в течение 12 с. ДП площадью 12 см² на основе натрия карбоксиметилцеллюлозы с МТ (5 мг/г) применяли ежедневно в течение 5 суток. В контрольной группе применяли ДП-матрицу аналогичного состава без МТ. Оценивали на проточном цитофлуориметре количество в крови CD3⁺ и CD45RA⁺, количество лимфоцитов с ранними признаками апоптоза, с поздними признаками апоптоза и частично некротические, на иммуноферментном анализаторе с использованием тест-систем для крыс – концентрацию в сыворотке IgG, IgM. При ТТ снижается в крови количество CD3⁺ на 5-е и 10-е сутки, CD45RA⁺ – на 5-е, 10-е и 20-е сутки, концентрация в сыворотке IgG – на 5-е и 10-е сутки наблюдения. На 5-е и 10-е сутки ТТ установлена связь между CD3⁺ и количеством лимфоцитов с признаками раннего апоптоза (R = -0,47; p < 0,05; R = -0,51; p < 0,05 соответственно) и признаками позднего апоптоза и некроза (R = -0,64; p < 0,05; R = -0,42; p < 0,05 соответственно), между CD45RA⁺ и количеством лимфоцитов с признаками раннего апоптоза (R = -0,47; p < 0,05; R = -0,49; p < 0,05 соответственно) и признаками позднего апоптоза и некроза (R = -0,57; p < 0,05; R = -0,49; p < 0,05 соответственно). Применение МТ в составе ДП приводит к увеличению в крови CD3⁺ на 5-е и 20-е сутки, CD45RA⁺ – на 5-е сутки, повышению в сыворотке концентрации IgG на 5-е и 10-е сутки ТТ. Одним из механизмов иммунотропного действия МТ выступает ограничение гибели лимфоцитов крови путем некроза и апоптоза, возможно, за счет его локального антиоксидантного и противовоспалительного действия в очаге ТТ.

Ключевые слова: мелатонин, дермальная пленка, термическая травма, лимфоциты, иммуноглобулин M, иммуноглобулин G

Адрес для переписки:

Осиков Михаил Владимирович
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (919) 122-37-99.
E-mail: prof.osikov@yandex.ru

Address for correspondence:

Osikov Mikhail V.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (919) 122-37-99.
E-mail: prof.osikov@yandex.ru

Образец цитирования:

М.В. Осиков, **Е.В. Симонян**, А.А. Агеева,
К.В. Никушкина «Влияние мелатонина в составе
оригинальной дермальной пленки на показатели
адаптивного иммунитета при экспериментальной
термической травме» // Российский иммунологический
журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 181-188.
doi: 10.46235/1028-7221-997-EOM

© Осиков М.В. и соавт., 2021

For citation:

M.V. Osikov, **E.V. Simonyan**, A.A. Ageeva, K.V. Nikushkina
“Effect of melatonin include into original dermal film upon
adaptive immunity in experimental thermal trauma”, Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 181-188.
doi: 10.46235/1028-7221-997-EOM
DOI: 10.46235/1028-7221-997-EOM

EFFECT OF MELATONIN INCLUDE INTO ORIGINAL DERMAL FILM UPON ADAPTIVE IMMUNITY IN EXPERIMENTAL THERMAL TRAUMA

Osikov M.V., **Simonyan E.V.**, Ageeva A.A., Nikushkina K.V.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Adaptive immunity changes in thermal trauma (TT) increase the risk of infectious complications and limit repair of the lesion. Hence, search and preclinical testing of effective and safe means to locally manage TT, containing bioregulators, is an urgent task of modern medicine. Dermal films (DF) are an innovative and popular variant of wound coatings for small-area burns, and pleiotropic properties of melatonin (MT) suggest its effectiveness in TT. The aim of the work is to investigate the effect of MT, as a component of original DF, upon the indexes of adaptive immunity in experimental TT. The experiment was performed on 115 male Wistar rats. Grade IIIA TT with area of 3.5% were produced by contact with boiling water for 12 s. DF with an area of 12 cm² based on sodium carboxymethylcellulose containing MT (5 mg/g) was applied daily for 5 days. Similar DF matrix, but without MT, was used in the control group. Amounts of CD3⁺ and CD45RA⁺ cells in blood, and lymphocyte subpopulations with early and late signs of apoptosis and partially necrotic cells were evaluated with flow cytofluorometer, as well as IgG and IgM concentrations were measured in blood serum using rat test systems. With TT, the amount of CD3⁺ in the blood decreases on days +5 and +10, CD45RA⁺, on days +5, +10 and +20, and the concentration of IgG in the serum, on days +5 and +10 of observation. On days +5 and +10 after TT, a relationship was established between CD3⁺ and the number of lymphocytes with signs of early apoptosis ($R = -0.47$; $p < 0.05$; $R = -0.51$; $p < 0.05$, respectively), and signs of late apoptosis and necrosis ($R = -0.64$; $p < 0.05$; $R = -0.42$; $p < 0.05$, respectively), between CD45RA⁺ and the number of lymphocytes with signs of early apoptosis ($R = -0.47$; $p < 0.05$; $R = -0.49$; $p < 0.05$, respectively), and signs of late apoptosis and necrosis ($R = -0.57$; $p < 0.05$; $R = -0.49$; $p < 0.05$, respectively). Usage of MT in DF composition leads to increase in blood CD3⁺ on the 5th and 20th days, CD45RA⁺, on the 5th day, and an increase in serum IgG concentration was observed on the 5th and 10th days following TT. Restriction of necrotic and apoptotic death of blood lymphocyte may be among the mechanisms of the immunotropic effect produced by MT which is, probably, due to its local antioxidant and anti-inflammatory action in the TT area.

Keywords: melatonin, dermal film, thermal injury, lymphocytes, immunoglobulin M, immunoglobulin G

Введение

В Российской Федерации в 2018 году было зарегистрировано 251 480 случаев ожогов, данное значение остается стабильно высоким на протяжении более 5 лет [1]. Несмотря на значительные достижения в лечении ожогов, применение пересадки кожи, стволовых клеток и др. методов медленного заживления, присоединение инфекции и образование рубцов, в том числе патологических, составляют ключевые проблемы в комбустиологии, приводящие к удлинению сроков госпитализации, пожизненным физическим дефектам, снижению качества жизни и эмоциональным расстройствам [25].

Иммунные реакции занимают ключевую позицию в патогенезе термической травмы (ТТ) на всех ее этапах. Особое значение имеет возникновение инфекционных осложнений из-за нарушений барьерной функции кожи, а также дисфункции компонентов иммунной системы. Так, лимфоцитопения, в том числе CD3⁺, CD4⁺

и CD8⁺, регистрируемая через 48 ч и сохраняющаяся до 4 недель после ТТ, сопряжена с риском инфекционных осложнений и летальностью [17]. Необходимо учитывать долгосрочные последствия иммунной дисфункции после ТТ: первоначальная активация Th1-зависимого ответа с высвобождением провоспалительных цитокинов сменяется Th2-зависимыми реакциями с устойчивым повышением IL-10, которое сохраняется в течение 3 и более лет и приводит к подавлению Th1-зависимого ответа, активности макрофагов и пролиферации Т-клеток, снижению ответа на инфекционные патогены, что обозначается как иммуносупрессивный постожоговый фенотип [8].

Несмотря на разнообразие перевязочных средств, остается актуальным вопрос разработки лекарственных средств для локальной терапии ТТ. Ранее не выпускались лекарственные средства в виде дермальных пленок (ДП) для лечения ТТ. Профилактика и лечение инфекционных осложнений является первоочередной задачей

при ТТ, решаемой системным и локальным применением различных лекарственных препаратов [15]. Системная и локальная иммуномодуляция при ТТ включает широкий спектр средств, среди которых особый интерес вызывают эндогенные биорегуляторы [1, 2, 5]. Ранее нами продемонстрировано успешное локальное применение эпидермального фактора роста и эритропоэтина при экспериментальной ТТ, а также иммуотропный эффект МТ при десинхронозе [3, 4, 6]. Потенциальный, но вполне обоснованный с теоретических позиций интерес при обсуждении перспективных терапевтических агентов при ТТ связан с мелатонином (МТ). Кожа млекопитающих обладает собственной мелатонинергической системой, участвующей в поддержании гомеостаза и целостности в связи с синтезом МТ и наличием специфических рецепторов [21]. Рецептор МТ1 обнаружен в кератиноцитах и фибробластах кожи, клетках волосяного фолликула, рецептор МТ-2 – преимущественно в эккринных железах и кровеносных сосудах кожи, меланоцитах [19]. Количество рецепторов МТ1 в фибробластах кожи уменьшается с возрастом [11]. Рецептор ROR идентифицирован в кератиноцитах эпидермиса, фибробластах, меланоцитах [10]. Полагают, что при заболеваниях кожи эффективность системного перорального применения МТ ограничена за счет низкой биодоступности, разрушения в печени, ограничения очага повреждения от системного кровотока и предпочтение должно отдаваться парентеральному способу введения МТ или его локальным формам [19]. **Цель работы** – исследовать влияние МТ в составе оригинальной ДП на показатели адаптивного иммунитета при экспериментальной ТТ.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 115 крысах-самцах линии Wistar массой 200–240 г в экспериментально-биологической клинике ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России при соблюдении требований по уходу и содержанию животных, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией (протокол № 10 от 15.11.2019 г. заключения этического комитета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России). Животные случайным образом разделены на 3 группы: группа 1 (n = 12) – интактный контроль; группа 2 (n = 34) – животные с ТТ и наложением асептической повязки (ТТ + АсП); группа 3 (n = 34) – животные с ТТ в условиях применения ДП-матрицы; группа 4 (n = 35) – животные с ТТ в условиях применения ДП с МТ (ТТ + ДП МТ). Для моделирования ТТ IIIA степени и относительной площадью 3,5% межлопаточный участок кожи погружали в очищенную воду при 98–99 °С на 12 с. Глубину ожога верифицировали

морфологическими методами. Модель ТТ с использованием горячей воды является наиболее частой и рассматривается исследователями как стандарт ТТ. Для анестезии использовали препарат «Золетил 100» (МНН: тилетамин, золазепам, Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 20 мг/кг. Пленку с МТ площадью 12 см² в группе 3 наносили сразу после ТТ, закрепляя асептической повязкой, перевязку осуществляли ежедневно в течение 5 суток. В предварительных исследованиях разработан состав ДП на основе натрий карбоксиметилцеллюлозы (поли-1,4- -О-карбоксиметил-Д-пиранозил-Д-гликопираноза натрия), включен МТ в концентрации 5 мг/г, проведена ее оценка в соответствии с фармако-технологическими параметрами (заявка на патент № 2020118766). В группе 3 использовали ДП-матрицу, аналогичную по составу и свойствам в группе 4, но не содержащую МТ. Общее количество лимфоцитов в крови определяли на анализаторе ВС-2800 Vet (Mindray, Китай). Субпопуляционный спектр лимфоцитов после выделения из крови на градиенте фиколл-верографин определяли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) с использованием специфических крысиных моноклональных антител eBioscience (США) с фенотипом CD3⁺ и CD45RA⁺, которые являются у крыс маркерами преимущественно Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов соответственно [18]. Гибель лимфоцитов оценивали при окрашивании конъюгированным с флюорохромом аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) (Beckman Coulter, США). Дифференцировали интактные клетки (Annexin-5-FITC⁻/7-AAD⁻), с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁻), с поздними признаками апоптоза и частично некротические (Annexin-5-FITC⁺/7-AAD⁺). На иммуноферментном анализаторе Personal LAB (Италия) с использованием специфических тест-систем для крыс фирмы Cloud-Clone Corp. (Китай) определяли концентрацию в сыворотке иммуноглобулинов М (IgM) и G (IgG), результат выражали в г/л. Полученные данные обрабатывали с использованием IBM SPSS Statistics 19 (SPSS: IBM Company; США). Показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Значимость различий между группами оценивали при помощи критериев Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца. Отличия считали статистически значимыми при p < 0,01. Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R).

Исследование выполнено при финансовой поддержке ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» по программе У.М.Н.И.К. (договор

№ 15583ГУ/2020 от 05.07.2020), РФФИ и Челябинской области (проект № 20-415-740016).

Результаты и обсуждение

Изменения показателей адаптивного иммунитета при экспериментальной ТТ представлены в таблице 1. На 5-е сутки наблюдения в крови снижается количество CD3⁺, CD45RA⁺, отражающие у крыс представительство соответственно Т- и В-лимфоцитов. На этом фоне увеличивается количество в крови лимфоцитов с признаками раннего апоптоза и признаками позднего апоптоза и некроза. Со стороны гуморального компонента адаптивного иммунитета выявлено снижение концентрации в сыворотке IgG, концентрация IgM не отличается от значений в контрольной группе интактных животных. На 10-е сутки ТТ в крови снижается количество CD3⁺, CD45RA⁺,

количество лимфоцитов без признаков некроза и апоптоза, увеличивается количество в крови лимфоцитов с признаками раннего апоптоза, снижается концентрации в сыворотке IgG. На 20-е сутки наблюдения количество в крови CD3⁺, концентрация в сыворотке IgG, IgM не отличались от значений в группе интактных животных, статистически значимо снижалось количество CD45RA⁺, увеличивалось количество в крови лимфоцитов с признаками раннего апоптоза и признаками позднего апоптоза и некроза.

Динамика изменений показателей адаптивного иммунитета при экспериментальной ТТ в условиях применения оригинальной ДП с МТ представлена в табл. 2. По сравнению с группой крыс с ТТ, у которых применяли ДП-матрицу, обнаружено на 5-е сутки увеличение количества в крови CD3⁺ и CD45RA⁺, снижение количества в

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТТ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. INDICATORS OF ADAPTIVE IMMUNITY IN EXPERIMENTAL TT, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа 1 Интактные Group 1 Intact (n = 12)	Группа 2 ТТ + АСП Group 2 TT + Aseptic Dressing		
		5-е сутки 5 days (n = 8)	10-е сутки 10 days (n = 15)	20-е сутки 20 days (n = 11)
CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /l	1,72 (1,22-2,17)	1,22 (0,79-1,40)*	1,06 (0,73-1,58)*	1,44 (0,89-1,94)
CD45RA ⁺ , × 10 ⁹ /л CD45RA ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,36 (0,30-0,46)	0,17 (0,09-0,27)*	0,17 (0,14-0,33)*	0,16 (0,12-0,21)*
Annexin-5- FITC-/ 7-AAD-, × 10 ⁹ /л Annexin-5- FITC-/ 7-AAD-, × 10 ⁹ /l	2,71 (2,16-2,71)	1,57 (0,97-3,08)	1,41 (1,28-1,73)*	1,68 (1,08-2,96)
Annexin-5- FITC+/ 7-AAD-, × 10 ⁹ /л Annexin-5- FITC+/ 7-AAD-, × 10 ⁹ /l	0,42 (0,31-0,53)	1,52 (0,93-2,84)*	0,79 (0,58-1,17)*	0,65 (0,27-1,08)*
Annexin-5- FITC+/ 7-AAD+, × 10 ⁹ /л Annexin-5- FITC+/ 7-AAD+, × 10 ⁹ /l	0,002 (0,001-0,012)	0,064 (0,035-0,119)*	0,006 (0,002-0,016)	0,007 (0,003-0,033)*
IgM, г/л IgM, g/l	0,29 (0,27-0,86)	0,32 (0,24-0,53)	0,33 (0,22-0,48)	0,38 (0,19-0,52)
IgG, г/л IgG, g/l	53,43 (44,21-53,58)	30,43 (25,42-38,68)*	30,53 (23,49-36,54)*	43,80 (32,95-65,45)

Примечание. * – значимые (p < 0,01) различия с группой 1.

Note. *, significant (p < 0.01) differences with group 1.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА В СОСТАВЕ ДЕРМАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ НА ПОКАЗАТЕЛИ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТТ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. EFFECT OF MELATONIN IN THE DERMAL FILM ON ADAPTIVE IMMUNITY IN EXPERIMENTAL TT, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа 1 Интактные Group 1 Intact (n = 12)	Группа 3 ТТ + ДП Group 3 TT + DF			Группа 4 ТТ + МТ ДП Group 3 TT + MT DF		
		5-е сутки 5 days (n = 8)	10-е сутки 10 days (n = 15)	20-е сутки 20 days (n = 11)	5-е сутки 5 days (n = 9)	10-е сутки 10 days (n = 10)	20-е сутки 20 days (n = 16)
CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /l	1,72 (1,22-2,17)	1,18 (0,94-1,32)*	1,12 (0,83-1,34)*	1,50 (1,02-2,04)	1,46 (1,25-1,57)*#	1,69 (0,85-2,87)*#	1,62 (1,38-2,05)
CD45RA ⁺ , × 10 ⁹ /л CD45RA ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,36 (0,30-0,46)	0,21 (0,12-0,31)*	0,19 (0,14-0,29)*	0,20 (0,13-0,28)*	0,26 (0,26-0,29)*#	0,29 (0,23-0,34)*	0,21 (0,18-0,24)*
Annexin-5- FITC-/ 7-AAD-, × 10 ⁹ /л Annexin-5- FITC-/ 7-AAD-, × 10 ⁹ /l	2,71 (2,16-2,71)	1,61 (1,07-2,58)	1,45 (1,21-1,84)*	1,85 (1,44-2,38)	2,53 (1,59-2,83)	2,82 (2,45-3,39)#	2,15 (1,25-2,58)
Annexin-5- FITC+/ 7-AAD-, × 10 ⁹ /л Annexin-5- FITC+/ 7-AAD-, × 10 ⁹ /l	0,42 (0,31-0,53)	1,48 (1,03-2,04)*	0,83 (0,55-1,27)*	0,68 (0,34-0,88)*	0,38 (0,30-0,70)#	0,46 (0,29-0,61)#	0,39 (0,32-0,56)#
Annexin-5- FITC+/ 7-AAD+, × 10 ⁹ /л Annexin-5- FITC+/ 7-AAD+, × 10 ⁹ /l	0,002 (0,001- 0,012)	0,067 (0,041- 0,121)*	0,005 (0,003- 0,011)	0,006 (0,002- 0,013)*	0,007 (0,006- 0,146)*#	0,004 (0,002- 0,009)	0,005 (0,003- 0,010)
IgM, г/л IgM, g/l	0,29 (0,27-0,86)	0,34 (0,26-0,64)	0,29 (0,23-0,36)	0,33 (0,25-0,37)	0,34 (0,22-0,57)	0,34 (0,19-0,66)	0,27 (0,23-0,49)
IgG, г/л IgG, g/l	53,43 (44,21- 53,58)	36,12 (28,04- 45,92)*	30,53 (23,49- 36,54)*	46,20 (35,28- 63,12)	42,65 (28,81- 44,74)*#	44,69 (30,86- 58,51)#	43,98 (31,70- 53,72)

Примечание. * – значимые (p < 0,01) различия с группой 1, # – значимые (p < 0,01) различия с группой 2.

Note. *, significant (p < 0.01) differences with group 1; #, significant (p < 0.01) differences with group 2.

крови лимфоцитов с признаками раннего апоптоза и признаками позднего апоптоза и некроза, увеличение концентрации в сыворотке IgG. На 10-е сутки наблюдения в условиях применения МТ статистически значимо увеличивается в кро-

ви количество CD3⁺, количество лимфоцитов без признаков некроза и апоптоза, снижается количества в крови лимфоцитов с признаками раннего апоптоза, увеличивается концентрация в сыворотке IgG. На 20-е сутки ТТ эффект МТ

проявился только в снижении в крови количества лимфоцитов с признаками раннего апоптоза.

Иммуносупрессия по клеточному и гуморальному звеньям адаптивного иммунитета при ТТ описана в литературе и достаточно хорошо изучена. Полагают, что лимфоцитопения при ТТ обусловлена эффектами ТНФ-альфа, опосредованными белком TNF-2 и повышением активности каспазы-3, каспазы-8, каспазы-9, цитохрома с, снижением мембранного потенциала митохондрий, а блокада TNF-2 ограничивает апоптоз CD4⁺ [9]. В большинстве случаев количество В-лимфоцитов, плазмочитов снижается и приводит к уменьшению уровня иммуноглобулинов в сыворотке, по другим данным количество CD19⁺ увеличивается [12]. Определенный вклад в развитие гипоиммуноглобулинемии может вносить потеря плазменных белков через ожоговую поверхность. Кроме этого, ожоговая поверхность – источник мощной импульсации от ноцицепторов, приводящей к изменению нейрогенной, эндокринной, генетической регуляции активности иммунокомпетентных клеток, динамики раневого процесса, вероятности развития осложнений ТТ [16]. Нами с использованием корреляционного анализа на 5-е и 10-е сутки ТТ установлена обратная связь средней силы между количеством в крови CD3⁺ и количеством в крови лимфоцитов с признаками раннего апоптоза ($R = -0,47$; $p < 0,05$; $R = -0,51$; $p < 0,05$ соответственно) и признаками позднего апоптоза и некроза ($R = -0,64$; $p < 0,05$; $R = -0,42$; $p < 0,05$ соответственно), между количеством в крови CD45RA⁺ и количеством в крови лимфоцитов с признаками раннего апоптоза ($R = -0,47$; $p < 0,05$; $R = -0,49$; $p < 0,05$ соответственно) и признаками позднего апоптоза и некроза ($R = -0,57$; $p < 0,05$; $R = -0,49$; $p < 0,05$ соответственно).

Необходимо отметить, что лимфоцитопения при ТТ является фактором риска не только развития инфекционных осложнений, но и ухудшения репарации в очаге повреждения. Различные популяции лимфоцитов участвуют в репарации при ТТ: $\gamma\delta$ T-клетки благодаря секреции IGF-1, а CD4⁺ и CD8⁺ – через регуляцию экспрессии различных факторов роста, Treg имеют значение в ограничении сосудисто-экссудативных реакций, активации ангиогенеза [24]. Роль iNKT клеток продемонстрирована у iNKT – дефицитных мышей, у которых в ране увеличивается нейтрофильная инфильтрация и площадь вторичной альтерации, задерживается заживление [23].

Полагаем, что зафиксированный нами иммунотропный эффект локального применения МТ при ТТ в виде увеличения количества в крови CD3⁺ и CD45RA⁺, концентрации в сыворотке IgG является многофакторным. Во-первых, МТ ограничивает зону вторичной альтерации в очаге

ТТ за счет антиоксидантного действия, как следствие снижения продукции медиаторов воспаления, в том числе с проапоптогенным эффектом. Показано, что МТ и его метаболиты оказывают защитное действие на культивируемые меланоциты, кератиноциты, фибробласты кожи за счет регуляции редокс-статуса и биоэнергетического гомеостаза, ограничение окислительного стресса активации репарации ДНК, NRF2-зависимых путей без воздействия на мембранные рецепторы МТ [24]. МТ, действующий аутокринно и паракринно, синтезируемый в коже и поступающий из кровеносных сосудов, рассматривается как ключевой антиоксидант [19].

Во-вторых, описаны прямые противовоспалительные эффекты МТ. Так, после облучения кератиноцитов ультрафиолетом типа В, приводящего к активации NF- κ B, МТ ингибирует экспрессию многих провоспалительных факторов: iNOS, ЦОГ-2, ТНФ-альфа [13]. Кроме этого, МТ ингибирует NLRP3-зависимый путь сигнализации, активируемый при окислительном повреждении митохондрий и связанный с экспрессией IL-1 и IL-18, проапоптогенных факторов [7]. Наконец, МТ оказывает непосредственный антиапоптогенный эффект, снижает экспрессию проапоптотических белков в кератиноцитах за счет снижения выхода цитохрома С из митохондрий, активации каспаз 9, 3 и 7. Данный эффект был продемонстрирован в кератиноцитах линии HaCaT с помощью TUNEL теста. Репарация ДНК в клетках кожи регулируется МТ как опосредованно за счет указанного выше антиоксидантного действия, так и прямо в связи с увеличением экспрессии p53 [14].

Выводы

Таким образом, при экспериментальной ТТ изменения адаптивного иммунитета включают снижение в крови количества CD3⁺ на 5-е и 10-е сутки, CD45RA⁺ – на 5-е, 10-е и 20-е сутки, снижение концентрации в сыворотке IgG на 5-е и 10-е сутки наблюдения. Количество CD3⁺ и CD45RA⁺ в крови снижается по мере увеличения в крови лимфоцитов с признаками раннего апоптоза, позднего апоптоза и некроза. При экспериментальной ТТ локальное применение МТ в составе оригинальной ДП приводит к увеличению в крови CD3⁺ на 5-е и 20-е сутки, CD45RA⁺ – на 5-е сутки, повышению в сыворотке концентрации IgG на 5-е и 10-е сутки наблюдения. Одним из механизмов иммунотропного действия МТ выступает ограничение гибели лимфоцитов крови путем некроза и апоптоза, возможно, за счет его локального антиоксидантного и противовоспалительного действия в очаге ТТ.

Список литературы / References

1. Осиков М.В. Влияние эритропоэтина на процессы свободнорадикального окисления и экспрессию гликопротеинов в тромбоцитах при хронической почечной недостаточности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2014. Т. 157, № 1. С. 30-33. [Osikov M.V. The effect of erythropoietin on the processes of free radical oxidation and the expression of glycoproteins in platelets in chronic renal failure. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014, Vol. 157, no. 1, pp. 30-33. (In Russ.)]
2. Осиков М.В. Роль орозомукоида в регуляции активности систем плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2009. Т. 148, № 7. С. 27-30. [Osikov M.V. The role of orosomucoid in the regulation of the activity of plasma proteolysis systems in experimental renal failure. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2009, Vol. 148, no. 7, pp. 27-30. (In Russ.)]
3. Осиков М.В., Гизингер О.А., Огнева О.И. Механизм влияния мелатонина на иммунный статус при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 517-524. [Osikov M.V., Gizinger O.A., Ogneva O.I. Mechanisms of melatonin effects upon immune state in experimental desynchronoses produced under the led illumination conditions. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 517-524. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-517-524.
4. Осиков М.В., Симонян Е.В., Саедгалина О.Т. Влияние эритропоэтина на содержание продуктов перекисного окисления липидов в лимфоцитах при экспериментальной термической травме // Казанский медицинский журнал, 2015. Т. 96, № 5. С. 849-853. [Osikov M.V., Simonyan E.V., Saedgalina O.T. Effect of Erythropoietin on the Content of Lipid Peroxidation Products in Lymphocytes in Experimental Thermal Injury. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2015, Vol. 96, no. 5, pp. 849-853. (In Russ.)]
5. Осиков М.В., Телешева Л.Ф., Агеев Ю.И. Влияние эритропоэтина на апоптоз лимфоцитов при экспериментальной хронической почечной недостаточности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2015. Т. 159, № 3. С. 326-328. [Osikov M.V., Telesheva L.F., Ageev Yu.I. Effect of erythropoietin on lymphocyte apoptosis in experimental chronic renal failure. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, Vol. 159, no. 3, pp. 326-328. (In Russ.)]
6. Осиков М.В., Телешева Л.Ф., Лихачева А.Г. Влияние локального применения эпидермального фактора роста на врожденный иммунитет и клеточный состав очага повреждения при экспериментальной термической травме // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2014. Т. 157, № 3. С. 280-283. [Osikov M.V., Telesheva L.F., Likhacheva A.G. Effect of local application of epidermal growth factor on innate immunity and cellular composition of the lesion focus in experimental thermal trauma. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014, Vol. 157, no. 3, pp. 280-283. (In Russ.)]
7. Acuña-Castroviejo D., Rahim I., Acuña-Fernández C., Fernández-Ortiz M., Solera-Marín J., Sayed R.K.A., Díaz-Casado M.E., Rusanova I., López L.C., Escames G. Melatonin, clock genes and mitochondria in sepsis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2017, no. 74, pp. 3965-3987.
8. Barrett L.W., Fear V.S., Waithman J.C., Wood F.M., Fear M.W. Understanding acute burn injury as a chronic disease. *Burns Trauma*, 2019, Vol. 7, 23. doi: 10.1186/s41038-019-0163-2.
9. Bordoloi D., Banik K., Shabnam B., Padmavathi G., Monisha J., Arfuso F., Dharmarajan A., Mao X., Lim L.H.K., Wang L. TIPE family of proteins and its implications in different chronic diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 10, 2974. doi: 10.3390/ijms19102974.
10. Dai J., Choo M.K., Park J.M., Fisher D.E. Topical ROR inverse agonists suppress inflammation in mouse models of atopic dermatitis and acute irritant dermatitis. *J. Investig. Dermatol.*, 2017, Vol. 137, no. 12, pp. 2523-2531.
11. Dong K., Goyarts E., Rella A., Pelle E., Wong Y.H., Pernodet N. Age associated decrease of MT-1 Melatonin receptor in human dermal skin fibroblasts impairs protection against UV-induced DNA damage. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 1, E326. doi: 10.3390/ijms21010326.
12. Entezami K., Mosavi T. Determination of lymphocytes surface markers in patients with thermal burns and the influence of burn size on mononuclear cell subsets. *Med. J. Islam. Repub. Iran*, 2017, Vol. 31, 38. doi: 10.14196/mjiri.31.38.
13. Favero G., Franceschetti L., Bonomini F., et al. Melatonin as an anti-inflammatory agent modulating inflammasome activation. *Int. J. Endocrinol.*, 2017, Vol. 2017, 1835195. doi: 10.1155/2017/1835195.
14. Galano A., Tan D.X., Reiter R.J. Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage. *Molecules*, 2018, Vol. 23, E530. doi: 10.3390/molecules23030530.
15. Norman G., Christie J., Liu Z., Westby M. J., Jefferies J. M., Hudson T., et al. Antiseptics for burns. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2017, no. 7, Cd011821. doi: 10.1002/14651858.cd011821.
16. Peterson N.C., Nunamaker E.A., Turner P.V. To treat or not to treat: the effects of pain on experimental parameters. *Comp. Med.*, 2017, Vol. 67, no. 6, pp. 469-482.
17. Rani M., Schwacha M.G. The composition of T-cell subsets are altered in the burn wound early after injury. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 6, e0179015. doi: 10.1371/journal.pone.0179015.

18. Ringheim G.E., Lee L., Laws-Ricker L., Delohery T. Teriflunomide attenuates immunopathological changes in the dark agouti rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front. Neurol.*, 2013, Vol. 4, 169. doi: 10.3389/fneur.2013.00169.
19. Rusanova I., Martínez-Ruiz L., Florido J., Rodríguez-Santana C., Guerra-Librero A., Acuña-Castroviejo D., Escames G. Protective Effects of melatonin on the skin: future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 19, E4948. doi: 10.3390/ijms20194948.
20. Skobowiat C., Brożyna A.A., Janjetovic Z., Jeayeng S., Oak A.S.W., Kim T.K., Panich U., Reiter R.J., Slominski A.T. Melatonin and its derivatives counteract the ultraviolet B radiation-induced damage in human and porcine skin *ex vivo*. *J. Pineal Res.*, 2018, Vol. 65, no. 2, e12501. doi: 10.1111/jpi.12501.
21. Slominski A.T., Kim T.K., Kleszczyński K., Semak I., Janjetovic Z., Sweatman T., Skobowiat C., Steketee J.D., Lin Z., Postlethwaite A., Li W., Reiter R.J., Tobin D.J. Characterization of serotonin and N-acetylserotonin systems in the human epidermis and skin cells. *J. Pineal Res.*, 2020, Vol. 68, no. 2, e12626. doi: 10.1111/jpi.12626.
22. Stone Ii R., Natesan S., Kowalczewski C.J., Mangum L.H., Clay N.E., Clohessy R.M., Carlsson A.H., Tassin D.H., Chan R.K., Rizzo J.A., Christy R.J. Advancements in regenerative strategies through the continuum of burn care. *Front. Pharmacol.*, 2018, Vol. 9, 672. doi: 10.3389/fphar.2018.00672.
23. Tanno H., Kawakami K., Kanno E., Suzuki A., Takagi N., Yamamoto H., Ishii K., Imai Y., Maruyama R., Tachi M.J.W.R., et al. Invariant NKT cells promote skin wound healing by preventing a prolonged neutrophilic inflammatory response. *Wound Repair Regener.*, 2017, Vol. 25, pp. 805-815.
24. Wang X., Balaji S., Steen E.H., Li H., Rae M.M., Blum A.J., Miao Q., Butte M.J., Bollyky P.L., Keswani S.G. T lymphocytes attenuate dermal scarring by regulating inflammation, neovascularization, and extracellular matrix remodeling. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, 2019, Vol. 8, no. 11, pp. 527-537.
25. Wang Y., Beekman J., Hew J., Jackson S., Issler-Fisher A.C., Parungao R., Lajevardi S.S., Li Z., Maitz P.K.M. Burn injury: challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2018, no. 123, pp. 3-17.

Автор:

Осиков М.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Симоныя Е.В. — к.фарм.н., доцент, заведующий кафедрой фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Агеева А.А. — ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Никושкина К.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник НИИ Иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Author:

Osikov M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Simonyan E.V., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Head, Department of Pharmacy and Chemistry at the Pharmaceutical Faculty, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Ageeva A.A., Assistant Professor, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Nikushkina K.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 17.06.2021

ЭПИПЛЕКСУСНЫЕ И ПАРЕНХИМАТОЗНЫЕ МАКРОФАГИ НЕРВНОЙ ТКАНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ УШИБЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЛЕГКОЙ СТЕПЕНИ

Плехова Н.Г., Зиновьев С.В., Просекова Е.В., Радьков И.В.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Владивосток, Россия

Резюме. Нейровоспаление признается частью патогенеза при внутричерепной травме (ЧМТ), а именно при ушибе или сотрясении мозга. Учитывая высокое распространение ЧМТ в общей заболеваемости, возникает необходимость нозологической верификации нейровоспаления при диагностике легкой и средней степени тяжести. Исследование иммунной регуляции кровотока при ЧМТ, в том числе роли клеток Колмера в патогенезе нейровоспаления, находится на стадии сбора фактических данных и требует адекватного экспериментального изучения. Цель исследования: изучить состояние клеток Колмера сосудистых сплетений желудочков головного мозга при экспериментальном ушибе головного мозга легкой степени (УГМЛс). УГМЛс воспроизведен на крысах самцах Вистар с применением модели падающего груза весом 200 гр. Для оценки экспрессии рецептора CD45 клетками головного мозга (ГМ) проводилось иммуногистохимическое исследование. В острый период после УГМЛс в тканях ГМ отмечался спазм кровеносных сосудов и перичеселлюлярный отек. В паренхиме неокортекса и на поверхности сосудистых сплетений желудочков ГМ обнаружена экспрессия рецепторов цитодифференцировки CD45, характерных для гемопоэтического пула клеток. Эти данные указывают на участие эпиплексусных и паренхиматозных макрофагов в выраженном перичеселлюлярном отеке ГМ. На 8-й день эксперимента спазм кровеносных сосудов сохраняется, а перичеселлюлярный отек существенно ослабевает. Во всех отделах ГМ не выявляется инфильтрации лейкоцитами тканей и отсутствует экспрессия рецепторов CD45. Результаты нашего исследования подтверждают, что церебральный вазоспазм является тяжелым осложнением нейровоспаления после ушиба ГМ. Острое воспаление характеризуется последовательностью сосудистых изменений, проявляющихся развитием спазма сосудов, артериальной, венозной гиперемии и стаза. Венозная гиперемия характеризуется дальнейшим расширением сосудов, полнокровием ткани, феноменом краевого стояния лейкоцитов и их эмиграцией. Иннервация от подкорковых нейронов или локальных корковых интернейронов в отношении паренхиматозных артериол и корковых микрососудов, обеспечивает минимальный контакт и преимущественно нацелен на окружающие астроциты и др. В острый период УГМЛс воспалительный процесс подтверждается наличием в паренхиме и на поверхности эпендимы клеток Колмера с экспрессией рецепторов CD45. Это подтверждает воспалительные причины изменения тонуса пиальных кровеносных сосудов, капилляров неокортекса и эпендимы, толщины субархноидального пространства. Другой причиной нейровоспаления является реакция астроцитов на травму ГМ.

Ключевые слова: нейровоспаление, ушиб головного мозга, макрофаги, эпиплексусные макрофаги, паренхиматозные макрофаги

Адрес для переписки:

Плехова Наталья Геннадьевна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.
Тел.: 8 (914) 672-69-53.
E-mail: Sinowev@mail.ru

Address for correspondence:

Plekhova Natalia G.
Pacific State Medical University
690002, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakov ave., 2.
Phone: 7 (914) 672-69-53.
E-mail: Sinowev@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Г. Плехова, С.В. Зиновьев, Е.В. Просекова,
И.В. Радьков «Эпиплексусные и паренхиматозные
макрофаги нервной ткани при экспериментальном
ушибе головного мозга легкой степени» // Российский
иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 189-194.
doi: 10.46235/1028-7221-1009-EPO

© Плехова Н.Г. и соавт., 2021

For citation:

N.G. Plekhova, S.V. Zinoviev, E.V. Prosekova, I.V. Radkov
“Epilexus phagocytes of nervous tissue in experimental brain
contusion”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 189-194.
doi: 10.46235/1028-7221-1009-EPO
DOI: 10.46235/1028-7221-1009-EPO

EPIPLEXUS PHAGOCYTES OF NERVOUS TISSUE IN EXPERIMENTAL BRAIN CONTUSION

Plekhova N.G., Zinoviev S.V., Prosekova E.V., Radkov I.V.

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Neuroinflammation is known to participate in pathogenesis of intracranial brain injury (TBI), e.g., brain contusion or concussion. In view of high overall prevalence of these conditions, there is a need for nosological verification of the mild- and moderate-severity neuroinflammation. Our research in immune regulation of blood flow in TBI, including a role of Kolmer cells in pathogenesis of neuroinflammation, is now at the stage of collecting research data and requires adequate experimental study. Purpose of our study was as follows: to assess the state of Kolmer cells in vascular plexus of brain ventricles in experimental model of mild traumatic brain contusion (mTBC). mTBC was reproduced in male Wistar rats using a model of a falling load weighing 200 g. Immunohistochemical study was performed in order to assess CD45 receptor expression on the brain cells. During acute period after mTBC, we observed constriction of blood vessels and pericellular edema of the brain tissues. Expression of CD45 cytodifferentiation receptors markers characteristic of the hematopoietic cell pools was found in parenchymal areas of neocortex and on the surface of choroid plexuses in brain ventricles. These data suggest participation of epiplexus and parenchymal macrophages in the pronounced pericellular edema of the brain. On the 8th day of observation, the spasm of the blood vessels persists, along with significantly weaker pericellular edema. In all the brain sections, leukocyte infiltration of tissues was not seen, and there was no expression of CD45 receptors, whereas increased number and size of nucleoli was found in the neurons. The results of our study confirm the role of cerebral vasospasm as a severe complication of neuroinflammation developing after mTBI. Acute inflammation is characterized by a series of vascular changes, manifesting by development of vasospasm, arterial, venous hyperemia and stasis. Venous hyperemia is characterized by further vasodilation, tissue plethora, the phenomenon of the marginal leukocyte stasis and their emigration, along with increased exudation processes. Innervation from subcortical neurons or local cortical interneurons to parenchymal arterioles and cortical microvessels provides minimal contact and predominantly targets the surrounding astrocytes and other cells. During acute period of mTBC, the inflammatory process is confirmed by the presence in parenchyma and on the surface of ependymal Kolmer cells and by expression of CD45 receptors. This finding points to inflammatory reasons for altered tone of pial blood vessels, capillaries of neocortex and ependymal areas, and changed depth of subarachnoid space. Response of astrocytes to the brain trauma could be another factor of neuroinflammation.

Keywords: neuroinflammation, brain contusion, macrophages, epiplexus, phagocytes

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) головного мозга (ГМ) является причиной воспаления органов центральной нервной системы при ряде заболеваний, таких как энцефалит и спинальный архноидит [5, 10]. Также выделяют интракраниальные осложнения ЧМТ воспалительного генеза [5]. Нейровоспаление признается частью патогенеза при внутричерепной травме, а именно при ушибе или сотрясении мозга [10]. Учитывая высокое распространение ЧМТ в общей заболеваемости, возникает необходимость нозологической верификации нейровоспаления при диагностике легкой и средней степени тяжести. Изменение тонуса и проницаемости кровеносных сосудов головного мозга (ГМ) это важный компонент воспалительного процесса. В оболочках ГМ присутствуют ноцицепторы и механорецепторные системы, которые отсутствуют в составе белого

и серого вещества, что затрудняет оценку механизмов нейровоспаления при ЧМТ [1, 8]. При нарушении кровотока в результате различных причин, в том числе ЧМТ, возникают деструктивные изменения нервной ткани с развитием локального воспаления, в реализации которого принимают участие все популяции фагоцитирующих клеток ГМ [10]. К последним, относятся поверхностные клетки сосудистых сплетений желудочков (эпиплексусные клетки, клетки Колмера), которые являются особой популяцией фагоцитов и отличаются от микроглии, происходящей из желточного мешка, костномозговым генезисом. Эти клетки фагоцитируют фрагменты цитоплазмы эпителиоцитов сосудистого сплетения, содержащие не утилизируемые вещества и поврежденные органеллы [4, 9]. Исследование иммунной регуляции кровотока при ЧМТ, в том

числе роли клеток Колмера в патогенезе нейровоспаления, находится на стадии сбора фактических данных и требует адекватного экспериментального изучения.

Цель исследования – изучить состояние клеток Колмера сосудистых сплетений желудочков головного мозга при экспериментальном ушибе головного мозга легкой степени.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на половозрелых крысах-самцах Wistar (200–250 г) в соответствии с положениями Хельсинкской декларации и рекомендациями Директивы Европейского сообщества (86/609 Г.С), дизайн исследования одобрен междисциплинарным этическим комитетом ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (№ 3 от 20.09.2017 г.). Животные были распределены на 2 группы: 1 – контрольная, интактные животные (n = 10); 2 – животные с моделированием ЛЧМТ (n = 30) на 1-е сут (n = 10), 8-е (n = 10), 14-е (n = 10). Все потенциально болезненные вмешательства в проводимых экспериментах, а также эвтаназия осуществлялись под комбинированным инъекционным наркозом: золетил 0,003 мг/г (Virbac, Франция), ксиланит 0,008 мг/г (ЗАО «НИТА-ФАРМ», г. Саратов), раствор атропина сульфат 0,1% – 0,01 мл на 100 г. Для воспроизведения ушиба головного мозга легкой степени (УГМЛс) использовали модифицированную

модель падающего груза “weight-drop model” [2], адаптированную для взрослых крыс. Для нанесения УГМЛс применяли установку, включающую штатив с направляющей падение груза (масса 200 г) трубкой, который падает с высоты 1 м на затылочную область головы животного. Для гистологического исследования образцы головного мозга фиксировали в 4%-ном забуференном формалине, готовили микропрепараты по классической технологии с последующим окрашиванием по Нисслию и гематоксилин-эозином. Для иммуногистохимического исследования использовали неконъюгированные поликлональные кроличьи антитела к крысиному антигену CD45 (Invitrogen, США; 1:200). В качестве вторичных антител применяли поликлональные стрептовидиновые, конъюгированные с пероксидазой, и хромогенный субстрат для их выявления диаминобензидин (Spring Bio-Science Corporation, США). Препараты оценивали с помощью микроскопа CX41, оснащенного цифровой камерой (Olympus, Япония). Морфометрическую обработку изображений осуществляли с помощью программы NIS-Elements Imaging Software (Nikon, Japan). Статистический анализ результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, США). Все значения представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (M±m). Данные по группам проанализированы с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при p < 0,05.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА МАРКЕРОВ УШИБА ГОЛОВНОГО МОЗГА ЛЕГКОЙ СТЕПЕНИ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF MARKERS OF MILD BRAIN CONTUSION

Название маркеров Name of markers	Контроль. Интактные животные Control. Intact animal	1-е сутки после УГМЛс 1 st day after mTBC	8-е сутки после УГМЛс 8 th day after mTBC
Диаметр прекапилляров, мкм Precapillary diameter, μm	9,40±0,51	6,7±0,3**	7,50±0,34*
Диаметр капилляров, мкм Capillary diameter, μm	4,960±0,051	3,700±0,021**	4,00±0,05**
Диаметр посткапилляров, мкм Postcapillary diameter, μm	8,500±0,161	6,20±0,12**	7,40±0,14**
% гипохромных нейронов % of hypochromic neurons	5,200±0,583	40,40±1,53***	25,800±4,538*
% гиперхромных нейронов % of hyperchromic neurons	5,000±0,548	40,60±,52***	27,20±6,65***
% нормохромных нейронов % of normochromic neurons	89,800±0,917	19,00±11,38***	47,05±98,70***

Примечание. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 – в сравнении с контрольной группой.

Note. * p < 0.001, **p < 0.01, *** p < 0.05, in comparison with the control group.

Результаты и обсуждение

При воспроизведении УГМЛс у животных отсутствовали летальные исходы и существенные двигательные расстройства. В острый период УГМЛс при микроскопическом исследовании ГМ в 70% случаев у животных в просвете третьего и боковых желудочков обнаружена десквамация эпендимоцитов с резко выраженным полнокровием и кровоизлияниями при диапедезе эритроцитов в полость желудочков. Это указывало на высокий риск развития кровоизлияний в желудочках ГМ при выбранном режиме моделирования ЧМТ. В острый период УГМЛс (до 3 суток) при исследовании некортекса отмечалась гипохромия и пикноз клеток нервной ткани, что указывало на их дистрофические изменения. По апикальной поверхности сосудистого сплетения эпендимы обнаружены уплощенные отростчатые эпиплексусные макрофагальные клетки Колмера. Эти данные указывают на иммунную составляющую патогенеза УГМЛс. В области перипеллюлярного и периваскулярного отека нервной ткани наблюдались CD45 позитивные клетки, характеризующие наличие паренхиматозных макрофагов гемопозитического генеза. Также при исследовании хореидальной полоски боковых и третьего желудочков ГМ выявлены признаки экспрессии иммунных маркеров нейровоспаления. В ГМ контрольной и на 8-й день экспериментальной группы животных признаки экспрессии CD45 и лейкоцитарная инфильтрация его оболочек отсутствовали. Увеличение толщины субархноидального пространства и спадение просвета пиальных кровеносных сосудов с ишемизацией кортикального отдела микроциркуляторного русла ГМ у травмированных животных сохранялись длительный период наблюдения, тогда как количество нормохромных нейронов постепенно восстанавливалось. Обсуждение.

Результаты нашего исследования подтверждают, что церебральный вазоспазм является тяжелым осложнением нейровоспаления после ушиба головного мозга [6]. Причем, острое воспаление

характеризуется последовательностью сосудистых изменений, проявляющихся развитием спазма сосудов, артериальной, венозной гиперемии и стаза. Венозная гиперемия характеризуется дальнейшим расширением сосудов, полнокровием ткани, феноменом краевого стояния лейкоцитов и их эмиграцией с усилением процессов экссудации [9]. Иннервация от подкорковых нейронов или локальных корковых интернейронов в отношении паренхиматозных артериол и корковых микрососудов, к сожалению, обеспечивает минимальный контакт и преимущественно нацелен на окружающие астроциты [7].

Заключение

Нами получены данные наличия на апикальной поверхности эпителиоцитов сосудистого сплетения CD45 позитивных клеток, округлой или звездчатой формы с длинными отростками, которые характеризуются как клетки Колмера [4, 9]. Причем, в результате травматического воздействия в ГМ отмечалась активация указанных клеток, которая сопровождалась увеличением их числа и приобретением округлой формы для эффективного фагоцитоза. Подобная активация клеток Колмера отмечается при наличии нейровоспалительной реакции, последствием которой является увеличение объема желудочков мозга [4, 9]. Достоверная динамика показателей альтерации нейронов и глии и наличие перипеллюлярного отека после ушиба головного мозга является одной из структурно-функциональных причин активации паренхиматозных макрофагов (микроглии) ГМ, тогда как функция эпиплексусных макрофагов (клетки Колмера) в настоящий момент остается недостаточно изученной [4, 9]. Наши данные показателя толщины субархноидального пространства модуляция процесса секреции и динамики ликвора после ушиба вызывает активацию эпиплексусных макрофагов, что, на наш взгляд, является одним из маркеров формирования нейровоспаления в тканях ГМ. Другой причиной нейровоспаления является реакция астроцитов на травму ГМ [3].

Список литературы / References

1. Мотавкин П.А., Черток В.М. Иннервация мозга // Тихоокеанский медицинский журнал, 2008. Т. 3, № 33. С. 11-23. [Motavkin P.A., Chertok V.M. Brain innervation. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2008, Vol. 3, no. 33, pp. 11-23. (In Russ.)]
2. Радьков И.В., Плехова Н.Г., Дюйзен И.В., Зиновьев С.В., Барышев А.Н. Способ моделирования ушиба головного мозга легкой степени. Патент РФ № 2725287С1. 2020. Бюл. № 19. [Radkov I.V., Plekhova N.G., Dyujzen I.V., Zinoviyev S.V., Baryshev A.N. Method for simulating brain contusion of mild degree. Patent RU 2725287 C1, 2020, Bull. No. 19.]
3. Радьков И.В., Плехова Н.Г., Зиновьев С.В., Шуматов В.Б. Клетки врожденного иммунитета в патогенезе черепно-мозговой травмы // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 2. С. 480-482. [Radkov I.V., Plekhova N.G., Zinoviyev S.V., Shumatov V.B. The innate immunity cells in the pathogenesis of

traumatic brain injury. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 2, pp. 480-482. (In Russ.)]

4. Brioschi S., Yingyue Zhou Y., Marco M. Brain Parenchymal and extraparenchymal macrophages in development, homeostasis, and disease. *J. Immunol.*, 2020, Vol. 204, no. 2, pp. 294-305.

5. Gean A.D., Fischbein N.J. Head trauma. *Neuroimaging Clin. N. Am.*, 2010, Vol. 20, no. 4, pp. 527-556.

6. Loret J.E., Zemmoura I., Daumas-Duport B., Buffenoir K., Paulus J., Hame O. Delayed post traumatic vasospasm leading to ischemia in a patient with mild traumatic brain injury. *J. Neurol. Disord. Stroke*, 2013, Vol. 1, no. 2, pp. 10-14.

7. Perretti M., Ahluwalia A. The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids. *Microcirculation*, 2000, Vol. 7, no. 3, pp. 147-161.

8. Petzold G.C., Murthy V.N. Role of astrocytes in neurovascular coupling. *Neuron*, 2011, Vol. 71, no. 5, pp. 782-797.

9. Wan Y., Hua Y., Garton H.J.L., Novakovic N., Keep R.F., Xi G. Activation of epileptus macrophages in hydrocephalus caused by subarachnoid hemorrhage and thrombin. *CNS Neurosci. Ther.*, Vol. 25, no 10, pp. 1134-1141.

10. Wofford K.L., Loane D.J., Cullen D.K. Acute drivers of neuroinflammation in traumatic brain injury. *Neural Regen. Res.*, 2019, Vol. 14, pp. 1481-1489.

Авторы:

Плехова Н.Г. — д.б.н., заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Зиновьев С.В. — к.м.н., старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Authors:

Plekhova N.G., PhD, MD (Biology), Head, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Zinoviev S.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Просекова Е.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Радьков И.В. — младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Prosekova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department of Clinical Laboratory Diagnostics, General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Radkov I.V., Junior Researcher, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 20.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 20.05.2021
Accepted 17.06.2021

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ИММУНОПРИВИЛЕГИРОВАННОГО ОРГАНА (СЕМЕННОИКА) НА ПОВРЕЖДЕНИЕ

Храмцова Ю.С., Тюменцева Н.В., Арташян О.С., Юшков Б.Г.

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

Резюме. В состав микроокружения сперматозоидов и их предшественников входят различные клетки иммунной системы, что указывает не только на их значение в создании иммунной привилегированности органа, но и на регуляторную роль этих структур в реализации важнейших физиологических функций. Однако, если вопросы иммуноприлегированности достаточно детально разобраны, то регуляторная функция остается малоизученной и в литературе практически не освещены вопросы локальной регуляции сперматогенеза при участии различных компонентов микроокружения семенников в процессах их регенерации. Цель исследования – определить особенности реакции соединительной ткани семенников крыс после тупой травмы. Исследование проведено на половозрелых крысах-самцах линии Wistar. Экспериментальные животные были разделены на 2 группы: интактные животные и животные с тупой травмой левого семенника, выведенные из эксперимента на 7-е и 30-е сутки. Моделирование тупой травмы осуществляли путем сдавливания всего органа щипцами с силой 15 Н в течение 3 секунд без нарушения целостности оболочек. Для гистологического исследования производили забор семенников, готовили препараты по стандартной схеме, окрашивали гематоксилин-эозином, толуидиновым синим (для выявления тучных клеток) и по Ван Гизону (для выявления коллагеновых волокон в соединительнотканной оболочке). На препаратах семенников оценивали различные компоненты соединительной ткани и сперматогенеза. Подсчет количественных показателей проводили с использованием программы ImageJ. Для оценки функционального состояния клеток Лейдига проводили исследование уровня общего тестостерона в крови хемилюминесцентным методом. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Statistica 8.0. Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна–Уитни. Обнаружено, что восстановление сперматогенеза в поврежденном семеннике к 30-м суткам после травмы не происходит, при этом реакция со стороны соединительной ткани отмечается в обоих семенниках, более выраженная в поврежденном органе, и проявляется в изменении микроциркуляторного русла семенника, стимуляции реакции фибробластов, разнонаправленном действии мастоцитов и клеток Лейдига в зависимости от срока воздействия. Изменения различных компонентов микроокружения поврежденного семенника приводит в свою очередь к аналогичным изменениям и в неповрежденном органе. Механизм этого изменения обычно связывают с действием антиспермальных антител и развитием аутоиммунных

Адрес для переписки:

Храмцова Юлия Сергеевна
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: hramtsova15@mail.ru

Address for correspondence:

Khramtsova Yulia S.
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: hramtsova15@mail.ru

Образец цитирования:

Ю.С. Храмцова, Н.В. Тюменцева, О.С. Арташян,
Б.Г. Юшков «Особенности реакции соединительной
ткани иммуноприлегированного органа (семенника)
на повреждение» // Российский иммунологический
журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 195–202.
doi: 10.46235/1028-7221-1011-RTD
© Храмцова Ю.С. и соавт., 2021

For citation:

Yu.S. Khramtsova, N.V. Tyumentseva, O.S. Artashyan,
B.G. Yushkov "Reaction to damage of connective tissue
in immunoprivileged organ (testis)", Russian Journal of
Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021,
Vol. 24, no. 2, pp. 195–202.
doi: 10.46235/1028-7221-1011-RTD
DOI: 10.46235/1028-7221-1011-RTD

процессов, однако еще одним возможным механизмом нарушения сперматогенеза во втором парном неповрежденном органе может являться влияние соединительнотканного микроокружения на клетки сперматогенного эпителия.

Ключевые слова: семенник, иммунопривилегированный орган, регенерация, повреждение, соединительная ткань, тучные клетки, клетки Лейдига, тестостерон, сосуды

REACTION TO DAMAGE OF CONNECTIVE TISSUE IN IMMUNOPRIVILEGED ORGAN (TESTIS)

Khramtsova Yu.S., Tyumentseva N.V., Artashyan O.S., Yushkov B.G.

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

Abstract. Microenvironment of sperm and its precursors includes various immune cell populations. This indicates not only their importance for immune privileged state within testes, but it concerns a regulatory role of these structures in performance of the most important physiological functions. Despite sufficient knowledge on the immune privileged state in the organ, the regulatory functions are scarcely studied, and existing literature virtually does not cover the issues of local spermatogenesis regulation by various components of testicular microenvironment in the course of their regeneration. Purpose of the present study was to define the reactions of connective tissue in rat testis following traumatic lesion. Materials and methods: the study was carried out in mature male Wistar rats. Experimental animals were divided into 2 groups: intact animals and animals with blunt trauma to the left testicle. The animals were removed from the experiment on the 7th and 30th days. Blunt trauma was simulated by squeezing the organ with forceps with a force of 15 N for 3 seconds. For histological examination, the testes were excised, preparations were made by the standard scheme, stained with hematoxylin/eosin, toluidine blue (to identify mast cells), and according to Van Gieson (to detect collagen fibers). Distinct components of connective tissue and spermatogenesis were evaluated in testicular preparations. Quantitative indexes were calculated using the ImageJ program. Total testosterone levels in the blood were determined by chemiluminescence technique. Statistical evaluation was performed with Statistica 8.0 software. Comparison of groups was performed using Mann–Whitney test. We have found that restoration of spermatogenesis in the damaged testis did not occur within 30 days after the injury. While the reaction of connective tissue was noted in the both testes, it was more pronounced in the damaged organ, and manifests as changes in testicular microvasculature, stimulation of fibroblastic response, multidirectional effects of mast cells and Leydig cells, depending on the duration of exposure. Changes in various components of microenvironment in the damaged testis led to similar changes in the intact organ. The mechanism of this change is usually associated with effect of antisperm antibodies and development of autoimmune processes, but another possible mechanism for impairment of spermatogenesis in the second paired intact organ may include effects of connective tissue microenvironment upon the spermatogenic epithelial cells.

Keywords: testis, immunoprivileged organ, regeneration, damage, connective tissue, mast cells, Leydig cells, testosterone, blood vessels

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (тема № АААА-А21-121012090091-6).

Введение

Общепризнано, что ключевым фактором, определяющим иммунную привилегированность тестикул, является состояние гематотестикуляр-

ного барьера (ГТБ) и микроокружения сперматозоидов и их предшественников [5, 7, 9, 12]. В состав последнего входят различные клетки иммунной системы: макрофаги [3], дендритные клетки [6], Т-лимфоциты [4], тучные клетки [1], что указывает не только на их значение в создании иммунной привилегированности органа, но и на регуляторную роль этих структур в реализа-

ции важнейших физиологических и патофизиологических функций.

Однако, если вопросы иммунопривилегированности достаточно детально разобраны [8, 14], то регуляторная функция остается малоизученной и в литературе практически не освещены вопросы локальной регуляции сперматогенеза при участии различных компонентов микроокружения семенников в процессах их физиологической и репаративной регенерации. При этом соединительная ткань и ее компоненты, безусловно, играют ключевую роль в обеспечении иммунологической защиты, регуляции обмена веществ и восстановлении после травм [2].

В связи с вышесказанным **цель исследования** – определить особенности реакции соединительной ткани семенников крыс после тупой травмы.

Материалы и методы

Исследование проведено на половозрелых крысах-самцах линии Wistar. Животных содержали по 5 в клетке, при температуре 20-22 °С и в свободном доступе к воде и пище. Экспериментальные животные в условиях опыта были разделены на 2 группы: 1) интактные животные в возрасте четырех месяцев (n = 5); 2) животные с тупой травмой левого семенника и выведенные из эксперимента на 7-е (n = 5) и 30-е сутки (n = 5).

Моделирование тупой травмы, или компрессии, осуществляли путем сдавливания всего органа щипцами с силой 15 Н в течение 3 секунд без нарушения целостности оболочек. Все хирургические манипуляции проводили под действием диэтилового эфира.

Животных выводили из эксперимента на вышеуказанные сроки путем передозировки диэтилового эфира. Для гистологического исследования брали семенники, которые взвешивали (после чего рассчитывали весовой индекс, как масса органа, мг / массу животного, г) и фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина. После стандартной гистологической проводки на автомате закрытого типа Shandon Excelsior (MICROM International GmbH, Германия), материал заливали в парафин с помощью станции для заливки биологических тканей парафином ЕС 350. После этого полученные парафиновые блоки нарезали на полуавтоматическом микротоме Thermo scientific Microm HM 450 (MICROM International GmbH, Германия), толщина срезов семенников составляла 4-5 мкм.

Для морфометрических исследований препараты окрашивали гематоксилин-эозином, толуидиновым синим (для выявления тучных клеток)

и по Ван Гизону (для выявления коллагеновых волокон в соединительнотканной оболочке). Оценку различных показателей проводили на световом микроскопе Leica DM 5000 B (Leica, Германия), оснащенный камерой Leica DFC 490 (Leica, Германия). Подсчет количественных показателей проводили с использованием программы ImageJ. На препаратах семенников оценивали следующие компоненты соединительной ткани: соединительнотканную капсулу (толщина (мкм)), кровеносные сосуды (площадь (мкм²)), клетки Лейдига и тучные клетки (количество на единицу площади).

Для оценки синтетической активности ТК классифицировали на 4 типа. К 1-му типу относили клетки с малым содержанием гранул секрета в цитоплазме, который располагается околочембранно. Тип 2 – клетки с хорошо дифференцированной гранулярностью в цитоплазме и диффузным расположением гранул. Тип 3 – крупные клетки с плотным и диффузным расположением гранул в цитоплазме. К типу 0 относили дегранулированные клетки с признаками нарушения целостности цитоплазматической мембраны и выделения в окружающее тканевое пространство цитоплазматических гранул. Для определения синтетической активности вычисляли средний гистохимический коэффициент (СГК): $СГК = (3n + 2n + 1n + 0n) / 100$, где n – число клеток типа 3, 2, 1 или 0 согласно классификации, приведенной выше, 100 – общее число подсчитанных клеток в группе. Для оценки функциональной активности по выбросу гранул ТК в межклеточное пространство использовали индекс дегрануляции (ИД, %), который рассчитывали по формуле: $ИД = Д / (Д + Н) \times 100$, где Д – число ТК с явными признаками дегрануляции, Н – число не активированных ТК.

Для оценки функционального состояния клеток Лейдига проводили исследование уровня общего тестостерона в крови (нмоль/л) хемилюминесцентным методом на анализаторе ADVIA Centaur XP (Siemens, США). Анализ крови делали на гематологическом анализаторе Celly 70 (Biocode Hucel, Франция).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Statistica 8.0. Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента была проведена оценка различных компонентов микроокружения по-

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО ЛЕЙКОЦИТОВ И КОНЦЕНТРАЦИЯ ТЕСТОСТЕРОНА В КРОВИ КРЫС НА РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ТРАВМЫ

TABLE 1. NUMBER OF LEUKOCYTES AND THE CONCENTRATION OF TESTOSTERONE IN THE BLOOD OF RATS AT DIFFERENT TIMES AFTER INJURY

Показатели Indicators	Интактные животные Intact animals (n = 5)	7 суток после травмы After 7 days (n = 5)	30 суток после травмы After 30 days (n = 5)
Лейкоциты Leukocytes			
Общее количество лейкоцитов, × 10⁹/л The total count of leukocytes, × 10 ⁹ /l	5,72±0,45	10,60±0,62*	15,14±0,63* **
Количество лимфоцитов, × 10⁹/л The count of lymphocytes, × 10 ⁹ /l	3,90±0,34	7,42±0,52*	8,62±0,53*
Количество моноцитов, × 10⁹/л The count of monocytes, × 10 ⁹ /l	0,40±0,12	1,34±0,16*	2,74±0,48*
Количество гранулоцитов, × 10⁹/л The count of granulocytes, × 10 ⁹ /l	1,42±0,22	1,84±0,44	3,78±0,51* **
Тестостерон Testosterone			
Уровень сывороточного тестостерона, нмоль/л Testosterone, nmol/l	12,87±2,13	15,33±5,86	5,54±1,47*

Примечание. * – различия достоверны по сравнению с группой интактных животных ($p < 0,05$, U-критерий Манна–Уитни). ** – различия достоверны по сравнению с 7-ми сутками ($p < 0,05$, U-критерий Манна–Уитни).

Note. *, differences are reliable compared with a group of intact animals ($p < 0.05$, Mann–Whitney U test). **, differences are reliable compared with 7 days ($p < 0.05$, Mann–Whitney U test).

врежденно и неповрежденно семенников, а также анализ периферической крови. Все исследуемые параметры свидетельствуют о развитии воспалительной реакции в поврежденном органе. Так, на 7-е сутки после воздействия у животных в периферической крови наблюдается лейкоцитоз за счет повышения содержания лимфоцитов и моноцитов. На 30-е сутки происходит усиление воспалительной реакции, что выражается в дальнейшем увеличении общего числа лейкоцитов и гранулоцитов (табл. 1).

Весовой индекс семенников к 7-м суткам эксперимента уменьшается, что свидетельствует о преобладании дегенеративных процессов в органе, а к 30-м – увеличивается до показателя интактных животных, вероятно, это связано с развитием воспалительного отека тканей семенника

(табл. 2). Это подтверждается и результатами, полученными в ходе морфологического анализа.

В семенниках на 7-е сутки после тупой травмы отмечается развитие деструктивных процессов, что проявляется в снижении количества зародышевых клеток в канальцах, появлении канальцев с некрозом и отсутствием сперматозоидов в части канальцев. На 30-е сутки в целом сохраняется аналогичная гистологическая картина – отсутствующие сперматозоиды в части канальцев, выпадение зародышевых клеток в просвет канальца, возможно, за счет утрачивания связи с sustentocytes (поддерживающими клетками), и на месте погибших таким образом сперматозоидов в эпителии канальцев отмечалось появление полостей округлой формы (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки).

ТАБЛИЦА 2. МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЕМЕННИКОВ КРЫС ПОСЛЕ ТРАВМЫ

TABLE 2. MORPHOMETRIC PARAMETERS OF RAT TESTES AFTER INJURY

Показатели Indicators	Интактные животные Intact animals (n = 5)	7 суток после травмы After 7 days (n = 5)		30 суток после травмы After 30 days (n = 5)	
		Поврежденный семенник Damaged testis	Неповрежден- ный семенник Intact testis	Поврежденный семенник Damaged testis	Неповрежден- ный семенник Intact testis
Весовой индекс, мг/г Weight index, mg/g	6,24±0,25	5,34±0,27	5,09±0,15*	6,28±0,10**	6,08±0,16**
Толщина капсулы, мкм Capsule thickness, μm	2,10±1,31	3,50±0,38*	3,00±0,49	3,63±0,34*	3,46±0,60*
Компоненты микроокружения Microenvironment components					
Количество клеток Лейдига на 0,25 мм ² Leydig cells per 0,25 mm ²	12,37±0,59	13,94±1,09	13,59±0,86	12,51±1,16	12,85±1,11
Количество тучных клеток, на 1 мм ² Mast cells per 1 mm ²	10,22±0,28	16,04±0,54*	15,16±0,57*	11,70±0,71**	10,86±0,41**
СГК тучных клеток IHC of mast cells	1,62±0,06	1,92±0,01*	0,44±0,14*	1,68±0,04**	0,78±0,29*
ИД тучных клеток, % DI of mast cells, %	11,20±0,58	17,20±1,39*	62,2±10,1*	15,80±0,58*	58,0±11,7*
Площадь мелких сосудов, мкм ² Area of small vessels, μm ²	592,56±136,60	252,12±37,26*	449,09±123,11	1284,83±230,81* **	945,84±221,99
Площадь крупных сосудов, мкм ² Area of large vessels, μm ²	28581,05±3692,54	42383,63±7263,19	62840,21±33166,84	39917,03±7972,02	42725,53±11103,51*

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Толщина соединительнотканной оболочки поврежденного семенника достоверно увеличивается как на 7-е, так и на 30-е сутки. У неповрежденных семенников также наблюдается тенденция к утолщению соединительнотканной капсулы (табл. 2).

Повреждение вызывает реакцию со стороны сосудистой системы семенника. К 7-м суткам происходит достоверное увеличение количества мелких и крупных сосудов в поврежденных тестикулах, при этом площадь мелких сосудов в поврежденных семенниках достоверно уменьшается по сравнению с контрольной группой и, напротив, на 30-е сутки она достоверно увеличивается, что свидетельствует об активных процессах неоангиогенеза на этом сроке. Площадь крупных сосудов имеет тенденцию к увеличению на все исследуемые сроки эксперимента (табл. 2). Это, вероятнее всего, связано с увеличением проницаемости сосудов на фоне длительного воспаления, что приводит к периваскулярному отеку семенника. При этом в неповрежденных семенниках не было выявлено достоверных различий по сравнению с контролем.

В интерстициальном пространстве располагаются клетки Лейдига округлой или многоугольной формы, с ацидофильной цитоплазмой, вакуолизированной по периферии. В течение всего эксперимента по моделированию тупой травмы семенника их количество на единицу площади не меняется (табл. 2), из чего можно сделать вывод, что тупая травма не оказывает влияния на этот показатель. При этом, если уровень сывороточного тестостерона на 7-е сутки остается на уровне интактных животных, то на 30-е сутки этот показатель снижается (табл. 2), что означает частичную утрату способности клеток к стероидогенезу.

После тупой травмы также наблюдается реакция со стороны тучных клеток, которая проявляется увеличением их количества на 7-е сутки, но уже на 30-е сутки происходит снижение числа мастоцитов до уровня интактных животных. Вместе с количеством тучных клеток достоверно возрастает и их синтетическая активность на 7-е сутки. На 30-е сутки после воздействия уровень синтетической активности тучных клеток возвращается к нормальным показателям. Индекс дегрануляции повышается на все сроки эксперимента (табл. 2).

Компрессия семенника является травмой, при которой воздействию подвергается весь орган, и повреждающее действие распространяется как на извитые семенные каналцы и, соответственно, структуру их ГТБ, так и на интерстициальные клетки, сосуды и чувствительную паренхиму се-

менника [13]. На все сроки эксперимента отмечается лейкоцитоз, что свидетельствует о развитии воспалительного процесса после начала аутоиммунного ответа, развивающегося вследствие сенсибилизации аутоантигенами половых клеток. Все эти изменения, нарастающие процессы воспалительного характера на поздних сроках эксперимента свидетельствуют о том, что регенераторный этап в семенниках не наступает, а напротив преобладает деструкция [11]. Компенсаторная восстановительная реакция лишь отмечается со стороны соединительной ткани и ее отдельных элементов.

Снаружи семенник покрыт множеством оболочек, однако непосредственно сражены с ним лишь две: висцеральный листок серозной оболочки и белочная оболочка, которая представлена плотной волокнистой соединительной тканью. При моделировании тупой травмы одного семенника толщина соединительнотканной оболочки обоих семенников достоверно увеличивается. Поскольку данная оболочка представлена коллагеновыми и эластическими волокнами, компоненты которых выделяются фибробластами и фиброцитами, то увеличение ее толщины можно объяснить усилением функций этих клеток в ответ на травматическое воздействие.

Семенник активно кровоснабжается. В соединительной ткани между семенными каналцами расположены капилляры, обеспечивающие обмен веществ между кровью и сперматогенным эпителием. В травмированном органе количество сосудов увеличивается, что связано с нарушением микроциркуляции и с активацией регенераторных процессов при повреждении, в то время как в неповрежденных семенниках показатель остается на уровне интактных животных. Площадь поперечного сечения сосудов в поврежденном семеннике уменьшается на фоне увеличения их количества.

В рыхлой соединительной ткани между петлями извитых каналцев располагаются интерстициальные клетки — клетки Лейдига. Они скапливаются вокруг кровеносных капилляров. При их неизменном количестве данные клетки на поздние сроки эксперимента частично утрачивают свою способность к стероидогенезу [10].

Еще одним важным компонентом микроокружения семенников являются тучные клетки, которые по большей части локализованы вокруг сосудов оболочки семенника, но обнаруживаются иногда и в интерстициальном пространстве. Несмотря на то, что клетки практически не выходят в интерстиций, они секретируют биологически активные вещества, которые в свою очередь

и проникают в межканальцевое пространство и действуют непосредственно там [1]. На ранние сроки, мастоциты способствуют развитию воспаления и косвенно приводят к деструкции органа. На поздних сроках за счет повышенной дегрануляционной активности тучные клетки, в совокупности с другими элементами микроокружения, поддерживают течение воспалительных процессов, увеличивают проницаемость сосудов.

Заключение

Таким образом, восстановление сперматогенеза в поврежденном семеннике к 30-м суткам после тупой травмы не происходит, при этом реакция соединительной ткани отмечается в обоих семенниках, более выраженная в поврежденном органе. Изменения различных компонентов микроокружения поврежденного семенника после механической травмы приводит в свою очередь к аналогичным изменениям и в неповрежденном

органе. Механизм этого изменения обычно связывают с действием антиспермальных антител и развитием аутоиммунных процессов, однако еще одним возможным механизмом нарушения сперматогенеза во втором парном неповрежденном органе может являться реакция со стороны соединительнотканного микроокружения клеток сперматогенного эпителия. Активация компонентов соединительнотканного микроокружения в неповрежденном семеннике, вероятно, происходит за счет выработки мезенхимальных ростковых факторов в поврежденной ткани, которые в дальнейшем распространяются и на парный здоровый орган через межклеточную жидкость и капиллярную сеть, оказывая стимулирующее действие на его клетки.

Благодарности

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

Список литературы / References

1. Храмова Ю.С., Арташян О.С., Тюменцева Н.В., Юшков Б.Г., Бухарина А.Ю. Тучные клетки и сперматогенез в норме и при повреждении // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 237–246. [Khramtsova Yu.S., Artashyan O.S., Tuymentseva N.V., Yushkov B.G., Bukharina A.Yu. Interrelation of mast cells with spermatogenesis in norm and in case of damage. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 237-246. (In Russ.)]
2. Beltrán-Frutos E., Seco-Rovira V., Ferrer C., Martínez-Hernández J., Madrid J.F., Sáez F.J., Canteras M., Pastor L.M. Changes in testicular interstitial connective tissue of hamsters (*Mesocricetus auratus*) during ageing and after exposure to short photoperiod. *Reprod. Domest. Anim.*, 2016, Vol. 51, no. 1, pp. 47-53.
3. Bhushan S., Tchatalbachev S., Lu, Y., Fröhlich S., Fijak M., Vijayan V., Meinhardt A. Differential activation of inflammatory pathways in testicular macrophages provides a rationale for their subdued inflammatory capacity. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 11, pp. 5455-5464.
4. Chen Q., Deng T., Han D. Testicular immunoregulation and spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2016, Vol. 59, pp. 157-165.
5. Cheng C.Y., Mruk D.D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol. Rev.*, 2012, Vol. 64, no. 1, pp. 16-64.
6. Guazzone V.A., Hollwegs S., Mardirosian M., Jacobo P., Hackstein H., Wygrecka M., Fijak M. Characterization of dendritic cells in testicular draining lymph nodes in a rat model of experimental autoimmune orchitis. *Int. J. Androl.*, 2011, Vol. 34, no. 3, pp. 276-289.
7. Li N., Wang T., Han D. Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 152. doi: 10.3389/fimmu.2012.00152.
8. Meinhardt A., Hedger M.P. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2011, Vol. 335, no. 1, pp. 60-68.
9. Mruk D.D., Cheng C.Y. The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation. *Endocr. Rev.*, 2015, Vol. 36, no. 5. pp. 564-591.
10. Olesen I.A., Joensen U.N., Petersen J.H., Almstrup K., Rajpert-De Meyts E., Carlsen E., McLachlan R., Juul A., Jørgensen N. Decrease in semen quality and Leydig cell function in infertile men: a longitudinal study. *Hum. Reprod.*, 2018, Vol. 33, no. 11, pp. 1963-1974.
11. Silva C.A., Cocuzza M., Borba E.F., Bonfa E. Cutting-edge issues in autoimmune orchitis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 2. pp. 256-263.
12. Stanton P.G. Regulation of the blood-testis barrier. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2016, Vol. 59, pp. 166-173.

13. Starmer B.Z., Baird A., Lucky M.A. Considerations in fertility preservation in cases of testicular trauma. *BJU Int.*, 2018, Vol. 121, no. 3, pp. 466-471.
14. Zhao S., Zhu W., Xue S., Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell. Mol. Immunol.*, 2014, Vol. 11, no. 5, pp. 428-437.

Авторы:

Храмцова Ю.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Тюменцева Н.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Арташян О.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Юшков Б.Г. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий лабораторией иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Khramtsova Yu.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Tyumentseva N.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Artashyan O.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Yushkov B.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 20.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 20.05.2021
Accepted 17.06.2021

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СТРЕССА НА АПОПТОЗ CD4⁺/CD8⁺ ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ *IN VIVO*

Шаравьева И.Л.¹, Гейн С.В.^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

² ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Резюме. Эндогенная опиоидная система представлена биологически активными молекулами, которые принимают участие в регуляции многих функций организма, в том числе в регуляции работы иммунной системы. Эндогенные опиоидные пептиды выделяются при стрессе и осуществляют коммуникации посредством опиатных рецепторов, которые обнаружены на большинстве иммуннокомпетентных клеток. Одним из важнейших инструментов регуляции процессов иммунной системы является апоптоз. Цель исследования – оценить влияние различных видов стресса на апоптоз CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов в условиях блокады опиатных рецепторов. Объектом исследования служили белые беспородные мыши самцы, которых содержали в лабораторном виварии. Следующие виды стресса были изучены: иммобилизационный (6 ч в положении на спине), ротационный (60 мин: 10 мин вращение при 78 об/мин, 5 мин отдых), два вида острого холодового (10 мин или 60 мин при -20 °С), хронический холодовой (-4 °С по 4 часа ежедневно, на протяжении 7 суток). Опиатные рецепторы блокировали подкожным введением налоксона гидрохлорида в дозе 0,2 мг/кг за 20 мин до стресса и через 3 часа повторно, при длительности стресса более 3 часов. Спленциты окрашивали моноклональными антителами PE anti-mouse CD4 и PE anti-mouse CD8 (BioLegend, США), после инкубации и отмывки окрашивали реагентами для определения апоптоза Annexin V-FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, США) в соответствии с инструкцией производителя. Апоптоз лимфоцитов регистрировали на цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Установлено, что иммобилизационный стресс (продолжительностью 6 ч) и острый холодовой стресс (60 мин -20 °С) независимо от введения налоксона усиливают апоптоз CD8⁺ лимфоцитов селезенки мыши. Хронический холодовой стресс (-4 °С 4 часа / 7 суток) приводил к снижению процента апоптотических лимфоцитов селезенки только на фоне блокады опиатных рецепторов. Эффектов ротационного стресса и кратковременного острого холодового стресса (10 мин -20 °С) на процессы апоптоза зафиксировано не было. Таким образом, два вида стресса – иммобилизационный и острый холодовой – усиливали апоптоз CD8⁺ лимфоцитов, эндогенная опиоидная система не принимала участия в регуляции этих процессов. В условиях хронического холодового стресса на фоне введения налоксона отмечалось уменьшение связывания аннексина лимфоцитами селезенки мыши.

Ключевые слова: стресс, апоптоз, T-лимфоциты, опиоидная система, налоксон, иммунная система

Адрес для переписки:

Шаравьева Ирина Леонидовна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614000, Россия, г. Пермь, ул. Ленина, 11.
Тел.: 8 (912) 781-81-25.
E-mail: irin.sh@gmail.com

Address for correspondence:

Sharavieva Irina L.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural
Branch, Russian Academy of Sciences
614000, Russian Federation, Perm, Lenina str., 11.
Phone: 7 (912) 781-81-25.
E-mail: irin.sh@gmail.com

Образец цитирования:

И.Л. Шаравьева, С.В. Гейн «Влияние различных видов стресса на апоптоз CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов в условиях блокады опиатных рецепторов *in vivo*» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 203–208. doi: 10.46235/1028-7221-1012-IOD

© Шаравьева И.Л., Гейн С.В., 2021

For citation:

I.L. Sharavieva, S.V. Gein “Influence of different kinds of stress on apoptosis of CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes upon *in vivo* blockage of opiate receptors”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 203–208. doi: 10.46235/1028-7221-1012-IOD

DOI: 10.46235/1028-7221-1012-IOD

INFLUENCE OF DIFFERENT KINDS OF STRESS ON APOPTOSIS OF CD4⁺/CD8⁺ LYMPHOCYTES UPON *IN VIVO* BLOCKAGE OF OPIATE RECEPTORS

Sharavieva I.L.^a, Gein S.V.^b

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

^b Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Abstract. The endogenous opioid system is involved in regulation of many body functions, including immune system regulation. Endogenous opioid peptides are released under stress and communicate with opiate receptors, which are found on most immune cells. Apoptosis is one of the most important instruments in the regulation of the immune system. The aim of this study was to evaluate effects of various types of stress upon apoptosis of CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes under conditions of opiate receptor blockade. The objects of this study were white outbred male mice, been kept in laboratory vivarium. The following types of stress were studied: immobilization (6 h in the supine position), rotational (60 min: 10 min rotation at 78 rpm, 5 min rest), two types of acute cold (10 min or 60 min at -20 °C), chronic cold (-4 °C for 4 hours daily, for 7 days). Opiate receptors have been blocked by subcutaneous administration of naloxone hydrochloride at a dose of 0.2 mg/kg 20 minutes before stress, and again 3 hours later, with a stress duration of over 3 hours. Splenocytes were stained with PE-labeled monoclonal antibodies against murine CD4, and antibodies against mouse CD8 (BioLegend, USA); after incubation and washing, they were stained with reagents for determining apoptosis. V-FITC / 7-AAD annexin kit (Beckman Coulter, USA) according to the manufacturer's instructions. Lymphocyte apoptosis was recorded with a CytoFLEX S cytometer (Beckman Coulter, USA). Results. It was found that immobilization stress (lasting 6 h) and acute cold stress (60 min -20 °C), regardless of naloxone administration, enhance apoptosis of mouse CD8⁺ lymphocytes. Chronic cold stress (-4 °C 4 hours / 7 days) led to a decrease in apoptotic spleen lymphocyte numbers only during the blockade of opiate receptors. The effects of rotational stress and short-term acute cold stress (-20 °C, 10 min) upon apoptosis were not registered. Thus, two types of stress (immobilization and acute cold) caused intensification of CD8⁺ lymphocyte apoptosis; endogenous opioid system seems not to participate in regulation of these processes. Under conditions of chronic cold stress with naloxone injections, we have noted a decreased Annexin binding by spleen lymphocytes in mice.

Keywords: stress, apoptosis, T-lymphocytes, opioid system, naloxone, immune system

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

Введение

Эндогенная опиоидная система представлена физиологически активными биорегуляторными соединениями, осуществляющими коммуникации между нервной, эндокринной и иммунной системами [5]. Экспрессия опиатных рецепторов доказана на большинстве клеток иммунной системы. Разнообразные варианты стресса, а также их различная продолжительность, могут значительно отличаться по степени выраженности эндокринных изменений и, как следствие, с разной направленностью влиять на иммунный ответ [4].

Ранее нами было показано, что различные варианты стресса модулируют продукцию активных форм кислорода, антителогенез, пролиферацию, продукцию цитокинов, также показано, что

блокада опиатных рецепторов изменяет динамику отдельных показателей, в частности отменяет влияние стресса на антителогенез, продукцию IL-2, IFN γ , пролиферативный ответ [1, 2]. Одним из важнейших инструментов регуляции процессов иммунной системы является апоптоз.

Цель работы – изучить влияние различных вариантов стрессового воздействия на апоптоз CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов в условиях блокады опиатных рецепторов.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на белых мышцах-самцах массой тела 21–23 г. Животные содержались в лабораторном виварии при естественном освещении, неограниченном доступе к воде и кормам. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используе-

мых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

В работе использованы следующие варианты стресса: иммобилизационный (мышей фиксировали в положении на спине в течение 6 ч), ротационный (ротация мышей осуществлялась в течение 1 часа по 10 мин с перерывами 5 мин при 78 об/мин), холодовой в трех вариантах (10 мин или 60 мин при -20 °С, а также хронический холодовой стресс – охлаждение мышей при -4 °С в течение 4 часов ежедневно 7 суток подряд).

Блокаду опиатных рецепторов осуществляли путем введения налоксона гидрохлорида в дозе 0,2 мг/кг подкожно за 20 мин до начала любого варианта стресса, повторно через 3 часа при иммобилизации, дважды ежедневно при хроническом холодовом стрессе.

После окончания стрессового воздействия животных выводили из эксперимента. В случае ротационного и иммобилизационного стресса одна половина животных выводилась из эксперимента непосредственно после стресса, другая половина через 24 часа после окончания стрессового воздействия. Спленоциты гомогенизировали, эритроциты лизировали раствором NH₄Cl с ЭДТА, клетки окрашивали моноклональными

антителами PE anti-mouse CD4 и PE anti-mouse CD8 (BioLegend, США) в течение 20 минут в соответствии с инструкцией производителя, после чего клетки отмывали DPBS (Sigma, США) и окрашивали с помощью реагентов Annexin V-FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, США) в соответствии с инструкцией производителя, и регистрировали апоптоз лимфоцитов методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Результаты представлены в виде процента клеток, связавших аннексин, от всех спленоцитов. Статистическую обработку результатов проводили с использованием непарного t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При оценке влияния различных вариантов стресса на апоптоз CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов селезенки мыши установлено, что иммобилизационный стресс независимо от блокады опиатных рецепторов усиливал апоптоз CD8⁺ лимфоцитов и не оказывал влияния на апоптоз CD4⁺-клеток. Ротационный стресс на апоптоз обеих субпопуляций Т-клеток не влиял (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ РОТАЦИОННОГО И ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА НА АПОПТОЗ Т-ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ МЫШИ В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, M±m

TABLE 1. INFLUENCE OF ROTATIONAL AND IMMOBILIZATION STRESS ON THE PERCENTAGE OF APOPTOSIS OF T LYMPHOCYTES IN THE SPLEEN OF A MOUSE UNDER CONDITIONS OF BLOCKADE OF OPIATE RECEPTORS, M±m

Экспериментальное воздействие Experimental exposure	Процент апоптических клеток Percentage of apoptotic cells	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺
контроль control	16,75±0,90%	8,96±0,45%
ротационный стресс rotational stress	19,38±1,73%	8,74±0,19%
ротационный стресс + налоксон rotational stress + naloxone	16,49±1,96%	9,33±0,71%
иммобилизационный стресс immobilization stress	16,78±1,32%	13,25±0,52%*
иммобилизационный стресс + налоксон immobilization stress + naloxone	19,16±1,89%	13,55±0,89%*
налоксон naloxone	13,87±0,66%	10,12±1,18%
налоксон 2 раза naloxone twice	10,67±1,91%	9,58±0,61%

Примечание. * – p < 0,05 к контролю (n = 9).

Note. *, p < 0.05 to control (n = 9).

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА НА АПОПТОЗ CD4⁺/CD8⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ МЫШИ В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, M±m

TABLE 2. INFLUENCE OF DIFFERENT VARIANTS OF COLD STRESS ON THE PERCENTAGE OF APOPTOSIS OF T-LYMPHOCYTES IN THE SPLEEN OF A MOUSE UNDER CONDITIONS OF BLOCKADE OF OPIATE RECEPTORS, M±m

Экспериментальное воздействие Experimental exposure	Процент апоптических клеток Percentage of apoptotic cells	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺
контроль control	16,75±0,90%	8,96±0,45%
-20 °С, 10 мин -20 °C, 10 min	19,38±1,73%	8,74±0,19%
-20 °С, 10 мин + налоксон -20 °C, 10 min + naloxone	16,49±1,96%	9,33±0,71%
-20 °С, 60 мин -20 °C, 60 min	16,78±1,32%	13,25±0,52%*
-20 °С, 60 мин + налоксон -20 °C, 60 min + naloxone	19,16±1,89%	13,55±0,89%*
+4 °С, 4 часа в сутки / 7 суток +4 °C, 4 hours a day / 7 days	18,36±3,94%	11,25±2,57%
+4 °С, 4 часа в сутки / 7 суток + налоксон +4 °C, 4 hours a day / 7 days + naloxone	12,98±0,97%*	9,59±1,18%
налоксон naloxone	17,45±0,89%	8,74±0,71%
налоксон 2 раза naloxone twice	14,44±0,25%	10,82±1,47%

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Через сутки после окончания ротационного или иммобилизационного стрессов эффектов на апоптоз лимфоцитов зафиксировано не было (данные не приводятся).

Далее представлены результаты влияния различных вариантов холодого стресса на апоптоз CD4⁺/CD8⁺Т-лимфоцитов селезенки мыши (табл. 2). Установлено, что в условиях 60 мин холодого стресса отмечалось независимое от налоксона усиление апоптоза CD8⁺ и не зафиксировано эффектов на апоптоз CD4⁺-клеток. Кратковременный 10-минутный холодого стресс на процессы программируемой клеточной гибели CD4⁺/CD8⁺Т-лимфоцитов влияния не оказывал. Хронический холодого стресс только на фоне блокады опиоидных рецепторов приво-

дил к снижению связывания с аннексином CD4⁺ лимфоцитов.

Выводы

Таким образом, как видно из полученных результатов, CD8⁺Т-лимфоциты более чувствительны к апоптоз-индуцирующему действию стресса. Апоптотическое действие было зафиксировано только у моделей иммобилизационного и 60-минутного холодого стресса. Эндогенная опиоидная система в регуляции данных процессов не участвовала, и только в случае хронического холодого стресса наблюдалось снижение процента апоптоза CD4⁺ лимфоцитов на фоне стресса при условии блокады опиоидных рецепторов.

В работах других авторов было показано, что хронический тепловой стресс способствовал экспрессии антиапоптозного фактора В-клеточной лимфомы-2 (Bcl-2) и ингибировал апоптоз лимфоцитов в селезенке и слизистой оболочке кишечника. С этим процессом связывают значительное увеличение количества CD4⁺T-клеток и соотношения CD4⁺/CD8⁺T-клеток в селезенке.

Также отмечалось повышение содержания белка теплового шока 70 (HSP70) [3], который может повышаться и при холодном стрессе. Более продолжительный иммобилизационный стресс (по 12 ч в течение 2 суток) приводил к повышению CD-95 опосредованного апоптоза спленоцитов, который мог быть отменен введением налоксона или налтрексона [6].

Список литературы / References

1. Гейн С.В., Шаравьева И.Л. Влияние ротационного и иммобилизационного стресса на продукцию IL-1 β , IL-2, IL-4 и IFN- γ спленоцитами в условиях блокады опиатных рецепторов *in vivo* // Доклады Академии наук, 2014. Т. 454, № 4. С. 485-487. [Gein S.V., Sharavieva I.L. Effect of rotation and immobilization stress on IL-1 β , IL-2, IL-4, and IFN- γ production by splenocytes under opiate receptor blockade *in vivo*. *Doklady Akademii nauk = Proceedings of the Academy of Sciences*, 2014, Vol. 454, no. 4, pp. 485-487. (In Russ.)]
2. Шаравьева И.Л., Гейн С.В. Роль эндогенной опиоидной системы в регуляции антителогенеза при хроническом холодном стрессе // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 2-2. С. 969-971. [Sharav'eva I. L., Gein S. V. The role of the endogenous opioid system in the regulation of antibody genesis during chronic cold stress. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 2-2, pp. 969-971. (In Russ.)]
3. Huo C., Xiao C., She R., Liu T., Tian J., Dong H., Tian H., Hu Y. Chronic heat stress negatively affects the immune functions of both spleens and intestinal mucosal system in pigs through the inhibition of apoptosis. *Microb. Pathog.*, 2019, Vol. 136, 103672. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103672.
4. Khedri M., Samei A., Fasihi-Ramandi M., Taheri R. A. The immunopathobiology of T cells in stress condition: a review. *Cell Stress Chaperones*, 2020, Vol. 25, no. 5, pp. 743-752.
5. Sharp B.M., Roy S., Bidlack J.M. Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system. *J. Neuroimmunol.*, 1998, Vol. 83, no. 1-2, pp. 45-56.
6. Yin D., Tuthill D., Mufson R.A., Shia Y. Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 191, no. 8, pp. 1423-1428.

Авторы:

Шаравьева И.Л. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов, 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:

Sharavieva I.L., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Biochemistry of Development of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Гейн С.В. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»; директор Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

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

Поступила 20.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 20.05.2021
Accepted 17.06.2021

АУТОИММУННЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ

Давыдова Е.В., Осиков М.В., Бакеева А.Е., Кайгородцева Н.В.

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

Резюме. На сегодняшний день в мире число заболеваний органов пищеварения удваивается каждые десять лет, что представляет собой значимую медико-социальную проблему. Недостаточное понимание ряда аспектов патогенеза воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) препятствует разработке патогенетически обоснованных методов терапии. Патогенез ЯК остается дискуссионным, в связи с большим набором этиологических факторов, инициирующих активацию клеточных и гуморальных механизмов иммунного реагирования в процессе формирования воспалительных изменений в толстом кишечнике. Малоизученными остаются вопросы цитокиновой регуляции иммунного реагирования при ВЗК. Цель работы – на примере экспериментальной оксазолоновой модели язвенного колита изучить роль цитокинов аутоиммунной направленности в крови и Т-регуляторных клеток в тканях толстого кишечника в патогенезе данного заболевания.

Работа выполнена на 40 белых крысах линии Wistar, язвенный колит моделировали ректальным введением 3%-ного спиртового раствора оксазолон. Для анестезии использовали препарат «Золетил-100» (МНН: тилетамина гидрохлорид) (Virbac Sante Animale; Франция) в дозе 20 мг/кг. Исследования проводили на 2-е, 4-е и 6-е сутки. Концентрацию в сыворотке IL-17 и IL-23 определяли с помощью автоматического иммуноферментного анализатора Personal LAB с применением специфических тест-системы для крыс. Для иммуногистохимического исследования Т-регуляторных клеток использовали анти-FoxP3 антитела (Arigo Biolaboratories, Тайвань) с последующей постановкой реакции в иммуногистостейнере VENTANA BenchMark XT (США). Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца. Отличия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Установлено, что при экспериментальном язвенном колите в сыворотке крыс на 2-е, 4-е и 6-е сутки эксперимента увеличивается концентрация провоспалительного IL-17, эффекты которого реализуются посредством привлечения в очаг воспаления нейтрофилов и других клеток врожденного иммунитета, участием в поддержании хронического воспаления и аутоиммунных реакциях. Концентрация в сыворотке IL-23, индуцирующего и поддерживающего воспалительный процесс в стенке толстого кишечника, также значимо увеличивались на 2-е, 4-е и 6-е сутки. На 4-е и 6-е сутки эксперимента в клеточных популяциях ткани толстого кишечника значимо снижался процент позитивных FoxP3⁺Т-лимфоцитов, что свидетельствует о возможном разворачивании аутоиммунных процессов в стенке толстого кишечника.

Ключевые слова: цитокины, Т-лимфоциты, экспериментальный язвенный колит

Адрес для переписки:

Давыдова Евгения Валерьевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454048, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (908) 060-92-06.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

Address for correspondence:

Davydova Evgeniya V.
South Ural State Medical University
454048, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (908) 060-92-06.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.В. Давыдова, М.В. Осиков, А.Е. Бакеева,
Н.В. Кайгородцева «Аутоиммунный профиль крови
крыс при экспериментальном язвенном колите»
// Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24,
№ 2. С. 209–214.
doi: 10.46235/1028-7221-1013-АРО
© Давыдова Е.В. и соавт., 2021

For citation:

E.V. Davydova, M.V. Osikov, A.E. Bakeeva,
N.V. Kaigorodtseva "Autoimmune profile of rat blood
in experimental ulcerative colitis", Russian Journal of
Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021,
Vol. 24, no. 2, pp. 209–214.
doi: 10.46235/1028-7221-1013-АРО
DOI: 10.46235/1028-7221-1013-АРО

AUTOIMMUNE PROFILE OF RAT BLOOD IN EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS

Davydova E.V., Osikov M.V., Bakeeva A.E., Kaigorodtseva N.V.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Worldwide incidence of digestive system disorders doubles each decade, thus representing a significant medical and social problem. Despite lacking knowledge in pathogenesis of inflammatory bowel diseases, it is clear that serum cytokine imbalance, and lesions in the walls of gastrointestinal tract are observed in experimental colitis. Pathogenesis of UC remains controversial due to a large set of etiological factors that initiate activation of cellular and humoral mechanisms of the immune response upon development of inflammatory changes in the large intestine. At the same time, cytokine secretion and expression have not been studied in details. The aim of the work was to study the cytokine profile of blood in rats using the experimental oxazolone model of ulcerative colitis. The work was performed in 40 white Wistar rats; ulcerative colitis was induced by rectal administration of a 3% alcohol solution of oxazolone. For anesthesia, Zoletil-100 (INN: tiletamine hydrochloride, VirbacSanteAnimale; France) was used at a dose of 20 mg/kg. The studies were carried out on the 2nd, 4th and 6th days. Serum concentration of IL-6, IL-8, IL-17 and IL-23 was determined by means of automatic ELISA analyzer "Personal LAB" using a specific test system for rats. For immunohistochemistry of Treg cells, we used anti-FoxP3 antibody (Arigo Biolaboratories, Тайвань) followed by immunohistostaining in VENTANA BenchMark XT (USA). Statistical evaluation was performed by non-parametric Mann–Whitney and Wald–Wolfowitz criteria. The difference was considered significant at $p \leq 0.05$. In rats with experimental colitis, an increase of proinflammatory IL-17 which acts by attraction of neutrophils and other cells of innate immunity, supporting chronic inflammation and autoimmune reactions. We have found an increase of serum IL-23 concentration in rats with experimental ulcerative colitis on days 2, 4 and 6 of the experiment. This cytokine induces and maintains the inflammatory process in the wall of the large intestine. Significant decrease of FoxP3⁺T-lymphocytes was revealed in colonic tissues, thus suggesting appropriate local autoimmune disorders.

Keywords: cytokines, T-lymphocytes, experimental ulcerative colitis

Введение

На сегодняшний день в мире число заболеваний органов пищеварения удваивается каждый десять лет, что представляет собой значимую медико-социальную проблему [7]. Рост заболеваемости язвенным колитом (ЯК) в том числе среди молодых социально активных и трудоспособных лиц, отмечается многими исследователями [1, 5]. Патогенез ЯК до конца не ясен, прежде всего, в связи с широким спектром этиологических факторов, инициирующих активацию клеточных и гуморальных компонентов иммунной системы при участии Th1-, Th2-зависимого иммунного ответа, изменения баланса Th17/Treg [13]. Известно, что при ВЗК в крови формируется особый цитокиновый профиль, инициирующий и поддерживающий хроническое воспаление, а сами цитокины являются ключевыми мишенями патогенетически ориентированной терапии [11, 15]. В патогенезе поражения слизистой оболочки толстого кишечника при ЭЯК имеет значение IL-23-зависимая активация Th17-зависимого иммунного ответа с последующим

увеличением продукции гуморальных эффекторных факторов иммунитета [14]. Имеет место дифференциация наивных Th0 при участии IL-12 в Th1-субпопуляцию, при участии IL-4 в Th2-субпопуляцию, а при участии IL-23, IL-1 β , TGF- β , IL-21 – в Th17 [8]. Однако цитокиновая секреция и экспрессия изучена не в полной мере.

Цель работы – на примере экспериментальной оксазолоновой модели язвенного колита изучить роль цитокинов аутоиммунной направленности в патогенезе данного заболевания.

Материалы и методы

Исследование проведено на 40 белых крысах линии Wistar массой 240-260 г, разделенных на 2 группы: I (n = 10) – интактный контроль; II (n = 30) – животные с ЭЯК. Постановка модели ЯК проводилась с помощью двухэтапного введения оксазолонана (Sigma-aldrich; США). Первый этап включал кожную сенсibilизацию за счет нанесения 150 мкл 3%-го спиртового раствора оксазолонана межлопаточную область, второй этап представлял собой ректальное введение 150 мкл

3%-го спиртового раствора оксазолон на глубину 7-8 см [9]. Для анестезии был применен препарат «Золетил-100» (МНН: тилетамин гидрохлорид) (Virbac Sante Animale; Франция) в дозе 20 мг/кг. Концентрацию в сыворотке IL-17, IL-23 определяли на 2-е, 4-е и 6-е сутки, с помощью автоматического иммуноферментного анализатора Personal LAB (Италия) с применением иммуноферментной тест-системы для крыс фирмы Cloud-Clone Corp. (Китай). Результаты выражали в пг/мл. Для иммуногистохимического исследования были использованы фрагменты стенки толстого кишечника опытных и контрольных животных: вырезанные фрагменты ткани помещали в маркированные гистологические кассеты и фиксировали 72 часа в 10% нейтральном формалине. Подготовку материала проводили по стандартной методике в гистопроцессоре Sakura Tissue Tek VIP 5 Tissue Processor. Окраска гематоксилином и эозином производилась ручным способом по общепринятой схеме: депарафинизация, регидратация, окраска красителями, дегидратация, просветление и заключение под покровное стекло. Для иммуногистохимического исследования использовали анти-FoxP3 антитела (Arigo Biolaboratories, Тайвань). Постановка иммуногистохимической реакции производилась в иммуногистостейнере Ventana BenchMark XT (США). Подсчет клеток производили на микроскопе PrimoStar (Carl Zeiss), с морфометрической установкой Pro 150ES (Pixer), диапазон увеличений: окуляр 10, объектив 20. Для анализа полученных изображений использовали программу QuPath. Обработка полученных данных осуществлялась с помощью пакета программ Statistica 10.0 for Windows, с использованием непараметрических критериев Манна–Уитни, Вальда Вольфовитца, Краскелла–Уоллиса. Статистические

различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Особую роль в развитии иммунного ответа при экспериментально-индуцированных воспалительных процессах в дистальных отделах толстого кишечника играют провоспалительные цитокины. В ряде исследований в изменении иммунного статуса показана роль провоспалительных цитокинов аутоиммунной направленности IL-17 и IL-23 [12].

В таблице 1 представлена динамика уровня провоспалительных цитокинов при экспериментальном ЯК на 2-е, 4-е и 6-е сутки наблюдения. Установлено, что концентрация IL-23 в сыворотке статистически значимо увеличивается на 2-е сутки в сравнении с показателем, полученным в группе интактных животных, и достигает максимальных значений на 6-е сутки. Концентрация IL-17 значимо возрастает на 4-е и 6-е сутки в сравнении с показателем интактных животных.

Полученные данные указывают на формирование провоспалительного профиля крови в ответ на развитие оксазолон-индуцированного язвенного колита. Известно, что одна из ключевых позиций патогенеза ВЗК является реализация оси IL-23/Th17 [3, 4]. IL-23 относится к семейству IL-12, имеет общую с IL-12 субъединицу p40, продуцируется преимущественно макрофагами, дендритными и др. клетками и связывается с рецепторами IL-12 β 1 на наивных Th0, Th17, макрофагах, нейтрофилах и др. клетках. Доказано, что Th17-связанные эффекторные цитокины, такие как IL-17A и IL-17F индуцируют и поддерживают воспалительный процесс в стенке толстого кишечника и других отделов ЖКТ за счет рекру-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATION OF SOME CYTOKINES IN SERUM IN EXPERIMENTAL COLITIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель, пг/мл Parameter, pg/ml	Группа 1 Интактные Group 1 Intact (n = 10)	Группа 2 ЭК 2-е сутки Group 2 EC 2 nd day (n = 10)	Группа 2 ЭК 4-е сутки Group 2 EC 4 th day (n = 10)	Группа 2 ЭК 6-е сутки Group 2 EC 6 th day (n = 10)
IL-17	7,8 (7,2-8,0)	5,7 (5,2-6,4)	14,3 (13,8-18,9)*	16,7 (16,2-24,9)*
IL-23	31,26 (28,59-42,34)	72,25 (69,54-84,52)*	75,47 (55,19-78,31)*	84,6 (71,18-97,16)*

Примечание. * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1.

Note. *, significant ($p < 0.05$) difference with group 1.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ FоxP3-ПОЗИТИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CONCENTRATION OF FоxP3 IN MUCOSA OF THE LARGE INTESTINE IN EXPERIMENTAL COLITIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель, ед./мм ² Parameter, item/mm ²	Группа 1 Интактные Group 1 Intact (n = 10)	Группа 2 ЭК 2-е сутки Group 2 EC 2 nd day (n = 10)	Группа 2 ЭК 4-е сутки Group 2 EC 4 th day (n = 10)	Группа 2 ЭК 6-е сутки Group 2 EC 6 th day (n = 10)
FоxP3	3,5 (3,2-4,3)	3,4 (3,3-4,1)	2,8 (2,2-3,0)*	2,4 (1,8-2,6)*

Примечание. См примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

тирования из кровотока нейтрофилов, при участии ИЛ-8, индукции синтеза макрофагами провоспалительных медиаторов ИЛ-6, ИЛ-1β, TNFα и др., секреции матриксных металлопротеиназ фибробластами кишечника [10]. В то же время показано, что концентрация ИЛ-23 у больных с воспалительными заболеваниями кишечника повышается в сыворотке и в стенке кишечника и коррелирует с активностью заболевания [6]. ИЛ-23 также рассматривается как связующее звено между реакциями врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника и потенциальная терапевтическая мишень [6].

Обнаруженные изменения цитокинового профиля крови при экспериментальном язвенном колите в виде увеличения концентрации провоспалительных цитокинов ИЛ-17, ИЛ-23 в сыворотке могут являться отражением аутоиммунного процесса, формирующегося в стенке толстого кишечника. В связи с этим на следующем этапе в динамике экспериментального колита исследовано содержание FоxP3-позитивных Т-лимфоцитов (Т-регуляторных лимфоцитов) в стенке толстого кишечника (табл. 2).

Результаты оценки процентного содержания количества FоxP3-позитивных клеток в слизистой оболочке толстого кишечника при экспериментальном колите представлены в таблице 2. На 4-е и 6-е сутки процент FоxP3-позитивных

клеток в слизистой оболочке толстого кишечника значительно снижался в сравнении с показателем группы интактных животных. Максимальное снижение FоxP3-позитивных клеток в динамике эксперимента фиксировалось на 6-е сутки. Снижение в динамике ЭЯК количества Т-регуляторных лимфоцитов на фоне роста в крови ИЛ-17 и ИЛ-23 создает предпосылки для развертывания аутоиммунных реакций в стенке толстого кишечника при ЭЯК. Важным моментом для дифференцировки Т-хелперов 17-го типа, продуцирующих ИЛ-17, является концентрация TGF-β, который в низких концентрациях стимулирует развитие Т-хелперов 17-го типа из наивных Th0, а в высоких — продукцию в Th0 наивных белка FоxP3, блокирующего экспрессию генов, связанных с RORγt, результатом чего является дифференцировка наивных хелперных клеток в Treg-клетки [2].

Выводы

Выявленный нами дисбаланс в повышении в крови ИЛ-17 и ИЛ-23 на фоне снижения в динамике ЭЯК в тканях толстого кишечника процента Т-регуляторных клеток, осуществляющих контроль за развитием аутоиммунных процессов, может свидетельствовать о формировании аутоиммунного цитокинового профиля крови на фоне развития аутовоспалительных изменений в стенке толстого кишечника.

Список литературы / References

1. Долгушина А.И., Хусаинова Г.М., Василенко Г.М., Кононенко А.Г. Распространенность воспалительных заболеваний кишечника в Челябинской области // Альманах клинической медицины, 2019. Т. 47, № 6. С. 511-517. [Dolgushina A.I., Khusainova G.M., Vasilenko G.M., Kononenko A.G. Prevalence of inflammatory bowel disease in the Chelyabinsk region. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2019, Vol. 47, no. 6, pp. 511-517. (In Russ.)]
2. Дьяченко П.А., Дьяченко А.Г. Клетки Th17 и их роль в возникновении аутоиммунных заболеваний // Иммунология та алергологія: наука і практика, 2011. № 2. С. 4-10. [Dyachenko P.A., Dyachenko A.G. Th17 cells and their role in the occurrence of autoimmune diseases. *Imunologiya i alergologiya: nauka i praktika = Immunology and Allergology: Science and Practice*, 2011, no. 2, pp. 4-10. (In Russ.)]

3. Bo L., Fu H., Yang J. Comprehensive analysis of gene expression profiles provides insight into the pathogenesis of Crohn's disease. *Mol. Med. Rep.*, 2018, Vol.18, no. 3, pp. 2643-2650.
4. Borecki K., Zawada I., Salkić N.N., Karakiewicz B., Adler G. Relationship between the IL23R SNPs and Crohn's disease susceptibility and phenotype in the polish and bosnian populations: a case-control study. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2019, Vol. 16, no. 9, 1551. doi: 10.3390/ijerph16091551.
5. Burisch J., Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2015, Vol. 50, no. 8, pp. 942-951.
6. Catana C.S., Neagoe I.B., Cozma V., Magdaş C., Tăbăran F., Dumitraşcu D.L. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 2015, Vol. 21, no. 19, pp. 5823-5830.
7. Corridoni D., Arseneau K.O., Cominelli F. Inflammatory bowel disease. *Immunol. Lett.*, 2014, Vol. 161, no. 2, pp. 231-235.
8. Gálvez J. Role of Th17 cells in the pathogenesis of human IBD. *ISRN Inflamm.*, 2014, Vol. 2014, 928461. doi: 10.1155/2014/928461.
9. Heller F., Fuss I.J., Nieuwenhuis E.E., Blumberg R.S., Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis is mediated by IL13-producing NK-T cells. *Immunity*, 2002, Vol. 17, no. 5, pp. 629-638.
10. Jiang W., Su J., Zhang X., Cheng X., Zhou J., Shi R., Zhang H. Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Res.*, 2014, Vol. 63, no. 11, pp. 943-950.
11. Korolkova O.Y., Myers J.N., Pellom S.T., Wang L., M'Koma A.E. Characterization of serum cytokine profile in predominantly colonic inflammatory bowel disease to delineate ulcerative and crohn's colitides. *Clin. Med. Insights. Gastroenterol.*, 2015, Vol. 8, pp. 29-44.
12. Lai L.J., Shen J., Ran Z.H.. Natural killer T cells and ulcerative colitis. *Cell. Immunol.*, Vol. 335, pp. 1-5.
13. Lee S.H., Kwon J.E., Cho M.L. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest. Res.*, 2018, Vol. 16, no. 1, pp. 26-42.
14. Omenetti S., Pizarro T.T. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome/ S. Omenetti. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 639. doi: 10.3389/fimmu.2015.00639.
15. Singh U.P., Singh N.P., Murphy E.A. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine*, 2016, Vol. 77, pp. 44-49.

Авторы:

Давыдова Е.В. – д.м.н., доцент, профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Осиков М.В. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Davydova E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Osikov M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Бакеева А.Е. — ассистент кафедры фармакологии
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Bakeeva A.E., Assistant Professor, Department of
Pharmacology, South Ural State Medical University,
Chelyabinsk, Russian Federation

Кайгородцева Н.В. — ассистент кафедры
патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-
Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск,
Россия

Kaigorodtseva N.V., Assistant Professor, the Department of
Pathological Physiology, South Ural State Medical University,
Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 20.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 20.05.2021
Accepted 17.06.2021

ВОЗДЕЙСТВИЕ ПАССИВНОГО КУРЕНИЯ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРЫС ВИСТАР И ИХ ПОТОМСТВА

**Кузьмичева Н.А., Михайлова И.В., Чайникова И.Н.,
Пушкарева Л.А., Филиппова Ю.В., Смолягин А.И.**

*ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Оренбург, Россия*

Резюме. В литературе освещены различные аспекты негативного влияния активного и пассивного табакокурения на организм человека и экспериментальных животных. Значительно меньше внимания уделено особенностям иммунной системы потомства от пассивно куривших животных. В ранее опубликованных работах нами изучены физиологические и иммунологические показатели у крысят, родившихся от пассивно куривших крыс. Настоящая работа расширяет рамки данного направления и посвящена оценке иммунологических показателей у пассивно куривших беременных крыс и их потомства. Проведено количественное определение иммунологических показателей у беременных крыс Вистар, подвергшихся пассивному табакокурению, и у 65 крысят от куривших и некуривших животных. Опытные крысы подвергались фумигации табачным дымом по 8 часов с 1-го по 20-й день беременности. У всех животных определялись масса тела, тимуса и селезенки, количество лейкоцитов, тимоцитов, спленоцитов, миелокариоцитов. На 20-й день беременности у куривших крыс отмечалось достоверное снижение массы животных, числа тимоцитов и миелокариоцитов. У крысят, родившихся от куривших самок, по сравнению с контрольными животными также отмечается снижение массы животных и тимуса, количества тимоцитов. В основе выявленных сдвигов иммунологических показателей может лежать ряд возможных причин. С одной стороны, табачный дым способствует активации свободнорадикальных процессов с одновременным снижением эффективности антиоксидантных механизмов. Данная активация может являться результатом воздействия компонентов табачного дыма, в частности хрома как металла переменной валентности, а также бензола, биотрансформация которого осуществляется с участием механизмов свободнорадикального окисления. С другой стороны, компоненты табачного дыма могут являться стимуляторами апоптоза, который играет значимую роль в клеточном опустошении органов системы иммуногенеза. Наряду с этим, снижение количества тимоцитов может быть обусловлено их миграцией из коркового вещества сначала в мозговое вещество, а затем в кровоток. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что выявленные изменения исследуемых показателей более выражены у куривших беременных крыс и их потомства и расширяют представления об изменениях иммунной системы у потомства от пассивно куривших животных. Представленные данные могут являться основой для разработки препаратов, снижающих токсическое действие экотоксикантов, в том числе пассивного табакокурения.

Ключевые слова: беременные крысы, пассивное курение, иммунологические показатели

Адрес для переписки:

Кузьмичева Наталья Александровна
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
460000, Россия, г. Оренбург, Парковый пр., 7.
Тел.: 8 (987) 847-52-55.
E-mail: natalie-vip@list.ru

Address for correspondence:

Kuzmicheva Natalia A.
Orenburg State Medical University
460000, Russian Federation, Orenburg, Park ave., 7.
Phone: 7 (987) 847-52-55.
E-mail: natalie-vip@list.ru

Образец цитирования:

Н.А. Кузьмичева, И.В. Михайлова, И.Н. Чайникова,
Л.А. Пушкарева, Ю.В. Филиппова, А.И. Смолягин
«Воздействие пассивного курения на иммунологические
параметры крыс вистар и их потомства»
// Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24,
№ 2. С. 215-220.
doi: 10.46235/1028-7221-1014-EOS
© Кузьмичева Н.А. и соавт., 2021

For citation:

N.A. Kuzmicheva, I.V. Mikhailova, I.N. Chaynikova,
L.A. Pushkareva, Yu.V. Filippova, A.I. Smolyagin "Effect of
second-hand smoke on the immunological parameters of wistar
rats and their offspring", Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2,
pp. 215-220.
doi: 10.46235/1028-7221-1014-EOS
DOI: 10.46235/1028-7221-1014-EOS

EFFECT OF SECOND-HAND SMOKE ON THE IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF WISTAR RATS AND THEIR OFFSPRING

Kuzmicheva N.A., Mikhailova I.V., Chaynikova I.N., Pushkareva L.A., Filippova Yu.V., Smolyagin A.I.

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Abstract. The literature covers multiple negative effects of active and passive tobacco smoking upon the human body and experimental animals. Much lesser attention is given to the features of the immune system in offspring from the passively smoking experimental animals. In previous works, we studied physiological and immunological parameters in the infant rats born from passively smoking rats. The present work expands the scope of this direction and is devoted to assessment of immunological parameters in passively smoking pregnant rats and their offspring. Quantitative determination of immunological parameters was carried out in pregnant Wistar rats exposed to passive tobacco smoking and in 65 pup rats from smoke-exposed and non-exposed animals. The experimental rats were exposed to tobacco smoke for 8 hours from the 1st to the 20th day of pregnancy. In all animals, the body weight, thymus and spleen, the number of white blood cells, thymocytes, splenocytes, and myelocaryocytes were determined. On the 20th day of pregnancy, the smoking rats showed a significant decrease in the weight of animals, the number of thymocytes and myelocaryocytes. A decreased body mass of animals and their thymus glands, lower number of thymocytes were registered in pup rats born from smoking females as compared with control animals. These changes in immunological parameters may be based on a number of possible reasons. On the one hand, tobacco smoke promotes activation of free-radical processes with a simultaneously decreased efficiency of antioxidant mechanisms. This activation may result from exposure to the components of tobacco smoke, in particular, chromium, as a metal of variable valence, as well as benzene, which is transformed by the free-radical oxidation mechanisms. On the other hand, some tobacco smoke components may promote apoptosis which plays a significant role in the cellular exhaustion of immunogenesis system. Moreover, a decreased number of thymocytes may be caused by their migration from cortical areas to the medulla, followed by release into bloodstream. Thus, the results obtained indicate that the detected changes in these parameters are more pronounced in pregnant rats who were exposed to tobacco smoke and their offspring, and expand the knowledge of changes in the immune system in the offspring of passively smoking animals. The presented data may present a basis for development of drugs that reduce toxic effect of ecotoxicants, including passive tobacco smoking.

Keywords: pregnant rats, second-hand smoke, immunological parameters

Введение

Одним из наиболее широко распространенных вариантов влияния экотоксикантов на организм человека и животных является активное и пассивное табакокурение. В литературе освещены различные аспекты негативного влияния табакокурения на организм человека и экспериментальных животных [3]. В то же время значительно меньше внимания уделено особенностям иммунной системы потомства от пассивно куривших животных. Известно, что пассивное табакокурение приводит к проницаемости плаценты для большинства токсических компонентов табачного дыма и их накоплению в амниотической жидкости. Кроме того, токсические продукты активируют процессы свободно-радикального окисления (СРО) [5]. Данные литературы свидетельствуют о том, что с увеличением сроков

беременности у экспериментальных животных происходит акцидентальная инволюция тимуса, сопровождающаяся снижением количества тимоцитов [2].

В ранее опубликованных работах [4, 6] нами изучены физиологические и иммунологические показатели у крысят, родившихся от пассивно куривших крыс. Настоящая работа расширяет рамки данного направления и посвящена оценке иммунологических показателей у пассивно куривших беременных крыс и их потомства.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования были выполнены на 66 опытных и контрольных половозрелых крысах Вистар массой 200-300 г и на 65 крысятах в возрасте 7, 14, 21 дней от рождения. Все животные были разделены на 12 групп: 1-я

группа – 17 интактных самок, 2-я группа – 10 самок на 7-й день беременности, 3-я группа – 11 крыс на 20-й день беременности. Животные 4-й, 5-й, 6-й групп подвергались пассивному табакокурению: 4-я группа – 9 небеременных крыс, 5-я группа – 9 самок на 7-й день беременности, 6-я группа – 11 крыс на 20-й день беременности. 7-ю, 8-ю, 9-ю группы составили крысята от некуривших самок на 7-й, 14-й, 21-й дни от рождения, в 10-ю, 11-ю, 12-ю группы вошли крысята от самок, подвергавшихся пассивному табакокурению на 7-й, 14-й, 21-й дни от рождения. Отсчет сроков беременности самок 2-й, 3-й, 5-й, 6-й групп вели с момента обнаружения сперматозоидов в вагинальных мазках. Опытные крысы (4-я, 5-я, 6-я группы) подвергались фумигации табачным дымом по 8 часов с 1-го по 20-й день беременности. Контрольные крысы в аналогичный период помещались в камеру, вентилируе-

мую атмосферным воздухом без табачного дыма. Животные содержались в стандартных условиях, при двенадцатичасовом световом режиме и свободном доступе к воде и корму. Эвтаназию крысят осуществляли дислокацией шейных позвонков под эфирным наркозом. Масса тела, тимуса и селезенки, количество лейкоцитов, тимоцитов, спленоцитов, миелокариоцитов определялись в соответствии с лабораторными методами исследования экспериментальных животных [1]. Эксперименты были проведены с учетом этических норм и рекомендаций по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей» (Страсбург, 1998); приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики».

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ПАСИВНОГО КУРЕНИЯ НА КОЛИЧЕСТВО ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК В КРОВИ И ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНАХ В ДИНАМИКЕ БЕРЕМЕННОСТИ У КРЫС ВИСТАР, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. EFFECT OF PASSIVE SMOKING ON THE NUMBER OF NUCLEATED CELLS IN THE BLOOD AND LYMPHOID ORGANS IN THE DYNAMICS OF PREGNANCY IN WISTAR RATS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

		Контрольная группа Control group			Опытная группа Exposed group		
		1-я группа Group 1 n = 17	2-я группа Group 2 n = 10	3-я группа Group 3 n = 11	4-я группа Group 4 n = 9	5-я группа Group 5 n = 9	6-я группа Group 6 n = 10
Масса животного, г Rat weight, g		202 (200-220)	291* (267-303)	340* (295-350)	263* (244-84)	279* (265-284)	300* (300-309)
Лейкоциты, × 10⁹ White blood cells, × 10 ⁹		6,2 (4,3-7,9)	6,3 (4,8-6,7)	6,4 (5,2-7,5)	5,0 (3,6-5,7)	5,8 (3,9-7,0)	6,7 (4,8-7,3)
Тимус Thymus	масса, мг weight, mg	275 (227-344)	294 (236-321)	269 (220-316)	256 (233-280)	276 (251-280)	248 (233-289)
	число тимоцитов, × 10⁶/орган number of thymocyte × 10 ⁶ /organ	671 (496-720)	522 (449-579)	365* (268-538)	368* (226-476)	422* (392-525)	248* (235-270)
Селезенка Spleen	масса, мг weight, mg	533 (497-595)	600* (565-635)	515 (477-720)	591 (530-698)	580 (557-595)	561 (543-572)
	число кариоцитов, × 10⁶/орган number of karyocytes × 10 ⁶ /organ	480 (401-609)	547 (496-572)	515 (475-630)	543 (389-571)	567 (504-609)	558 (535-598)
Число миелокариоцитов, × 10⁶/орган Number of myelocaryocytes, × 10 ⁶ /organ		95 (77-112)	69* (60-77)	60* (44-72)	68* (61-90)	46* (40-61)	65* (62-72)

Примечание. * – статистически значимые различия (p < 0,05) с показателями 1-й контрольной группы, n – число животных в группе.

Note. *, significant differences (p < 0.05) with the control group 1; n, population number.

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У КРЫСЯТ, РОДИВШИХСЯ ОТ КОНТРОЛЬНЫХ И ПАССИВНО КУРИВШИХ КРЫС ВИСТАР, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. DYNAMICS OF IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN BABY RATS BORN FROM CONTROL AND PASSIVELY SMOKING WISTAR RATS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

		Контрольная группа Control group			Опытная группа Exposed group		
		возраст крысят, дней age of rats, days					
		7	14	21	7	14	21
		7-я группа Group 7 n = 9	8-я группа Group 8 n = 12	9-я группа Group 9 n = 10	10-я группа Group 10 n = 9	11-я группа Group 11 n = 15	12-я группа Group 12 n = 10
Масса животного, г Rat weight, g		15 (15-16)	20 (19-21)	37 (32-38)	12* (11-13)	23* (21-24)	31* (30-34)
Лейкоциты, × 10 ⁹ White blood cells, × 10 ⁹		4,1 (3,6-4,4)	5,4 (4,5-6,4)	4,0 (3,8-4,6)	3,9 (3,8-4,2)	5,2 (4,6-6,2)	3,6 (3,2-4,9)
Тимус Thymus	масса, мг weight, mg	52 (44-56)	75 (67-91)	126 (117-137)	29* (26-32)	65 (59-71)	95* (92-110)
	число тимоцитов, × 10 ⁶ /орган number of thymocyte × 10 ⁶ /organ	125 (102-134)	116 (96-148)	167 (145-173)	79* (79-85)	115 (107-127)	130* (115-135)
Селезенка Spleen	масса, мг weight, mg	65 (60-75)	74 (68-82)	95 (84-111)	66 (61-72)	72 (68-75)	103 (94-107)
	число кариоцитов, × 10 ⁶ /орган number of karyocytes × 10 ⁶ /organ	110 (95-130)	128 (91-153)	118 (108-137)	93 (72-108)	111 (100-128)	98* (88-110)
Число миелокариоцитов, × 10 ⁶ /орган Number of myelocaryocytes, × 10 ⁶ /organ		9 (9-12)	14 (12-18)	25 (22-28)	12 (9-14)	17 (15-18)	21 (20-25)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Статистическая обработка проводилась с помощью непараметрических методов. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Группы сравнивали с использованием U-критерия Манна–Уитни с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows v. 9.0, StatSoft Inc. (США). Различия считали достоверными при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены иммунологические показатели беременных пассивно куривших и некуривших крыс Вистар. Установлено, что на 20-й день беременности отмечалось достоверное сни-

жение массы куривших крыс. Количество лейкоцитов и масса тимуса у животных контрольных и опытных групп достоверно не изменялась. Важно отметить, что число тимоцитов достоверно снижалось у животных 3-й, 4-й, 5-й, 6-й групп, при этом наименьшее количество тимоцитов отмечалось у куривших крыс к концу беременности (6-я группа). Масса селезенки и число спленоцитов у большинства беременных крыс в контроле и опыте имели небольшую тенденцию к повышению. Напротив, количество миелокариоцитов у животных всех групп было достоверно снижено по сравнению с аналогичным показателем у интактных животных. Таким образом, беремен-

ность куривших и некуривших крыс приводила к увеличению их массы, особенно на 20-й день беременности, и напротив, снижала уровень тимоцитов и миелокариоцитов.

В таблице 2 представлены иммунологические показатели родившихся крысят от куривших и некуривших самок. Как видно из данных таблицы с повышением возраста крысят в контрольных и опытных группах увеличивается их масса. Установлено уменьшение массы крысят в опытных 10-й, 11-й, 12-й группах по сравнению с контрольными животными 7-й, 8-й, 9-й групп. Уровень лейкоцитов у животных всех групп достоверно не изменялась. Масса тимуса и число тимоцитов достоверно снижены у опытных крысят на 7-й, 20-й дни. Масса селезенки достоверно не изменялась у крысят обследованных групп. Количество спленоцитов имело тенденцию к снижению у крысят опытных групп. Уровень миелокариоцитов увеличивался с возрастом животных, но значимо не отличался в опытных группах от контрольных.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что выявленные изменения исследуемых показателей более выражены у куривших беременных крыс и их потомства. Так, на 20-й день беременности у куривших крыс отмечалось достоверное снижение массы животных, числа тимоцитов и миелокариоцитов. У крысят, родившихся от куривших самок, по сравнению с контрольными животными, также отмечается снижение массы животных и тимуса, количества тимоцитов.

Выводы

Обсуждая полученные результаты, необходимо отметить, что в основе выявленных сдвигов

иммунологических показателей у пассивно куривших крыс и их потомства может лежать ряд возможных причин. Так известно, что табачный дым, как и другие неблагоприятные факторы окружающей среды, способствует активации свободнорадикальных процессов с одновременным снижением эффективности антиоксидантных механизмов [8]. Данная активация может являться результатом воздействия компонентов табачного дыма, в частности хрома как металла переменной валентности, а также бензола, биотрансформация которого осуществляется с участием механизмов СРО. В то же время каскад окислительных реакций под действием компонентов сигаретного дыма приводит к появлению окисленных форм гемоглобина, неспособных связывать и транспортировать кислород, что способствует развитию гипоксии, при наличии которой у плода в плаценте возникают выраженные морфологические изменения [9].

Кроме того, причинами снижения тимоцитов может являться их миграция из коркового вещества сначала в мозговое вещество, а затем в кровотоки. Определенное значение также может иметь и апоптоз тимоцитов [7]. Полученные результаты расширяют представления об изменениях иммунной системы у потомства от пассивно куривших крыс. Наряду со снижением массы тела у куривших крыс и их крысят, у животных выявлено уменьшение массы тимуса, числа тимоцитов и миелокариоцитов. Представленные данные, могут являться основой для разработки препаратов, снижающих токсическое действие экотоксикантов, в том числе пассивного табакокурения.

Список литературы / References

1. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск, 2000. 167 с. [Volchegorsky I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L. Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions of the body]. Chelyabinsk, 2000. 167 p.
2. Горбач Т.В., Юнусов В.Ю., Мартынова С.Н. Уровень интоксикации организма и эластичность сосудов новорожденных крысят – потомков крыс, подвергавшихся действию табачного дыма // Буковинский медицинский вiсник, 2014. Т. 18, № 4 (72). С. 20-24. [Gorbach T.V., Yunusov V.Yu., Martynova S.N. The level of intoxication of the body and the elasticity of the vessels of newborn baby rats-descendants of rats exposed to tobacco smoke. *Bukovinskiy medichniy visnik = Bukovinian Medical Bulletin*, 2014, Vol. 18, no. 4 (72), pp. 20-24. (In Russ.)]
3. Куценко С.А. Основы токсикологии. СПб, 2004. 720 с. [Kutsenko S.A. Fundamentals of toxicology]. St. Petersburg, 2004. 720 p.
4. Михайлова И.В., Стадников А.А., Пушкарева Л.А., Исенгулова А.А., Кузьмичева Н.А., Ширшов О.В., Тихонов В.В., Мирошниченко И.В. Оценка физиологических и морфологических параметров у крысят, родившихся от пассивно куривших самок. Сообщение 2 // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 22, № 2-1. С. 411-413. [Mikhailova I.V., Stadnikov A.A., Pushkareva L.A., Isengulova A.A., Kuzmicheva N.A., Shirshov O.V., Tikhonov V.V., Miroshnichenko I.V. Estimation of physiological and morphological parameters in rats born from passively smoked females. Message 2. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 22, no. 2-1, pp. 411-413. (In Russ.)]

5. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. М.: Медицина, 2002. 608 с. [General toxicology. Ed. V.A. Kurl'yandskiy, V.A. Filov]. Moscow: Meditsina, 2002. 608 p.
6. Смолягин А.И., Михайлова И.В., Ермолина Е.В., Пушкарева Л.А., Исенгулова А.А., Кузьмичева Н.А., Мирошниченко И.В. Оценка иммунологических показателей у крысят, родившихся от пассивно куривших самок. Сообщение 1 // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 22, № 2-1. С. 548-550. [Smolagin A.I., Mikhailova I.V., Ermolina E.V., Pushkareva L.A., Isengulova A.A., Kuzmicheva N.A., Miroshnichenko I.V. Estimation of immunological indicators in rats born from passively smoked male. Message 1. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 22, no. 2-1, pp. 548-550. (In Russ.)]
7. Шмагель К.В., Черешнев В.А. Иммулитет беременной женщины. М.: Медицинская книга, 2003. 226 с. [Shmagel K.V., Chereshev V.A. Immunity of a pregnant woman]. Moscow: Meditsinskaya kniga, 2003. 226 p.
8. Burke A., FitzGerald G.A. Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 2003, Vol. 46, no. 1, pp. 79-90.
9. Strzelak A., Ratajczak A., Adamiec A., Feleszko W. Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2018, Vol. 15, no. 5, 1033. doi: 10.3390/ijerph15051033.

Авторы:

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

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

Чайникова И.Н. — д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Пушкарева Л.А. — аспирант кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

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

Смолягин А.И. — д.м.н., профессор, заслуженный работник высшей школы РФ, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Authors:

Kuzmicheva N.A., Senior Lecturer, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

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

Chaynikova I.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Normal Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Pushkareva L.A., Postgraduate Student, Department of Normal Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

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

Smolyagin A.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Поступила 20.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 20.05.2021
Accepted 17.06.2021

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИЦИДНЫХ СВОЙСТВ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ- КСФ – ZP2 В ОТНОШЕНИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ РАЗНОЙ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Гриценко В.А.¹, Тяпаева Я.В.¹, Добрынина М.А.², Зурочка А.В.²

¹ ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Цель – провести сравнительный анализ бактерицидной активности синтетического пептида ZP2 (СП ZP2) в отношении музейных штаммов и клинических изолятов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*.

В работе использованы музейные штаммы *E. coli* (ATCC 25922) и *P. aeruginosa* ATCC 27853, а также 104 клинических изолята энтеробактерий, включая *E. coli* (n = 22) и *K. pneumoniae* (n = 82), и 98 клинических изолятов неферментирующих грамотрицательных бактерий, в том числе *P. aeruginosa* (n = 43) и *A. baumannii* (n = 55), выделенных от больных с различной гинекологической и хирургической патологией. Бактерицидную активность СП ZP2 (конечная концентрация 10 мкг/мл) на микроорганизмы оценивали по разнице оптической плотности (OD) опытной и контрольной бульонных культур после 20 мин контакта взвесей бактерий (5×10^8 КОЕ/мл) с пептидом ZP2 (в контроле – с дистиллированной водой), добавления мясopептонного бульона и инкубации при 37 °C в течение 4 часов. Действие СП ZP2 выражали Индексом бактерицидной активности (ИБА, %).

В экспериментах *in vitro* установлено, что СП ZP2 оказывал выраженное бактерицидное действие как на эталонные штаммы *E. coli* и *P. aeruginosa*, так и большинство (95,5–98,2%) изученных клинических изолятов грамотрицательных бактерий вне зависимости от их видовой принадлежности. С учетом средних значений ИБА анализируемые виды бактерий можно ранжировать в порядке повышения их чувствительности к синтетическому пептиду ZP2 в следующий ряд: *P. aeruginosa* (74,0±2,3%) – *E. coli* (77,6±3,5%) – *K. pneumoniae* (82,8±1,6%) – *A. baumannii* (84,3±1,7%). Кроме того, выявлена существенная внутривидовая вариабельность клинических штаммов грамотрицательных бактерий по их чувствительности к бактерицидному действию СП ZP2.

Синтетический пептид ZP2 способен не только ингибировать рост грамотрицательных бактерий, но и оказывать на них бактерицидное действие, что делает его перспективным кандидатом для разработки на его основе новых эффективных лекарственных препаратов с комбинированными иммунобиологическими свойствами для борьбы с инфекционно-воспалительными заболеваниями,

Адрес для переписки:

Гриценко Виктор Александрович
ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11.
Тел.: 8 (919) 868-12-59.
E-mail: vag59@mail.ru

Address for correspondence:

Kuzmicheva Natalia A.
Orenburg State Medical University
460000, Russian Federation, Orenburg, Park ave., 7.
Phone: 7 (987) 847-52-55.
E-mail: natalie-vip@list.ru

Образец цитирования:

В.А. Гриценко, Я.В. Тяпаева, М.А. Добрынина, А.В. Зурочка «Сравнительный анализ бактерицидных свойств синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 в отношении грамотрицательных бактерий разной таксономической принадлежности» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 221–228. doi: 10.46235/1028-7221-1016-CAO
© Гриценко В.А. и соавт., 2021

For citation:

V.A. Gritsenko, Ya.V. Tyapaeva, M.A. Dobrynina, A.V. Zurochka “Comparative analysis of bactericidal properties of synthetic peptides from the active center of GM-CSF – ZP2 against different Gram-negative bacteria”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 221–228.
doi: 10.46235/1028-7221-1016-CAO
DOI: 10.46235/1028-7221-1016-CAO

этиологическими агентами которых являются указанные микроорганизмы, нередко проявляющие резистентность широкому кругу антимикробных препаратов, используемых в клинической практике.

Ключевые слова: синтетический пептид GM-CSF – ZP2, бактерицидная активность, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*

COMPARATIVE ANALYSIS OF BACTERICIDAL PROPERTIES OF SYNTHETIC PEPTIDES FROM THE ACTIVE CENTER OF GM-CSF – ZP2 AGAINST DIFFERENT GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Gritsenko V.A.^a, Tyaraeva Ya.V.^a, Dobrynina M.A.^b, Zurochka A.V.^b

^a Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Abstract. Objective of this study was to carry out comparative analysis of bactericidal activity of synthetic peptide ZP2 (SP ZP2) against museum strains and clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Materials and methods. We used museum strains of *E. coli* (ATCC 25922) and *P. aeruginosa* ATCC 27853, as well as 104 clinical isolates of Enterobacteriaceae, including *E. coli* (n = 22) and *K. pneumoniae* (n = 82), and 98 clinical isolates of non-fermenting Gram-negative bacteria, including *P. aeruginosa* (n = 43) and *A. baumannii* (n = 55), isolated from patients with various gynecological and surgical infections. Bactericidal activity of SP ZP2 (final concentration 10 µg/ml) against the microorganisms was assessed by difference in optical density (OD) for experimental and control broth cultures after 20 min of contact of bacterial suspensions (5×10^8 CFU/ml) with SP ZP2 (in control – with distilled water), adding meat-peptone broth and 4-hour incubation at 37 °C. The effect of SP ZP2 was expressed by the Bactericidal Activity Index (BAI, %). Results. Using the *in vitro* assays, we have found that SP ZP2 had a pronounced bactericidal effect on both the reference strains of *E. coli* and *P. aeruginosa*, and majority (95.5-98.2%) of the studied clinical isolates of Gram-negative bacteria, regardless of their species. With regard of the average BAI values, the tested bacterial species may be ranked by increasing their sensitivity to the synthetic ZP2 peptide as follows: *P. aeruginosa* (74.0±2.3%) – *E. coli* (77.6±3.5%) – *K. pneumoniae* (82.8±1.6%) – *A. baumannii* (84.3±1.7%). In addition, significant intraspecific variability of clinical isolates of Gram-negative bacteria was revealed for their sensitivity to bactericidal effect of SP ZP2. Conclusion. The synthetic ZP2 peptide is able to inhibit growth of Gram-negative bacteria, as well as exerts a bactericidal effect, thus considering it as a promising candidate for development of new effective drugs with combined immunobiological properties for combatting infectious and inflammatory conditions caused by the indicated microorganisms which show common resistance to a wide range of antimicrobial drugs used in clinical practice.

Keywords: synthetic peptide, GM-CSF – ZP2, bactericidal activity, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*

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

Введение

Санация внутренних органов и тканей макроорганизма, инфицированных патогенными и потенциально патогенными бактериями, обеспечивается различными механизмами и факторами антибактериального иммунитета. При инфекционной патологии в элиминацию возбудителей из очага воспаления вовлекаются как естественные (физиологические) процессы (отток мочи, желчи и других биосекретов, слушивание и выведение

эпителиальных клеток с адгезированными на них бактериями и др.), так и реакции макроорганизма, сопряженные с участием гуморальных и клеточных эффекторов врожденного и адаптивного иммунитета (система комплемента, лизоцим, иммуноглобулины, тромбо- и лейкоцеденины, полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги и др.) [1, 3, 16]. Кроме того, при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний для эрадикации патогенов используется обширный арсенал противомикробных средств – антибиотиков и химиотерапевтических препаратов с бактерицидным и бактериостатическим действием. Однако применение последних не всегда гарантирует ожидаемую терапевтическую эффективность из-за нарастающей распространенности и цир-

куляции (особенно активной – в стационарах) микроорганизмов, обладающих высокой устойчивостью к широкому спектру антимикробных средств – поли-антибиотикорезистентностью [2, 10, 18, 21].

Эти обстоятельства заставляют вести интенсивный поиск новых высокоактивных антибактериальных препаратов, одним из перспективных направлений которого служит синтез соединений – аналогов эндогенных пептидов макроорганизма, участвующих в его противомикробной защите [15, 22, 23, 25]. Относительно самостоятельным и современным вектором таких исследований является разработка антибактериальных препаратов на основе некоторых цитокинов, в частности интерлейкина-26 (IL-26), интерферона бета (IFN β) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) [9, 17, 19].

Так, недавно международной группой исследователей обнаружено, что интерлейкин-26 (IL-26), преимущественно продуцируемый особым типом Т-хелперных клонов лимфоцитов (Th17), представляющий собой катионный амфипатический белок, может вызывать гибель и подавлять рост *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), некоторых штаммов *Escherichia coli* (O1: K1: H7, O18: K1: H7, O111: B4, O111: K58: H2) и *Klebsiella pneumoniae* (O1: K2), но не *Enterococcus faecalis* и *Candida albicans*, причем эффективная его концентрация в отношении *E. coli* была в 2,5 раза выше, чем в опытах с золотистым стафилококком [19]. В 2017 г. еще одним коллективом исследователей представлены убедительные доказательства наличия у IFN β антимикробной (причем не только противовирусной, но и антибактериальной) активности [2017]. Авторами экспериментально показано, что человеческий и мышинный IFN β способен ингибировать рост и непосредственно убивать стафилококки (*S. aureus* и *S. epidermidis*), но не *E. coli*. В ряде наших работ экспериментально показано, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 проявляет антибактериальное действие, ингибируя рост стафилококков, энтеробактерий и псевдомонад [4, 5, 6, 7].

Вместе с тем остается открытым вопрос о бактерицидной активности синтетического пептида ZP2 (СП ZP2) в отношении микроорганизмов, в частности грамотрицательных бактерий разной видовой принадлежности.

Острота этого вопроса, с одной стороны, связана с тем, что данные микроорганизмы, а именно – энтеробактерии (клебсиеллы, эшерихии и др.), псевдомонады и ацинетобактеры, являются приоритетными возбудителями многих неспецифических инфекционно-воспалительных забо-

леваний эндогенной природы, в том числе нозокомиальных инфекций и послеоперационных осложнений при хирургических вмешательствах у больных с гинекологической и гнойно-воспалительной патологией [3], с другой стороны, обусловлена высокой резистентностью (естественной или приобретенной) указанных патогенов к используемым в клинической практике антимикробным препаратам (даже к резервным карбапенемам) [2, 10, 18, 21], что заставило Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ) отнести их в разряд «критических» инфекционных агентов, против которых необходима срочная разработка новых эффективных лекарственных средств [23].

Цель исследования – провести сравнительный анализ бактерицидной активности синтетического пептида ZP2 в отношении музейных штаммов и клинических изолятов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*.

Материалы и методы

В работе были использованы музейные штаммы *E. coli* (ATCC 25922) и *P. aeruginosa* ATCC 27853, а также 104 клинических изолята энтеробактерий, включая *E. coli* (n = 22) и *K. pneumoniae* (n = 82), и 98 клинических изолятов неферментирующих грамотрицательных бактерий, в том числе *P. aeruginosa* (n = 43) и *A. baumannii* (n = 55), выделенных от больных с различной гинекологической и хирургической патологией. Выделение и видовую идентификацию бактерий проводили общепринятыми методами с использованием официальных биохимических наборов компании «Erba Lachema s.r.o.» (ЕС, Чехия) и на микробиологическом анализаторе VITEK 2 Compact (Biomerieux, Франция) [12].

Бактерицидное действие синтетического пептида ZP2 (СП ZP2) в отношении изучаемых штаммов бактерий осуществляли по методике [1] в следующем порядке: на изотоническом растворе NaCl готовили взвеси суточных агаровых культур бактерий (5×10^8 КОЕ/мл); по 25 мкл взвесей инокулировали в ячейки пластикового 96-луночного стерильного планшета; в опыте – к взвесям добавляли по 25 мкл раствора СП ZP2 на дистиллированной воде (концентрация 20 мкг/мл; т.е. его конечная/действующая концентрация составляла 10 мкг/мл), в контроле – вместо раствора СП ZP2 вносили 25 мкл дистиллированной воды; смеси выдерживали в течение 20 мин при 37 °С, а затем во все ячейки добавляли 200 мкл мясопептонного бульона; планшета помещалась на 4 часа в термостат при 37 °С, после чего с помощью фотометра Multiscan Accent («Thermo Electron», Финляндия) на длине волны $\lambda = 492$ нм замерялась оптическая плотность (OD) бактери-

ТАБЛИЦА 1. ПАРАМЕТРЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МУЗЕЙНЫХ И КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ РАЗНОЙ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ К БАКТЕРИЦИДНОМУ ДЕЙСТВИЮ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ZP2 (КОНЦЕНТРАЦИЯ – 10 мкг/мл)

TABLE 1. SENSITIVITY PARAMETERS OF MUSEUM AND CLINICAL STRAINS OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA OF DIFFERENT SPECIES TO THE BACTERICIDAL EFFECT OF SYNTHETIC PEPTIDE ZP2 (CONCENTRATION – 10 µg/ml)

Изученные штаммы бактерий Studied strains of bacteria	Штаммы, чувствительные к синтетическому пептиду ZP2 Strains sensitive to synthetic peptide ZP2			Штаммы, резистентные к синтетическому пептиду ZP2 Strains resistant to synthetic peptide ZP2		
	Доля штаммов, чувствительных к пептиду ZP2 (%) Proportion of strains sensitive to the ZP2 peptide (%)	Диапазон ИБА (min-max, %) IBA range (min-max, %)	Среднее значение ИБА (%) Average IBA (%)	Доля штаммов, индифферентных к пептиду ZP2 (%) Proportion of strains indifferent to the ZP2 peptide (%)	Доля штаммов со стимуляцией (%) Proportion of stimulated strains (%)	Среднее значение ИС (%) Average IS (%)
Тест-штамм <i>E. coli</i> (ATCC 25922) Test strain <i>E. coli</i> (ATCC 25922)		63,4-69,7	65,7±2,0			
Тест-штамм <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) Test strain <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)		53,8-61,0	56,4±2,3			
Клинические штаммы <i>E. coli</i> Clinical strains <i>E. coli</i> (n = 22)	95,5±4,5	45,8-98,9	77,6±3,5	-	4,5±4,5	55,1±2,9
Клинические штаммы <i>K. pneumoniae</i> Clinical strains <i>K. pneumoniae</i> (n = 82)	97,6±1,7	42,1-99,8	82,8±1,6	1,2±1,2	1,2±1,2	47,8±2,3
Клинические штаммы <i>P. aeruginosa</i> Clinical strains <i>P. aeruginosa</i> (n = 43)	97,7±2,3	24,4-93,4	74,0±2,3 ^{1,2}	2,3±2,3	-	-
Клинические штаммы <i>A. baumannii</i> Clinical strains <i>A. baumannii</i> (n = 55)	98,2±1,8	44,8-98,8	84,3±1,7	1,8±1,8	-	-

Примечание. Достоверные отличия показателей (p < 0,05) в сравнении: 1 – с *K. pneumoniae*; 2 – с *A. baumannii*.

Note. Significant differences in indicators (p < 0.05) in comparison: 1, with *K. pneumoniae*; 2, with *A. baumannii*.

альных культур в ячейках. Каждый вариант опыта и контроля делался в трех повторностях с вычислением средних значений OD.

Для оценки действия СП ZP2 на исследуемые бактерии высчитывали Индекс бактерицидной активности (ИБА, %) по формуле:

$$\text{ИБА} = (\text{OD}_k - \text{OD}_o) / \text{OD}_k \times 100\%,$$

где OD_k и OD_o – оптические плотности контрольной и опытной культур соответственно. Чувствительными считались штаммы при ИБА > 10%.

Если оптическая плотность опытной культуры превышала оптическую плотность контрольной культуры ($\text{OD}_o > \text{OD}_k$), то рассчитывался Индекс стимуляции (ИС, %) по формуле:

$$\text{ИС} = \text{OD}_o / \text{OD}_k \times 100\%,$$

где OD_k и OD_o – оптические плотности контрольной и опытной культур соответственно. Стимулирующий эффект СП ZP2 регистрировали при ИС > 10%.

Если значения ИБА и ИС не превышали 10%, то штаммы бактерий относили к группе устойчивых культур, но индифферентно реагирующих на пептид ZP2.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Вычисляли среднюю арифметическую и ее ошибку ($M \pm m$) с применением пакета прикладных программ Microsoft Excel 2007 и Statistica for Windows 10.0; межгрупповые отличия считали достоверными при $p < 0,05$ [11].

Результаты и обсуждение

В экспериментах *in vitro* установлено, что синтетический пептид ZP2 (СП ZP2) в конечной концентрации 10 мкг/мл проявляет выраженное бактерицидное действие в отношении грамотрицательных бактерий разной таксономической принадлежности (табл. 1).

На это, в первую очередь, указывали показатели чувствительности к СП ZP2 эталонных штаммов *E. coli* (АТСС 25922) и *P. aeruginosa* (АТСС 27853), средние значения ИБА которых составили $65,7 \pm 2,0$ и $56,4 \pm 2,3\%$ соответственно. Кроме того, СП ZP2 оказывал бактерицидное действие на значительную долю (95,5-98,2%) изученных клинических изолятов бактерий вне зависимости от их видовой принадлежности.

Вместе с тем следует отметить, что клинические штаммы микроорганизмов характеризовались внутривидовым разнообразием по своей чувствительности к бактерицидному действию СП ZP2, о чем свидетельствовали широкие диапазоны варьирования Индексов бактерицидной активности (ИБА, %) СП ZP2 во всех выборках изученных изолятов бактерий.

Так, значения ИБА клинических штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* колебались в диапазонах 45,8-98,9 и 42,1-99,8% соответственно, а клинических изолятов *P. aeruginosa* и *A. baumannii* – 24,4-93,4 и 44,8-98,8% соответственно.

Вместе с тем, при проведении сравнительного анализа средних значений ИБА клинических штаммов грамотрицательных бактерий разной видовой принадлежности установлено, что более высокую чувствительность к бактерицидному действию СП ZP2 проявляли изоляты *K. pneumoniae* и *A. baumannii* (ИБА – $82,8 \pm 1,6$ и $84,3 \pm 1,7\%$ соответственно), а менее высокую – штаммы *E. coli* и *P. aeruginosa* (ИБА – $77,6 \pm 3,5$ и $74,0 \pm 2,3\%$ соответственно), хотя достоверные межгрупповые отличия по этому показателю регистрировались только в выборке псевдомонад при их сравнении с клебсиеллами и ацинетобактерами.

Таким образом, по средним значениям ИБА СП ZP2 изученные грамотрицательные бактерии можно ранжировать в порядке повышения их чувствительности к данному пептиду в следующий ряд: *P. aeruginosa* – *E. coli* – *K. pneumoniae* – *A. baumannii*.

Помимо этого, следует подчеркнуть, что среди изученных клинических изолятов энтеробактерий, псевдомонад и ацинетобактеров имелась очень незначительная доля (1,8-4,5%) штаммов, отличающихся резистентностью к бактерицидному действию СП ZP2, а стимуляция бактериального роста после контакта с СП ZP2 наблюдалась только у энтеробактерий – по 1 штамму среди клебсиелл и эшерихий, уровень которой составил $47,8 \pm 2,3$ и $55,1 \pm 2,9\%$ от контроля. Выявленный феномен стимуляции роста бактерий при действии СП ZP2 требует специального изучения, хотя, вероятно, он встречается не часто.

Заключение и выводы

Представленные экспериментальные данные по сравнительному анализу бактерицидного действия синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на грамотрицательные микроорганизмы разной видовой принадлежности интересны как в теоретическом, так и практическом отношении.

Во-первых, они подтверждают тезис о наличии у цитокинов (возможно, не у всех) бивалентной иммунобиологической активности, сочетающей в себе иммуномодулирующую (регуляторную) и антимикробную направленность. Вполне возможно, что в ближайшее время к ГМ-КСФ, IL-26, IFN β и некоторым хемокинам (киноцидинам) присоединятся и другие цитокины с функциональной бивалентностью и, в первую очередь, те из них, в молекулярной структуре ко-

торых имеются α -спиральные пептидные участки с катионными и амфипатическими свойствами. Причем антимикробные эффекты таких цитокинов могут быть обусловлены не только (или не столько) цельной молекулой иммуномедиатора, но и отдельными ее пептидными компонентами, образующимися при ферментативной деградации цитокина, как, например, это происходит при расщеплении под действием сериновых протеаз кателицидина с выделением антимикробного пептида из 37 аминокислотных остатков (LL-37) [17]. По крайней мере, о таком сценарии говорят данные по изучению антибактериальной активности $IFN\beta$, которую связывают с отдельными частями его молекулярной структуры (особенно пептидной спиралью 4), которые характеризовались катионными и амфипатическими свойствами, аналогичными α -спиральным известным катионным антимикробным пептидам, поскольку *de novo* синтезированный пептид указанной спирали 4 обладал антибактериальным эффектом, тождественным действию такого антимикробного пептида, как LL-37 [17]. Авторы относят $IFN\beta$ (на наш взгляд, в значительной степени условно) к семейству α - и β -киноцидинов, многие из которых, действительно являясь хемокинами (СХС- и СС-типов) с присущей им иммуностимулирующей активностью, формируют большую группу тромбоцитарных белков, параллельно выполняющих микробицидную функцию [14, 20, 25].

Словом, некоторые (или многие) цитокины, кроме своей регуляторной (иммуномодулирующей) функции, способны оказывать прямое антибактериальное действие на различные патогены в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Во-вторых, эти результаты демонстрируют возможность использования синтетического пептида ZP в качестве основы для создания новых высокоэффективных антимикробных лекарственных средств, в которых так нуждается клиническая медицина, ежедневно сталкивающаяся с проблемой устойчивости возбудителей к применяемым препаратам. Важно отметить, что синтетический пептид ZP способен не только ингибировать рост грамотрицательных бактерий [5, 6], но и оказывать на них прямое бактерицидное действие.

Учитывая, что синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора — ZP2, кроме антибактериальной активности, обладает иммуномодулирующими и репарационными эффектами, созданное на его основе косметическое средство «АЦЕГРАМ» [8] может быть рекомендовано для местного лечения гнойно-некротических процессов (например при синдроме диабетической стопы), а также для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений в хирургии и гинекологии, нередко инициируемых энтеробактериями, псевдомонадами и ацинетобактериями.

Список литературы / References

1. Бухарин О.В., Брудастов Ю.А., Гриценко В.А., Дерябин Д.Г. Роль способности бактерий к инактивации факторов естественной противоинойфекционной резистентности в их устойчивости к бактерицидному действию крови (сыворотки крови) // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1996. № 2. С. 174-176. [Bukharin O.V., Brudastov Yu.A., Gritsenko V.A., Deryabin D.G. The role of the ability of bacteria to inactivate factors of natural anti-infectious resistance in their resistance to the bactericidal action of blood (blood serum). *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1996, no. 2, pp. 174-176. (In Russ.)]
2. Горбич Ю.Л., Карпов И.А. Значение адекватной эмпирической терапии при нозокомиальных инфекциях, вызванных *Acinetobacter baumannii* // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2012. Т. 14, № 1. С. 67-73. [Gorbich Yu.L., Karpov I.A. The importance of adequate empiric therapy for nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, Vol. 14, no. 1, pp. 67-73. (In Russ.)]
3. Гриценко В.А., Иванов Ю.Б. Роль персистентных свойств в патогенезе эндогенных инфекций // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2009. № 4. С. 66-71. [Gritsenko V.A., Ivanov Yu.B. The role of persistent properties in the pathogenesis of endogenous infections. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2009. n. 4, pp. 66-71. (In Russ.)]
4. Добрынина М.А., Зурочка В.А., Зурочка А.В., Гриценко В.А. Сравнительный анализ влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора — ZP2 на рост музейных культур бактерий родов *Staphylococcus* и *Escherichia in vitro* // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2015. № 2, С. 1-10. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-2/Articles/DMV-2015-2.pdf>. [Dobrynina M.A., Zurochka V.A., Zurochka A.V., Gritsenko V.A. Comparative analysis of the effect of a synthetic peptide of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor — ZP2 on the growth of museum cultures of bacteria of the genera *Staphylococcus* and *Escherichia in vitro*. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2015, no. 2, pp. 1-10. [Electronic

resource] (In Russ.)). Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-2/Articles/DMV-2015-2.pdf>.

5. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П., Гриценко В.А. Оценка влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора – ZP2 на рост и биопленкообразование клинических изолятов энтеробактерий *in vitro* // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2018. № 4. С. 1-17. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-4/Articles/MAD-2018-4.pdf>. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Tyapaeva Ya.V., Belozertseva Yu.P., Gritsenko V.A. Evaluation of the effect of a synthetic peptide of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – ZP2 on the growth and biofilm formation of clinical isolates of enterobacteria *in vitro*. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2018, no. 4, pp. 1-17. [Electronic resource] (In Russ.)] Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-4/Articles/MAD-2018-4.pdf>.

6. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П., Мругова Т.М., Гриценко В.А. Антибактериальная активность косметического средства «Ацеграм» в отношении грамотрицательных бактерий // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2017. № 4. С. 1-13. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-4/Articles/VAG-2017-4.pdf>. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Tyapaeva Ya.V., Belozertseva Yu.P., Mrugova T.M., Gri-tsenko V.A. Antibacterial activity of the “Acegram” cosmetic product against gram-negative bacteria. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2017, no. 4, pp. 1-13. [Electronic resource] (In Russ.)] Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-4/Articles/VAG-2017-4.pdf>.

7. Зурочка А.В., Гриценко В.А., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б. Влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на кинетику развития популяций грамположительных кокков и энтеробактерий в культуре // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 2-2. С. 30-35. [Zurochka A.V., Gritsenko V.A., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B. The effect of the synthetic peptide of the active center of GM-CSF – ZP2 on the kinetics of the development of populations of gram-positive cocci and enterobacteria in culture. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 2-2, pp. 30-35. (In Russ.)]

8. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Дукардт В.В., Гриценко В.А. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) как основа для создания косметических средств нового поколения с комбинированными эффектами – АЦЕГРАМ-ГЕЛЬ и АЦЕГРАМ-СПРЕЙ // Российский иммунологический журнал, 2016. Т. 10 (19), № 3. С. 269-272. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Zueva E.B., Dobrynina M.A., Dukardt V.V., Gritsenko V.A. Synthetic peptide of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) as a basis for the creation of new generation cosmetics with combined effects – ACEGRAM-GEL and ACEGRAM-SPRAY. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2016, Vol. 10 (19), no. 3, pp. 269-272. (In Russ.)]

9. 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. [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., 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 of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2016, Vol. 2, 30 p. [Electronic resource] (In Russ.)] Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>.

10. Иванов Д.В., Крапивина И.В., Галева Е.В. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, этиология, антибактериальная терапия и профилактика // Антибиотики и химиотерапия, 2005. Т. 50, № 12. С. 19-28. [Ivanov D.V., Krapivina I.V., Galeva E.V. Nosocomial infections: epidemiology, pathogenesis, etiology, antibiotic therapy and prevention. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2005, Vol. 50, no. 12, pp. 19-28. (In Russ.)]

11. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с. [Lakin G.F. Biometrics]. Moscow: Vysshaya shkola, 1990. 352 p.

12. МР 02.032-08. Идентификация микроорганизмов и определение их чувствительности к антибиотикам с применением автоматического микробиологического анализатора VITEK 2 Compact. Методические рекомендации. М., 2008. [MR 02.032-08. Identification of microorganisms and determination of their sensitivity to antibiotics using an automatic microbiological analyzer VITEK 2 Compact. Guidelines. Moscow, 2008.]

13. Мругова Т.М., Качалова И.В. Особенности таксономической структуры и резистентности к антибиотикам микрофлоры, изолированной от больных в многопрофильном хирургическом стационаре // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2016. № 2. 12 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/MTM-2016-2.pdf>. [Mrugova T.M., Kachalova I.V. Features of the taxonomic structure and antibiotic resistance of microflora isolated from patients in a

multidisciplinary surgical hospital. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2016, no. 2, 12 p. [Electronic resource] (In Russ.)] Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/MTM-2016-2.pdf>

14. Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якуцени П.П. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. Часть 2. Тромбоциты как участники иммунных реакций // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 9-20. [Serebryanaya N.B., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Yakutseni P.P. Platelets as activators and regulators of inflammatory and immune responses. Part 2. Platelets as participants in immune reactions. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 9-20. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-9-20.

15. Brogden K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, no. 3. pp. 238-250.

16. Finlay B.B., Hancock R.E.W. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, no. 2, pp. 497-504.

17. Kaplan A., Lee M.W., Wolf A.J., Limon J., Becker C.A., Ding M., Murali R., Lee E.Y., Liu G.Y., Wong G.C.L., Underhill D.M. Direct Antimicrobial Activity of IFN- β . *J. Immunol.*, 2017, no. 198., pp. 4036-4045.

18. Leopold S.J., van Leth F., Tarekegn H., Schults C. Antimicrobial drug resistance among clinically relevant bacterial isolates in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014, Vol. 69, no. 9, pp. 2337-2353.

19. Meller S., Domizio J.D., Voo K.S. Th17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat. Immunol.*, 2015, Vol. 16, no. 9. pp. 970-979.

20. Schmidt N.W., Mishra A., Lai G.H., Davis M., Sanders L.K., Tran D., Garcia A., Tai K.P., McCray Jr. P.B., Ouellette A.J., Selsted M.E., Wong G.C.L. Criterion for amino acid composition of defensins and antimicrobial peptides based on geometry of membrane destabilization. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, Vol. 133, pp. 6720-6727.

21. Spellberg B., Guidos R., Gilbert D. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, Vol. 46, pp. 155-164.

22. Vasilchenko A.S., Vasilchenko A.V., Pashkova T.M., Smirnova M.P., Kolodkin N.I., Manukhov I.V., Zavilgelsky G.B., Sizova E.A., Kartashova O.L., Simbirtsev A.S., Rogozhin E.A., Duskaev G.K., Sycheva M.V. Antimicrobial activity of the indolicidinderived novel synthetic peptide In-58. *J. Pept. Sci.*, 2017, Vol. 23, pp. 855-863.

23. Walsh C. Where will new antibiotics come from? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2003, Vol. 1, no. 1. pp. 65-70.

24. WHO: First ever list of antibiotic-resistant "priority pathogens". GENEVA, 2017. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed>.

25. Yount N.Y., Yeaman M.R. Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2012, Vol. 52, pp. 337-360.

Авторы:

Гриценко В.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Тяпаева Я.В. — заочный аспирант ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

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

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

Authors:

Gritsenko V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Tyapaeva Ya.V., Postgraduate Student, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Dobrynina M.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Zurochka A.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Поступила 20.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 20.05.2021
Accepted 17.06.2021

ИНДУЦИРОВАНИЕ РЕГЕНЕРАТОРНО-ОСТЕОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК PDLSC *IN VITRO*

Суховой Ю.Г.^{1,3}, Костоломова Е.Г.^{1,2}, Унгер И.Г.¹, Акунеева Т.В.¹

¹ ООО «Тюменский филиал института фундаментальной и клинической иммунологии», г. Тюмень, Россия

² ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

³ ФГБУН ФИЦ «Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Тюмень, Россия

Резюме. Восстановление поврежденных тканей при заболеваниях пародонта – проблема не только медицинская, но и социальная. Заболевания пародонта зачастую влекут за собой потерю большого количества зубов (более чем при любом другом заболевании зубочелюстной системы), как следствие – нарушение акта жевания и речи, негативное влияние на общее состояние организма и в итоге снижение качества жизни человека. Цель исследования: изучить регенераторную активность лиофилизированного экстракта куриного эмбриона различной концентрации в составе гиалуроновой кислоты в отношении культуры клеток PDLSC в эксперименте *in vitro*. Группы сравнения: раствор 1%-ной немодифицированной гиалуроновой кислоты, содержащий лиофилизированный экстракт куриного эмбриона в трех концентрациях: 300 мкг/мл, 150 мкг/мл, 75 мкг/мл. В качестве контроля – раствор 1%-ной немодифицированной гиалуроновой кислоты. Гиалуроновая кислота – это натуральное вещество, которое является важным компонентом внеклеточного матрикса как минерализованной и не минерализованной ткани. Ее использование привлекает внимание специалистов в качестве объекта, способного приобретать новые свойства при ее различной модификации. В наших лабораторных исследованиях использовались стволовые клетки культуры пародонта человека. Стволовые клетки периодонтита (периодонтальной связки PDLSC) были обнаружены в 2004 году. Посредством импедиметрии были исследованы адгезия клеток и проникновение в ткани. Анализ по оценке жизнеспособности клеток проводился с использованием раствора, содержащего водорастворимую соль тетразолия. Дифференцирование остеогенного направления без индукции измеряли через три недели после разведения стволовых клеток в традиционной культуральной среде. Окрашивание проводили по методу Косса. Для оценки минерализации клетки окрашивали ализарином красным с последующей оценкой отложения в них кальция. Установлено, что полученная в процессе эксперимента клеточная популяция PDLSC была гетерогенна и проявляла здоровую морфологию фибробластов во всех трех исследуемых группах. Лيوфилизированный экстракт куриного эмбриона в составе препарата на основе гиалуроновой кислоты не оказывает существенного влияния на выживаемость и пролиферацию клеток PDLSC, однако в высоких концентрациях (150 мкг/мл и 300 мкг/мл) индуцирует остеогенную активность клеток, повышает минерализацию, не вызывая отложение кальция, что свидетельствует

Адрес для переписки:

Костоломова Елена Геннадьевна
ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
625027, Россия, г. Тюмень, ул. Котовского, 5/2.
Тел.: 8 (904) 493-06-74.
E-mail: lenakost@mail.ru

Address for correspondence:

Kostolomova Elena G.
Tyumen State Medical University
625027, Russian Federation, Tyumen, Kotovsky str., 5/2.
Phone: 7 (904) 493-06-74.
E-mail: lenakost@mail.ru

Образец цитирования:

Ю.Г. Суховой, Е.Г. Костоломова, И.Г. Унгер, Т.В. Акунеева «Индукция регенераторно-остеогенной активности клеток PDLSC *in vitro*» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 229-236. doi: 10.46235/1028-7221-1017-IVI
© Суховой Ю.Г. и соавт., 2021

For citation:

Yu.G. Sukhovey, E.G. Kostolomova, I.G. Unger, T.V. Akuneeva "In vitro induction of regenerative and osteogenic activity of PDLSC cells", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 229-236. doi: 10.46235/1028-7221-1017-IVI
DOI: 10.46235/1028-7221-1017-IVI

о регенераторной активности. Остеогенная трансдифференцировка — это привлекательный способ создания клеток остеогенного клеточного происхождения. Результаты нашего исследования показывают, что они могут быть использованы при моделировании заболеваний костей.

Ключевые слова: клеточные культуры, заболевания пародонта, гиалуроновая кислота, воспаление, регенерация

IN VITRO INDUCTION OF REGENERATIVE AND OSTEOGENIC ACTIVITY OF PDLSC CELLS

Sukhovey Yu.G.^{a, c}, Kostolomova E.G.^{a, b}, Unger I.G.^a, Akuneeva T.V.^a

^a Tyumen Affiliation, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Tyumen, Russian Federation

^b Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

^c Tyumen Research Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation

Abstract. The restoration of damaged tissues in periodontal diseases is not only a medical problem, but also a social one. Periodontal diseases often entail the loss of a large number of teeth (more than with any other disease of the dentition), as a result, a violation of the act of chewing and speech, a negative effect on the general condition of the body and, as a result, a decrease in the quality of human life. Purpose of the study: to study the regenerative activity of a lyophilized extract of a chicken embryo of various concentrations in the composition of hyaluronic acid in relation to the culture of PDLSC cells in an in vitro experiment. Comparison groups: A solution of 1% unmodified hyaluronic acid containing lyophilized chicken embryo extract in three concentrations: 300 µg/ml, 150 µg/ml, 75 µg/ml. As a control, 1% solution of unmodified hyaluronic acid. Hyaluronic acid is a natural substance that is an important component of the extracellular matrix as a mineralized and non-mineralized tissue. Its use attracts the attention of specialists as an object capable of acquiring new properties with its various modifications. In our laboratory studies, stem cells from a culture of human periodontal disease were used. Periodontitis stem cells (PDLSC periodontal ligament) were discovered in 2004. Cell adhesion and tissue penetration were investigated by impedimetry. Analysis to assess cell viability was carried out using a solution containing a water-soluble tetrazolium salt. Differentiation of osteogenic direction without induction was measured three weeks after dilution of stem cells in traditional culture medium. Staining was carried out according to the Koss method. To assess mineralization, cells were stained with alizarin red, followed by assessment of calcium deposition in them. It was found that the resulting PDLSC cell population during the experiment was heterogeneous and showed healthy fibroblast morphology in all three study groups. Lyophilized extract of chicken embryo as part of a preparation based on hyaluronic acid does not significantly affect the survival and proliferation of PDLSC cells, however, at high concentrations (150 µg/ml and 300 µg/ml) it induces osteogenic activity of cells, increases mineralization without causing calcium deposition, which indicates regenerative activity. Osteogenic transdifferentiation is an attractive way to create cells of osteogenic cellular origin. The results of our study show that they can be used to model bone diseases.

Keywords: cell cultures, periodontal disease, hyaluronic acid, inflammation, regeneration

Введение

Заболевания пародонта — проблема не только медицинская, но и социальная. В последние годы отмечается значительное увеличение распространенности хронических воспалительных заболеваний пародонта как в развитых, так и в развивающихся странах (затрагивают около 20-

50% населения мира). Высокая распространенность заболеваний пародонта не только среди пожилых людей, но и среди более молодых и даже подростков, делает их проблемой общественного здравоохранения. Хронические воспалительные заболевания пародонта, и его запущенная форма характеризуется прогрессирующей деструкцией

тканей, потерей пародонтальной связки и разрушением окружающей альвеолярной кости [5, 9]. Это основная причина потери зубов и считается одной из самых серьезных угроз здоровью полости рта [4]. Согласно современным представлениям, в основе большинства заболеваний пародонта лежит воспаление – в начале процесса – острое в виде кратковременной реакции, а по мере включения в патогенез иммунных реакций и генерализации этого процесса – переход в хроническую фазу. Постоянное хроническое воспаление зачастую приводит к костной деструкции [2]. Восстановление костных дефектов, снижение интенсивности воспаления, сокращение сроков лечения – самые важные терапевтические цели в стоматологии. Существуют различные способы лечения и «восстановительные» методики, но бывают случаи, когда эффективная терапия не помогает. Основной причиной неэффективности проводимой терапии является низкая способность пораженных тканей к регенерации. Повысив регенераторно-пролиферативную активность тканей, можно улучшить репарацию поврежденных тканей, в том числе и костной. Известно, что выраженным регенерирующим действием обладает клеточная масса эмбрионов птиц [1]. На основе этого изобретения получен лиофилизированный экстракт куриного эмбриона, эффективность которого изучали в эксперименте *in vitro*. Поскольку гиалуроновая кислота – это натуральное вещество, которое является важным компонентом внеклеточного матрикса как минерализованной, так и не минерализованной ткани, она обладает положительным эффектом (помогает снизить разрушение ткани) в регенеративной медицине [3], в эксперименте *in vitro* лиофилизированный экстракт куриного эмбриона растворяли в немодифицированной гиалуроновой кислоте.

Цель исследования – изучить регенераторную активность лиофилизированного экстракта куриного эмбриона различной концентрации в составе гиалуроновой кислоты в отношении культуры клеток PDLSC в эксперименте *in vitro*.

Материалы и методы

Дизайн эксперимента

1. Контрольная группа. Раствор 1%-ной немодифицированной гиалуроновой кислоты.
2. Вторая группа. Раствор 1%-ной немодифицированной гиалуроновой кислоты, содержа-

щий 300 мкг/мл лиофилизированного экстракта куриного эмбриона.

3. Третья группа. Раствор 1%-ной немодифицированной гиалуроновой кислоты, содержащий 150 мкг/мл лиофилизированного экстракта куриного эмбриона.

4. Четвертая группа. Раствор 1%-ной немодифицированной гиалуроновой кислоты, содержащий 75 мкг/мл лиофилизированного экстракта куриного эмбриона.

В наших лабораторных исследованиях использовали стволовые клетки культуры пародонта человека. Стволовые клетки периодонтита (периодонтальной связки PDLSC) были обнаружены в 2004 году [10]. С 2007 года сотрудники кафедры оральной биологии Университета Земмельвейса регулярно выделяют и разводят культуры, содержащие PDLSC-t [6], которые подходят для лабораторных исследований и тестирования биосовместимости новых материалов в пародонтологии [8]. В качестве основной среды, использованной для исследований *in vitro* и контроля, разведения и питания PDLSC клеток, также применялись: минимальная эссенциальная среда Игла (α -MEM) (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) с добавлением 100 мкМ/мл L-аскорбиновой кислоты 2-фосфата, 2 мкМ/мл глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 15% фетальной телячьей сыворотки (ЭТС) (Invitrogen, Карлсбад, Калифорнии). В исследованиях *in vitro* композицию стволовых клеток и суспензию смешивали в соотношении 1:1, после появления новых стволовых клеток добавляли эссенциальную среду в каждую лунку.

Изоляция клеток

Методология изоляции и культивирование клеток выполнялась по предложенной методике [6]. Клетки были отфильтрованы с использованием фильтра 5 мкм и высажены в пластиковую чашу для культивирования. Клетки инкубировали при 37 °С в стерильных условиях, при 100% влажности, в воздухе, обогащенном CO₂ 5% концентрации с использованием CO₂-инкубатора (Sanyo, Япония). В полной питательной среде Игла (α -MEM). Пассировали культуру клеток 2 раза в неделю в соотношении 1:4. Клетки субкультивировали с помощью 0,25%-ного трипсина и 0,2%-ного раствора ЭТДА (37 °С, 10'), затем добавляли к клеткам в культуральной среде.

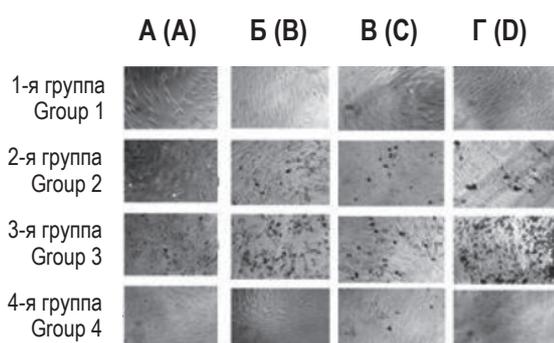


Рисунок 1. Эффект препаратов гиалуроновой кислоты на морфологию культуры клеток PDLSC в первые 7 дней эксперимента

Примечание. Фазово-контрастные микроскопические изображения были сделаны по дням: в первый (А), второй (В), третий (С) и седьмой (D) день после пересадки. Десятикратное увеличение в каждой группе клетки показали здоровую морфологию фибробластов, слияние увеличило плотность клеток. В группах 2 и 3 появился черный осадок, который в действительности является мертвыми клетками, глубоко внутри матрицы гиалуроновой кислоты. Такой осадок не виден в группах препаратов 2 и 4.

Figure 1. Effect of hyaluronic acid products on PDLSC culture morphology on 7 first days of experiment

Note. Phase contrast microscopic images were taken by day: the first (A), second (B), third (C) and seventh (D) days after transplant. Tenfold increase in each group, cells showed healthy fibroblast morphology, fusion increased cell density. In groups 2 and 3, a black sediment appeared, which is actually dead cells, deep within the hyaluronic acid matrix. This precipitate is not seen in drug groups 2 and 4.

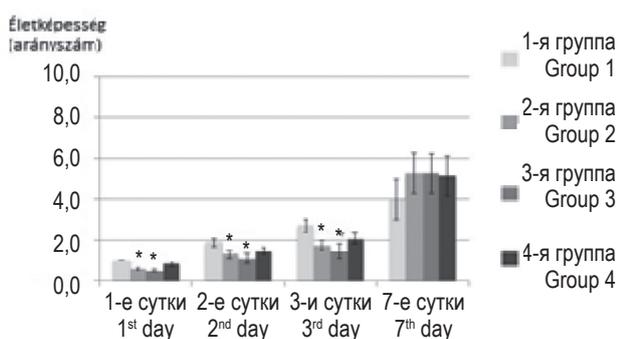


Рисунок 2. Эффект препаратов гиалуроновой кислоты на жизнеспособность клеток PDLSC

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной в тот же день, использовался критерий Даннета, среднее \pm SD (стандартное отклонение). Значение поглощения измеряется с помощью WST-1 реагента пролиферации клеток, пропорционально числу жизнеспособных клеток. Группы 1-2-3 дней, $n = 9$, седьмой день $n = 4$.

Figure 2. Effect of hyaluronic acid preparations on cell viability
Note. *, $p < 0.05$ compared with the control on the same day, Dunnett's test was used, mean \pm SD (standard deviation). The absorbance value is measured using the WST-1 cell proliferation reagent, proportional to the number of viable cells. Groups 1-2-3 days, $n = 9$, 7th day $n = 4$.

Анализ по оценке жизнеспособности клеток проводился с использованием раствора, содержащего водорастворимую соль тетразолия WST (Roche, Венгрия). Анализ проводили этапами через 24, 48 и 72 часов и через 7 дней после культивирования. Метод измерения основан на митохондриальной активности дегидрогеназы. Для измерения использовали 96-луночный планшет. Для 3-дневного анализа использовалось 10^4 клеток/лунке, для 7-дневного анализа применяли количество 5×10^3 клеток/лунке. Через 2 часа после добавления инкубационного раствора WST-1, возможность поглощения образцов измеряли при 450 нм с 655 нм относительной длины волны.

Дифференцирование остеогенного направления без индукции измеряли через 3 недели после разведения стволовых клеток в полной культуральной среде. Клетки поддерживались без пересева 7 дней, 14 дней и 21 день, в то время как замена сред проводилась 2 раза в неделю [7]. Во время окрашивания Косса, клетки обрабатывали раствором нитрата серебра, в результате чего нерастворимые соединения кальция преобразовались в нитрат серебра и хлорид кальция. В результате полученный нитрат серебра под воздействием света вступил в реакцию и окрасился в темно-коричневый цвет. Мы использовали слайд-камеру с 8 лунками, количество клеток 2×10^4 клеток/лунке. Расшифровка результатов при помощи программы ImageJ. Программа анализирует фотографии, сделанные также для количественного анализа средней плотности каждого экспериментального образца.

Красное окрашивание Ализарином применялось для исследования наличия остеогенных узелков на 14-й и 21-й день после пересадки. Красный краситель ализарин (ализарин-сульфонат натрия, $C_{14}H_7O_7SNa$) является кислотным окрашивающим индикатором, в результате действия которого соединения кальция окрасились в оранжевый цвет. Во время исследования использовалась слайд-камера с 12 лунками, количество клеток 2×10^4 . Краткосрочный анализ остеогенной активности щелочной фосфатазы путем измерения, основанного на колориметрическом методе обнаружения фермента. Желтый раствор ALP (Sigma Aldrich), раствор п-нитрофенил фосфата, содержащий субстрат для щелочной фосфатазы, который дает желтое окрашивание при активной ферментной активности. Для анализа

использовали слайд-камеру с 96 лунками, с количеством 10^4 клеток/лунку. Измерения были сделаны при помощи ALP-реагента на 1-й, 2-й и 4-й день после пересадки. Образцы были инкубированы в желтом растворе ALP в течение 20 минут, и поглощение образцов измеряли при 450 нм.

Результаты

В исследованиях *in vitro* композицию стволовых клеток и исследуемый гель смешивали в соотношении 1:1. Изолированные клетки PDLSC через несколько часов делятся в стандартных условиях культивирования. Первичную клеточную суспензию расщепляли трипсином и пересаживали

клетки культуры в круглодонные планшеты. Тем не менее в результате пассажа и адгезии образовались фибробласты удлинённой формы. После формирования слившегося монослоя между клетками происходило контактное торможение, деление замедлялось. Изолированные клетки в культуре остаются стабильными. После 20 пассажей клетки сохраняют жизнеспособность. Культура клеток после формирования однородного монослоя в культуральных планшетах не проявляет морфологическую неоднородность. Морфологию клеток оценивали с использованием инвертированного микроскопа СКХ-41 (Olympus, Япония). На фотографии (рис. 1) можно увидеть,

1-я группа 2-я группа 3-я группа 4-я группа
Group 1 Group 2 Group 3 Group 4

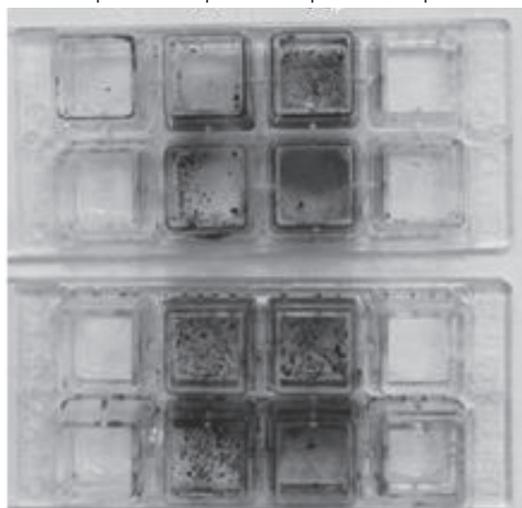


Рисунок 3. Анализ препаратов гиалуроновой кислоты на оказание эффекта стимуляции спонтанной остеогенной дифференцировки

Примечание. Окрашивание Косса. Анализ проводили через 21 день после пересадки. Очаги минерализации выражены в группах 2 и 3 в то же время, в контрольной группе и группе 4 подобного осадка не наблюдается. На рис. показана фотография культурального планшета. Было проведено 4 параллельных исследования с использованием четырех различных культур клеток DLSC, полученных из биологического образца.

Figure 3. Assessment of hyaluronic acid products stimulating spontaneous osteogenous differentiation

Note. Cossa staining. The analysis was performed 21 days after transplantation. Foci of mineralization are expressed in groups 2 and 3, at the same time, in the control group and group 4, such a sediment is not observed. In figure a photograph of the culture plate is shown. 4 parallel studies were carried out using four different cultures of DLSC cells obtained from a biological sample.

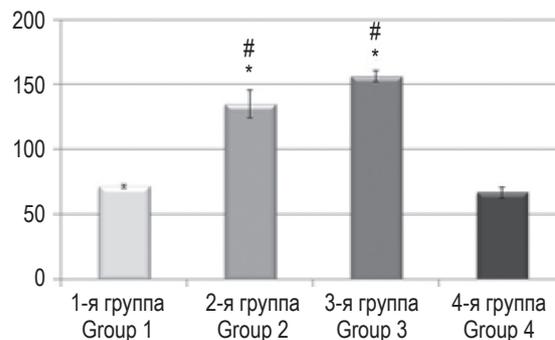


Рисунок 4. Анализ препаратов гиалуроновой кислоты на оказание эффекта стимуляции спонтанной остеогенной дифференцировки

Примечание. * – результаты, при которых коэффициент $p < 0,05$ значительно отличается от конт. группы в тот же день; # – результаты, при которых коэффициент $p < 0,05$ значительно отличается от 4 группы в тот же день. На основании денситометрии Косса. Образцы были проанализированы методом денситометрии. Потемнение на фото прямо пропорционально степени минерализации. Минерализация в группах 2 и 3 значительно выше по сравнению с группой 1 и 4. * $p < 0,05$ против 1; # $p < 0,05$ против 4; $n = 4$. Среднее \pm SD.

Figure 4. Assessment of hyaluronic acid products stimulating spontaneous osteogenous differentiation

Note. *, results in which the coefficient $p < 0.05$ significantly differs from the cont. groups on the same day; #, results in which $p < 0.05$ significantly differs from group 4 on the same day. Based on Koss densitometry. The samples were analyzed by densitometry. The darkening in the photo is directly proportional to the degree of mineralization. Mineralization in groups 2 and 3 is significantly higher than in group 1 and 4. * $p < 0.05$ vs 1; # $p < 0.05$ vs 4; $n = 4$. Mean \pm SD.

что клетки проявляют здоровую морфологию фибробластов во всех трех группах. В группах 2 и 3 в первый день появился черный осадок, который представлял собой мертвые клетки, проникшие глубоко в матрицу гиалуроновой кислоты. На седьмой день осадок отчетливо виден в обеих группах, в то же время в контрольной группе и группе 4 осадок не обнаружен. Основная причина возможно заключается в концентрации продуктов. Препарат выводит умирающие клетки, удалив их из культурального раствора, поэтому они не видны. В образцах 2 и 3 тем не менее мертвые клетки остаются в геле, их можно будет обнаружить в течение нескольких дней. Тем не менее эти результаты сами по себе не означают различия в начальном процессе отмирания клеток.

При определении числа жизнеспособных клеток (рис. 2) посредством WST в однодневный период мы применили один коэффициент, и это значение применялось пропорционально ко всем испытуемым группам. Результаты показывают, что количество жизнеспособных клеток в контрольной группе и в экспериментальных группах постоянно увеличивается. В группе 2 и 3 на первый день уменьшилось количество жизнеспособных клеток. Однако постепенно к седьмому дню исследования клетки в этих группах догнали по количеству контрольную группу. Это говорит о том, что воздействие различных концентраций лиофилизированного экстракта куриного эмбриона не оказывает существенного влияния на выживаемость и пролиферацию клеток PDLSC.

В проведенном исследовании изучали эффект продуктов, содержащих гиалуроновую кислоту на остеогенную дифференциацию клеток PDLSC с применением стандартной инкубационной среды. Окрашивание Косса. В группах 1 и 4 через 7, 14 и 21 день не было никаких признаков, свидетельствующих о спонтанной минерализации. Через 21 день в группах 2 и 3 цвет изменился на коричневый (рис. 3), что указывает на остеогенную дифференцировку отложений, связанных с наличием кальция. Наличие минерализованных узелков видно на изображении, полученном на фазово-контрастном микроскопе. Это изображение указывает, что эти две концентрации (150 мкг/мл и 300 мкг/мл) способны вызывать спонтанную остеогенную активность в клетках.

В программе обработки изображений ImageJ была изучена плотность каждого из видов осадка в экспериментальных образцах. Эти осадки,

по существу, — среднее потемнение, вызванное осадком на единицу площади. Как видно из результатов, полученных в группах, значительное повышение минерализации наблюдается в группах 2 и 3 по отношению к контрольной группе и отличается от группы 4 (рис. 4). Однако никакой разницы не было обнаружено между контрольной группой и группой 4 через 21 день воздействия.

Красное окрашивание Ализарином (рис. 5, см. 3-ю стр. обложки). Для подтверждения наших наблюдений мы провели еще одно исследование. При красном окрашивании ализарином (так же как и в предыдущем окрашивании Косса) ни одна из групп не показала видимых признаков минерализации через 14 дней после испытания. Затем, через 21 день, на фотографиях отчетливо видно, что группа 3 показала яркую красную окраску, более бледное покраснение наблюдалось в группе 2. Группа 3 обладает более сильными, а группа 2 — более слабыми остеогенными свойствами в инкубационной среде. Их применение само по себе не вызывает отложения кальция.

Измерение активности щелочной Фосфатазы (ЩФ/ALP). Активность щелочной фосфатазы является необходимым, хотя и не достаточным условием для процесса минерализации. Тенденция увеличения активности ЩФ проявлялась в течение первых четырех дней после высадки, однако существенную разницу между экспериментальными группами нельзя обнаружить. Наши результаты показывают, что изменение активности ALP не является определяющим в процессе минерализации.

Выводы

Исследования показали, что все три препарата гиалуроновой кислоты — в концентрациях 75 мкг/мл, 150 мкг/мл и 300 мкг/мл, являются биосовместимыми. По своему влиянию на клетки PDLSC высокие концентрации лиофилизированного экстракта клеток куриного эмбриона индуцируют спонтанную дифференцировку клеток в остеогенном направлении, что подтверждает наличие регенераторной активности. Остеогенная трансдифференцировка — привлекательный способ создания клеток остеогенного клеточного происхождения. Имеющиеся примеры показывают, что они могут быть многообещающими при моделировании заболеваний костей.

Список литературы / References

1. Суховой Ю.Г., Кайгородов Д.Г., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г. Средство для регенерации тканей. Патент на изобретение RU 2707186 С1, 25.11.2019. Заявка № 2018131510 от 31.08.2018. [Sukhovoy Yu.G. (RU), Kaygorodov D.G. (RU), Unger I. G. (RU), Kostolomova E.G. Agent for tissue regeneration. Invention patent RU 2707186 С1, 25.11.2019. Application No. 2018131510 dated 31.08.2018].
2. Цепов Л.М., Николаев А.И., Нестерова М.М., Цепова Е.Л., Цепов А.Л. Множественные хронические системные заболевания и патология пародонта // Пародонтология, 2019. Т. 24, № 2. С. 127-131. [Tsepon L.M., Nikolaev A.I., Nesterova M.M., Tsepona E.L., Tsepon A.L. Multiple chronic system diseases and periodontal pathology. *Parodontologiya = Periodontics*, 2019, Vol. 24, no. 2, pp. 127-131. (In Russ.)]
3. Bansal J., Kedige S.D., Anand S. Hyaluronic acid: a promising mediator for periodontal regeneration. *Indian J. Dent. Res.*, 2010, Vol. 21, no. 4, pp. 575-578.
4. Benjamin R.M. Oral health: the silent epidemic. *Public Health Rep.*, 2010, Vol. 125, pp. 158-159.
5. Dahlen G., Fejerskov O., Manji F. Current concepts and an alternative perspective on periodontal disease. *BMC Oral Health*, 2020, Vol. 20, no. 1, 235. doi: 10.1186/s12903-020-01221-4.
6. Kadar K., Kiraly M., Porcsalmy B., Molnar B., Racz G. Z., Blazsek J., Kallo K., Szabo E.L., Gera I., Gerber G., Varga G. Differentiation potential of stem cells from human dental origin – promise for tissue engineering. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2009, Vol. 60 (Suppl. 7), pp. 167-175.
7. Lu Z., Chen Y., Dunstan C., Roohani-Esfahani S., Zreiqat H. Priming adipose stem cells with tumor necrosis factor-alpha preconditioning potentiates their exosome efficacy for bone regeneration. *Tissue. Eng Part A*, 2017, Vol. 23, pp. 1212-1220.
8. Mathur S., Chopra R., Pandit I.K., Srivastava N., Gugnani N. Stem cell research: applicability in dentistry. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 2014, Vol. 29, no. 2, pp. e210-e219.
9. Pablo P., Chapple I.L., Buckley C.D., Dietrich T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2009, Vol. 5, pp. 218-224.
10. Seo B.M., Miura M., Gronthos S., Bartold P.M., Batouli S., Brahimi J., Young M., Robey P.G., Wang C.-Y., Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 2004, Vol. 364, no. 9429, pp. 149-155.

Авторы:

Суховой Ю.Г. — д.м.н., профессор, ФГБУН ФИЦ «Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»; директор ООО «Тюменский филиал института фундаментальной и клинической иммунологии», г. Тюмень, Россия

Authors:

Sukhovoy Yu.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Tyumen Research Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Director, Tyumen Affiliation, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Tyumen, Russian Federation

Костоломова Е.Г. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; ведущий научный сотрудник ООО «Тюменский филиал института фундаментальной и клинической иммунологии», г. Тюмень, Россия

Kostolomova E.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University; Leading Research Associate, Tyumen Affiliation, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Tyumen, Russian Federation

Унгер И.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник ООО «Тюменский филиал института фундаментальной и клинической иммунологии», г. Тюмень, Россия

Unger I.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Tyumen Affiliation, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Tyumen, Russian Federation

Акунева Т.В. — старший научный сотрудник ООО «Тюменский филиал института фундаментальной и клинической иммунологии», г. Тюмень, Россия

Akuneeva T.V., Senior Research Associate, Tyumen Affiliation, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Tyumen, Russian Federation

Поступила 21.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 21.05.2021
Accepted 17.06.2021

РОЛЬ БЕЛКА S100b И BDNF В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ У ЛИЦ С ИНДУЦИРОВАННОЙ ИММУНОКОМПРОМЕТАЦИЕЙ

Кныш С.В.¹, Маркелова Е.В.¹, Зенина А.А.^{1,2}, Костюшко А.В.¹, Федянина Л.Н.²

¹ ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

² ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Резюме. Постоперационные когнитивные дисфункции, относящиеся к легким проявлениям неврологической патологии, возникающей после оперативного вмешательства, в настоящее время являются важным вопросом, как для фундаментальной, так и прикладной медицины. Лежащие в основе данного процесса явления нейровоспаления до сих пор остаются малоизученными и дискуссионными. Изучение иммунопатогенеза нейровоспаления способно помочь в понимании развития патологии и подсказать пути решения названной проблемы. Особая роль в реализации данного процесса принадлежит нейропептидам. Цель исследования – охарактеризовать иммунопатогенез нейровоспаления у лиц с индуцированной иммунокомпрометацией на фоне аортокоронарного шунтирования.

Было обследовано 110 пациентов с ишемической болезнью сердца, которым была выполнена реваскуляризация миокарда в условиях экстракорпорального кровообращения. Патологическое нейровоспаление оценивалось по развитию постоперационной когнитивной дисфункции, на основании изменений в результатах когнитивного обследования (Монреальская шкала, MoCa тест). Пациенты подвергались тестированию до операции и на 7-е сутки после проведения операции. Согласно результатам тестирования, все пациенты были разделены на 2 группы: 1-я без признаков постоперационной когнитивной дисфункции и 2-я с данными признаками. Забор венозной крови осуществлялся четырехкратно, в день операции до вмешательства, сразу после вмешательства, через 24 часа и на 7-е сутки после операции. В сыворотке венозной крови определялось содержание S100b, BDNF.

Базовый уровень белка S100b в исследуемых группах не отличался от референсных значений. После операции повышение S100b отмечалось в обеих группах, однако у пациентов с развившейся постоперационной когнитивной дисфункцией показатель был достоверно выше. Несмотря на тенденцию к стабилизации, увеличенный уровень нейропептида сохранялся и через 24 часа после операции, на 7-е сутки показатель находился в пределах референсных значений, однако в 1-й группе был ниже, чем во 2-й группе. До операции показатель BDNF был достоверно выше у пациентов 1-й группы, в сравнении со 2-й группой. Во второй группе показатель был ниже значений, полученных у добровольцев из группы контроля. После оперативного вмешательства значения BDNF в сыворотке крови варьировали: сразу после операции у пациентов без когнитивной дисфункции уровень нейропептида

Адрес для переписки:

Кныш Сергей Васильевич
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
690105, Россия, г. Владивосток, ул. Русская, 57к, кв. 107.
Тел.: 8 (995) 773-65-23.
E-mail: immunolog.vl@gmail.com

Address for correspondence:

Knysh Sergey V.
Pacific State Medical University
690105, Russian Federation, Vladivostok, Russkaya str., 57k, apt107.
Phone: 7 (995) 773-65-23.
E-mail: immunolog.vl@gmail.com

Образец цитирования:

С.В. Кныш, Е.В. Маркелова, А.А. Зенина, А.В. Костюшко, Л.Н. Федянина «Роль белка S100b и BDNF в иммунопатогенезе нейровоспаления у лиц с индуцированной иммунокомпрометацией» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 237-242.
doi: 10.46235/1028-7221-982-ROS

© Кныш С.В. и соавт., 2021

For citation:

S.V. Knysh, E.V. Markelova, A.A. Zenina, A.V. Kostyushko, L.N. Fedyanina "Role of S100b protein and BDNF in immunopathogenesis of neuroinflammation in the patients with induced immunocompromised state", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 237-242.
doi: 10.46235/1028-7221-982-ROS

DOI: 10.46235/1028-7221-982-ROS

был выше. На 7-е сутки уровень BDNF был в пределах референсных величин, однако у пациентов 2-й группы значения были выше, чем в 1-й.

Ключевые слова: нейровоспаление, S100b, BDNF, АКШ, когнитивная дисфункция

ROLE OF S100b PROTEIN AND BDNF IN IMMUNOPATHOGENESIS OF NEUROINFLAMMATION IN THE PATIENTS WITH INDUCED IMMUNOCOMPROMISED STATE

Knysh S.V.^a, Markelova E.V.^a, Zenina A.A.^{a,b}, Kostyushko A.V.^a, Fedyanina L.N.^b

¹ Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

² Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Post-operation cognitive dysfunctions, related to mild manifestations of neurological pathology occurring after surgery, represent an important challenge for both fundamental and clinical medicine. The underlying phenomena of neuroinflammation are still poorly understood and disputable. The studies in immunopathogenesis of neuroinflammation may help in understanding the development of pathology and suggest ways to solve this problem. A special role for implementation of this process belongs to neuropeptides. Objective: to characterize immunopathogenesis of neuroinflammation in the individuals with immunocompromised state induced during aorto-coronary bypass surgery. A total of 110 patients with ischemic heart disease who underwent myocardial revascularization under extracorporeal circulation conditions were examined. Pathological neuroinflammation was recognized by development of postoperative cognitive dysfunction based on changing results of the cognitive examination (Montreal scale, MoCa test). The patients were tested before intervention, and on day 7 after surgery. According to the test results, all the patients were divided into 2 groups: (1) without signs of postoperative cognitive dysfunction and (2) with the mentioned signs. Venous blood was collected four times, on the day of surgery before the intervention, immediately after the surgery, 24 hours later, and on the 7th day after surgery. S100b and BDNF contents were determined in the venous blood serum. The baseline level of the S100b protein in the study groups did not differ from the reference values. After surgery, an increase in S100b was observed in both groups, but in patients with emerging postoperative cognitive dysfunction, these indexes were significantly higher. Despite a tendency for stabilization, the increased level of neuropeptides persisted 24 hours after the surgery; on the 7th day, the index was within the reference values, but in the 1st group it was lower than in the 2nd group. Prior to the operation, the BDNF level was significantly higher in the patients from group 1, compared with group 2. In the second group, the index was lower than the values obtained from the control group volunteers. After surgery, the values of BDNF in blood serum showed some differences: immediately after surgery, the level of neuropeptide was higher in patients without cognitive dysfunction. On day 7, the level of BDNF was within reference values, but in patients from group 2, the values were higher than in group 1.

Keywords: neuroinflammation, S100b, BDNF, ACB, cognitive dysfunction

Введение

Повышение частоты и высокотехнологичности проводимых медицинских вмешательств и операций диктует необходимость проведения адекватных и своевременных профилактических мер, а также развитие фундаментальной базы по вопросам предотвращения и лечения пери- и постоперационных осложнений. Особо важную группу составляют постоперативные когнитивные нарушения, в том числе после проведения операции аортокоронарного шунтирования

(АКШ). Современные методики ревазуляризации миокарда, подходы к искусственному кровообращению, анестезиологическому протоколу позволило снизить частоту грубых неврологических осложнений, однако постоперационные когнитивные дисфункции (ПКД), относящиеся к легким проявлениям неврологической патологии, встречаются в достаточно высоком проценте случаев, что обуславливает ухудшение качества жизни пациентов, влияет на экономические затраты на их лечение. Изучение иммунопатогенеза нейровоспаления, лежащего в основе ПКД способно

помочь в понимании механизмов развития патологии и подсказать пути решения проблемы [2].

Цель исследования — охарактеризовать иммунопатогенез нейровоспаления у лиц с индуцированной иммунокомпрометацией на фоне аортокоронарного шунтирования.

Материалы и методы

В рамках данного исследования нами было обследовано 110 пациентов с ишемической болезнью сердца, которым была выполнена реваскуляризация миокарда в условиях экстракорпорального кровообращения. Патологическое нейровоспаление оценивалось по развитию постоперационной когнитивной дисфункции, на основании изменений в результатах когнитивного обследования. С целью данной диагностики нами применялась Монреальская шкала (MoCa тест). Пациенты подвергались тестированию до операции и на 7-е сутки после проведения АКШ. Согласно результатам тестирования, все пациенты были разделены на 2 группы: 1-я без признаков постоперационной когнитивной дисфункции и 2-я с данными признаками. Забор венозной крови осуществлялся четырехкратно, в день операции до вмешательства, сразу после вмешательства, через 24 часа и на 7-е сутки после АКШ. Группа контроля была сформирована из 35 здоровых добровольцев, сопоставимых по возрасту и полу. Для данной группы забор биологического материала осуществлялся однократно.

Определение содержания S100b, BDNF в сыворотке венозной крови осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), с использованием анализатора Multiscan.

Для проведения ИФА использовались реактивы, произведенные R&D systems, каталожные номера DY120-05; DY248. Достоверность различий между сравниваемыми группами оценивалась по методу Вилкоксона–Манна–Уитни. Возможность использования показателей для прогнозирования развития ПКД оценивалась с использованием метода ROC-анализа.

Результаты и обсуждение

Базовый уровень белка S100b в исследуемых группах не отличался от референсных значений. После операции повышение S100b отмечалось в обеих группах, однако у пациентов с развившейся постоперационной когнитивной дисфункцией показатель был достоверно выше. Несмотря на тенденцию к стабилизации, увеличенный уровень нейропептида сохранялся и через 24 часа после операции, на 7-е сутки показатель находился в пределах референсных значений, однако в 1-й группе был ниже, чем во 2-й группе.

До операции показатель BDNF был достоверно выше у пациентов 1-й группы, в сравнении со 2-й группой. Во второй группе показатель был ниже значений, полученных у добровольцев из группы контроля. После оперативного вмешательства значения BDNF в сыворотке крови варьировали: сразу после операции у пациентов без когнитивной дисфункции уровень нейропептида был выше ($p = 0,033$). На 7-е сутки уровень BDNF был в пределах референсных величин, однако у пациентов 2-й группы значения были выше, чем в 1-й. Данные о пациентах, определяемых показателях представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДУЕМЫХ ПАЦИЕНТОВ И ГРУППЫ КОНТРОЛЯ, ЗНАЧЕНИЯ S100b И BDNF В СЫВОРОТКЕ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ

TABLE 1. CHARACTERISTIC OF EXAMINED PATIENTS AND CONTROL GROUP, S100b AND BDNF VALUES IN SERUM OF VEIN BLOOD

Показатель Parameter		Группа контроля Control group (n = 35)	Группа 1 Group 1 (n = 56)	Группа 2 Group 2 (n = 54)	p-value
Возраст, лет Age, years		67,2 (63-72)	67,6 (59-74)	68,9 (60-74)	$p_c-p_1 = 0,812$ $p_c-p_2 = 0,745$ $p_1-p_2 = 0,841$
Соотношение мужчин и женщин Man and women ratio		20/15	35/21	32/22	
MoCa	До АКШ Before ACB	22,5 (19-25)	22,9 (19-26)	22,1 (19-26)	$p_c-p_1 = 0,610$ $p_c-p_2 = 0,599$ $p_1-p_2 = 0,621$
	7 суток 7 days		21,9 (18-25)	18,0 (16-22)	$p_c-p_1 = 0,897$ $p_c-p_2 = 0,043$ $p_1-p_2 = 0,038$

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатель Parameter		Группа контроля Control group (n = 35)	Группа 1 Group 1 (n = 56)	Группа 2 Group 2 (n = 54)	p-value
s100b, пг/мл S100b, pg/ml	До АКШ Before ACB	28,42 (17,12-38,88)	30,61 (19,85-30,68)	26,1 (15,33-30,66)	$p_{c-p_1} = 0,625$ $p_{c-p_2} = 0,597$ $p_1-p_2 = 0,512$
	сразу после АКШ After ACB		626,99 (584,83-669,68)	990,68 (535,82-1534,29)	$p_{c-p_1} < 0,001$ $p_{c-p_2} < 0,001$ $p_1-p_2 = 0,043$
	24 часа 24 hours		62,9 (31,76-70,4)	113,84 (50,82- 134,06)	$p_{c-p_1} = 0,009$ $p_{c-p_2} = 0,007$ $p_1-p_2 = 0,038$
	7 суток 7 days		19,46 (17,71-26,98)	34,16 (31,04-52,02)	$p_{c-p_1} = 0,678$ $p_{c-p_2} = 0,554$ $p_1-p_2 = 0,039$
BDNF(пг/мл)	До АКШ Before ACB	15,32 (7,88-19,61)	18,08 (13,84-20,92)	8,46 (7,86-11,48)	$p_{c-p_1} = 0,628$ $p_{c-p_2} = 0,024$ $p_1-p_2 = 0,011$
	сразу после АКШ After ACB		10,78 (6,72-15,86)	6,75 (5,64-14,13)	$p_{c-p_1} = 0,041$ $p_{c-p_2} = 0,012$ $p_1-p_2 = 0,033$
	24-часа 24 hours		5,25 (3,16-14,61)	9,1 (5,86-16,68)	$p_{c-p_1} = 0,067$ $p_{c-p_2} = 0,024$ $p_1-p_2 = 0,031$
	7 суток 7 days		12,23 (9,12-15,97)	14,63 (12,24-16,90)	$p_{c-p_1} = 0,801$ $p_{c-p_2} = 0,742$ $p_1-p_2 = 0,041$

Нейропептид S100b исследуется с позиции его роли как в нейровоспалении в целом, так и в качестве патогенетически значимого элемента в развитии ПКД. Особое значение имеет дозозависимость эффекта данного белка. В физиологической концентрации S100b преимущественно отвечает за нейропротекцию и поддержание жизни клеток нервной системы. Патологическое повышение содержания нейропептида чаще ассоциируется с повреждающим центральную нервную систему процессом [1]. Продемонстрированная динамика содержания нейропептида S100b в сыворотке крови пациентов с когнитивной дисфункцией (группа 2) позволяет судить о его патологическом значении в развитии нейровоспаления, особенно в ранний послеоперационный период.

Индукция нейровоспаления у пациентов с ПКД может быть ассоциирована с использованием искусственного кровообращения при проведении оперативного вмешательства, что вызывает повреждение отдельных клеток нервной системы, индуцирует воспаление, как на локальном, так и на системном уровне и провоцирует развитие ПКД [5]. Сохранение различий в уровне S100b на 7-е сутки между группами, вероятно, носят вторичный характер и не являются

диагностически значимым, однако различия, зарегистрированные сразу и через 24 часа после оперативного вмешательства, могут нести прогностическую ценность. Данный факт был подтвержден путем проведения ROC-анализа. По результатам была построена ROC-кривая, демонстрирующая хорошее качество модели (AUC 0,59 и 0,74 после АКШ и через 24 часа). Данные представлены на рисунках 1 и 2.

Активное исследование роли и функций мозгового нейротрофического фактора BDNF было связано с необходимостью оценки роли нейропептидов в осуществлении процессов высшей нервной деятельности. Данный белок ответствен за выживаемость клеток нервной системы, как собственных, так и глиальных [3]. В настоящее время особенности функционирования BDNF полноценно не изучены, остаются «белые пятна» в вопросе того, в ответ на что индуцируется синтез данного вещества, где он может осуществляться и каковы физиологические нормы BDNF [9].

Выявленная нами динамика в изменении сывороточного содержания BDNF может позволить судить о том, что предшествующий операции дефицит является патогенетическим фактором риска развития ПКД, что было подтверждено нами

с помощью ROC-анализа (рис. 3). Положительная динамика, заключающаяся в восстановлении уровня BDNF до референсных значений через 7 суток после оперативного вмешательства, может быть связана с тем, что повреждение нейронов, ассоциированное с воспалительными изменениями в структурах ЦНС, провоцирует превращение предшественника BDNF – proBDNF до зрелой и активной формы, что подтверждает высокий репаративный потенциал [7, 8], однако первоначальный дефицит мозгового нейротрофического фактора, как уже нами было показано, путем построения ROC-кривой может быть предиктором и, вероятно, патогенетическим звеном в развитии ПКД (AUC 0,974, отличное качество модели). Причины данного предоперационного недостатка BDNF могут быть различны, нельзя исключать как роль генетического полиморфизма, приводящего к снижению базального уровня BDNF [10], так и возможность влияния иных опосредованных факторов, таких как повреждение мышц [4], нарушения в работе свертывающей-антисвертывающей системы крови и активации тромбоцитов [6].

Выводы

Представленные нами данные подчеркивают важность изучения фундаментальных аспектов нейровоспаления, что связано как с необходимостью и неотвратимостью научного прогресса, так и с прикладным использованием полученных знаний для повышения качества оказываемой медицинской помощи и, как следствие, улучшения уровня жизни пациентов. Представленные нами результаты лишь в малой степени характеризуют особенности нейровоспаления у пациентов после АКШ, однако уже сегодня могут быть рекомендованы для рассмотрения с целью практического применения. Мы считаем необходимым продолжать изучение роли нейропептидов в развитии воспаления в структурах ЦНС при различных заболеваниях, уделяя особое внимание не только отдельным представителям нейропептидов, сколько их взаимодействию и взаимовлиянию [1].

Благодарности

Авторы выражают признательность ректору ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России Шуматову Валентину Борисовичу, проректору ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России Елисеевой Екатерине Валерьевне, а также научному отделу ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России в лице руководителя Поддубного Евгения Александровича за поддержку исследования в рамках внутривузовского научного гранта.

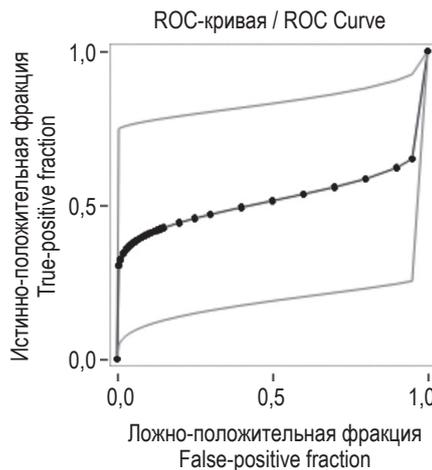


Рисунок 1. ROC-кривая S100b у пациентов с ПКД после АКШ

Figure 1. ROC-curve of S100b in patients with POCD after ACB

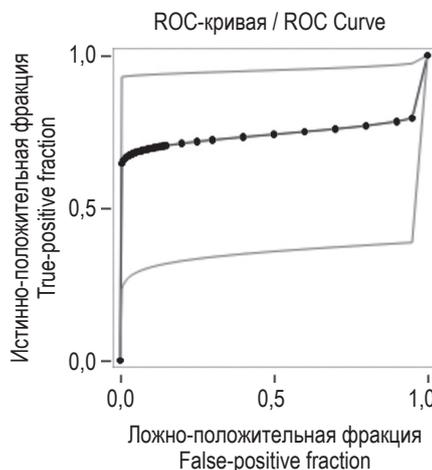


Рисунок 2. ROC-кривая S100b у пациентов с ПКД после АКШ через 24 часа

Figure 2. ROC-curve of S100b in patients with POCD after ACB in 24 hours

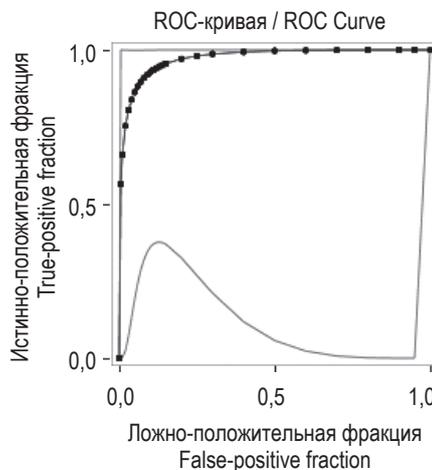


Рисунок 3. ROC-кривая BDNF у пациентов с ПКД до АКШ

Figure 3. ROC-curve of BDNF in patients with POCD before ABP

Список литературы / References

1. Кныш С.В., Маркелова Е.В., Симакова А.И., Караулов А.В. Показатели системы нейропептидов в острый период опоясывающего герпеса // Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 2. С. 329-337. [Knysh S.V., Markelova E.V., Simakova A.I., Karaulov A.V. Neuropeptide system parameters in acute herpes zoster. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, Vol. 10, no. 2, pp. 329-337. (In Russ.)]
2. Alekseevich G.Y., Rodikov M.V., Marchenko A.V., Myalyuk P.A., Alekseevich G.V. Analysis of Post-Operative Cognitive Dysfunction after Different Methods of Aortocoronary Bypass Surgery. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2019, Vol. 49, pp. 347-351.
3. Borodinova A.A., Salozhin S.V. Differences in the biological functions of BDNF and proBDNF in the central nervous system. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2017, Vol. 47, no. 3, pp. 251-265.
4. Guéniot, L., Lepere, V., de Medeiros, G.F., Danckaert A., Flamant P., Le Dubal M., Langeron O., Goossens P.L., Chretien F., Jouvion G. Muscle injury induces postoperative cognitive dysfunction. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 2768. doi: 10.1038/s41598-020-59639-3.
5. He X., Wen L.J., Cui C., Li D.R., Teng J.F. The significance of S100 β protein on postoperative cognitive dysfunction in patients who underwent single valve replacement surgery under general anesthesia. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2017, Vol. 21, no. 9, pp. 2192-2198.
6. Karege F., Bondolfi G., Gervasoni N., Schwald M., Aubry J.M., Bertschy G. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biol. Psychiatry*, 2005, Vol. 57, no.9, pp. 1068-1072.
7. Saxena A.K., Lakshman K., Sharma T., Gupta N., Banerjee B.D., Singal A. Modulation of serum BDNF levels in postherpetic neuralgia following pulsed radiofrequency of intercostal nerve and pregabalin. *Pain Manag.*, 2016, Vol. 6, no. 3, pp. 217-227.
8. Shubayev V., Strongin A., Yaksh T. Role of myelin auto-antigens in pain: a female connection. *Neural Regen. Res.*, 2016. Vol. 11, no. 6, pp. 890-891.
9. Vutskits L. Predicting postoperative brain function from the blood: is there a role for biomarkers? *Br. J. Anaesth.*, 2017, Vol. 119, no. 2, pp. 291-293.
10. Xie S., Yu L., Zhou M., Liu L., Lei D., Han C. Association between BDNF rs6265 polymorphisms and postoperative cognitive dysfunction in Chinese Han Population. *Brain Behav.*, 2020, Vol. 10, no. 10, e01800. doi: 10.1002/brb3.1800.

Авторы:

Кныш С.В. — к.м.н., ассистент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Маркелова Е.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Зенина А.А. — аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач анестезиолог-реаниматолог Медицинского центра «Дальневосточного федерального университета», г. Владивосток, Россия

Костюшко А.В. — к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Федянина Л.Н. — д.м.н., профессор, профессор департамента фундаментальной медицины Школы биомедицины ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Поступила 11.05.2021
Принята к печати 16.06.2021

Authors:

Knysh S.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Markelova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Zenina A.A., Postgraduate Student, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University; Anesthesiologist-Resuscitator of Medical Center, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Kostyushko A.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Fedyanina L.N., PhD, MD (Medicine). Professor, Department of Fundamental Medicine, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Received 11.05.2021
Accepted 16.06.2021

ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОФИЛЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ УДАЛЕНИИ ТУБЕРКУЛЕМЫ ЛЕГКИХ

Бердюгина О.В.

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

Резюме. С учетом имеющихся данных о том, что субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови у больных с туберкулемами легких могут являться инструментом определения состояния пациента и динамического наблюдения за патологическим процессом, целью данного исследования стал мониторинг количества и функционального состояния Т-лимфоцитов периферической крови при резекции туберкулемы легких. Обследовано 22 человека с туберкулемами легких: 12 мужчин (54,5%) и 10 женщин (45,5%). В исследовании не участвовали больные с иммунозависимыми заболеваниями и ВИЧ. Всем обследованным пациентам была выполнена операция образования малоинвазивным методом. Кровь исследовали дважды: до и через 5–7 суток после операции, определяли число Т-клеток ($CD45^+CD3^+$), их субпопуляций ($CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD4^+CD8^-$, $CD3^+CD4^+CD8^+$, $CD3^{bright}CD4^+$, $CD3^+CD16^+CD56^+$, $CD3^+HLA-DR^+$, $CD3^+CD25^+$, $CD3^+CD25^+HLA-DR^+$), а также отношение $CD3^+CD25^+/CD3^+HLA-DR^+$ (прибор Coulter Epicx XL, Beckman Coulter, USA). Дополнительно исследовали динамику численности В-клеток и NK-клеток. В связи с тем, что выборка была небольшой, распределение считали аномальным и использовали Т-критерий Вилкоксона (Wilcoxon Matched Pairs Test). Отличия считали значимыми при $p_w < 0,05$. В работе использованы статистические программы Statistica v. 12.5.192.7 (StatSoft, USA) и GraphPad Prism v.8.0.2 (GraphPad Software, USA). Установлено, что удаление туберкулемы приводило к перераспределению численности Т-, В- и NK-клеток в сравнении с дооперационным уровнем: популяция В-лимфоцитов увеличивалась на 35,8%, тогда как число NK-клеток снижалось на 18,9% ($p_w < 0,05$). Несмотря на такие существенные изменения двух других популяций, общее количество Т-лимфоцитов снижалось незначительно, изменения варьировали в пределах 3,2% для абсолютных и 3,8% ($p_w < 0,05$) для относительных значений соответственно. Динамика субпопуляционного состава Т-клеток выглядела иначе. В послеоперационном периоде отмечалось снижение на 4,8% числа $CD3^+CD4^+$ клеток, сокращение популяции $CD3^+CD8^+$ было более значимым и составляло 26,2% ($p_w < 0,05$). Число дубль-позитивных клеток увеличивалось на 13,6% ($p_w < 0,05$), число $\gamma\delta$ Т-клеток снижалось на 20,8% ($p_w < 0,05$), абсолютное количество TNK-клеток увеличивалось на 32,4%. Снижение в раннем послеоперационном периоде количества $\gamma\delta$ Т-клеток может считаться благоприятным критерием в оценке состояния больного, поскольку в опубликованных ранее данных представлены сведения о повышенном количестве этих клеток у больных с туберкулемами. Другим благоприятным фактором может являться увеличение экспрессии Т-лимфоцитами HLA-DR, поскольку известно, что у больных с туберкулемами число таких клеток в периферической крови меньше, чем у здоровых людей. В целом, определение экспрессии активационных молекул показало, что происходит снижение числа Т-клеток, экспрессирующих

Адрес для переписки:

Бердюгина Ольга Викторовна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (904) 988-43-82.
E-mail: berolga73@rambler.ru

Address for correspondence:

Berdyugina Olga V.
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,
Russian Academy of Sciences
620049, Russian Federation, Ekaterinburg,
Pervomayskaya str., 106.
Phone: 7 (904) 988-43-82.
E-mail: berolga73@rambler.ru

Образец цитирования:

О.В. Бердюгина «Трансформация профиля Т-лимфоцитов периферической крови при удалении туберкулемы легких» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 243–248.
doi: 10.46235/1028-7221-983-TOT
© Бердюгина О.В., 2021

For citation:

O.V. Berdyugina "Transformation of the T-lymphocyte profile in peripheral blood upon resection of tuberculous lung granuloma", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 243–248.
doi: 10.46235/1028-7221-983-TOT
DOI: 10.46235/1028-7221-983-TOT

CD25⁺ и растет количество CD3⁺HLA-DR⁺ клеток. Популяция Т-лимфоцитов, экспрессирующих одновременно и CD25⁺ и HLA-DR⁺ после операции смещается к физиологической норме. Полученные данные предполагается использовать для контроля за результатами лечения больных.

Ключевые слова: туберкулема, Т-лимфоциты, γТ-клетки, CD3⁺CD4⁺CD8⁺, CD3⁺CD25⁺HLA-DR⁺, M. tuberculosis

TRANSFORMATION OF THE T-LYMPHOCYTE PROFILE IN PERIPHERAL BLOOD UPON RESECTION OF TUBERCULOUS LUNG GRANULOMA

Berdyugina O.V.

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

Abstract. It is known that subpopulations of peripheral blood T-lymphocytes in patients with tuberculous lung granuloma may be used for determining patient's condition and monitoring pathological process. The aim of this study was to monitor the number and functional state of peripheral blood T-lymphocytes upon resection of tuberculous granuloma of the lungs. Twenty-two patients with tuberculous lung granuloma were examined, including 12 men (54.5%) and 10 women (45.5%). The patients with immune-dependent diseases and HIV were not eligible for the study. All these patients underwent resection of the granuloma by minimally invasive method. The blood samples were examined twice: before and 5-7 days after surgery, i.e., total T-cell numbers, (CD45⁺CD3⁺), their subpopulations were also determined (CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺CD8⁺, CD3^{bright}CD4⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD25⁺HLA-DR⁺), as well as CD3⁺CD25⁺/CD3⁺HLA-DR⁺ ratio, performed by means of Coulter Epicx XL instrument (Beckman Coulter, USA). In addition, the changes in B- and NK-cell numbers were studied. Due to small size of the groups, distribution was considered abnormal, and the Wilcoxon Matched-Pair Test was used. The differences were considered significant at $p_w < 0.05$. The statistical programs Statistica v.12.5.192.7 (StatSoft, USA) and GraphPad Prism v. 8.0.2 (GraphPad Software, USA) were used in the work. Resection of tuberculous granuloma of the lungs was followed by redistribution of T-, B-, and NK-cell numbers, as compared with preoperative level. The B-cell population increased by 35.8%, whereas the number of NK-cells decreased by 18.9% ($p_w < 0.05$). Despite such significant changes in two other populations, total number of T-lymphocytes decreased only slightly: the changes ranged within 3.2% for absolute counts, and 3.8% ($p_w < 0.05$) for relative values. The changes of T-cell subpopulation profile were different. During the postsurgical period, a 4.8% decrease in the CD3⁺CD4⁺-cell number was observed, whereas reduction in CD3⁺CD8⁺ subpopulation was more significant, and amounted to 26.2% ($p_w < 0.05$). The number of double-positive cells increased by 13.6% ($p_w < 0.05$); γТ-cell counts decreased by 20.8% ($p_w < 0.05$), and absolute number of TNK-cells increased by 32.4%. A decreased number of γТ-cells in early postoperative period could be considered a favorable criterion for assessing the patient's condition, since some previous studies provide information about increased number of these cells in patients with tuberculous granuloma. Increased HLA-DR expression on T-lymphocytes may be another favorable factor, since the patients with tuberculous granuloma are known to have lesser amounts of such cells in peripheral blood than healthy persons. In general, a search for expression of activation molecules showed that there is a decrease of T-cells expressing CD25⁺, and an increased number of CD3⁺HLA-DR⁺-cells. The T-lymphocyte population co-expressing both CD25⁺ and HLA-DR⁺ shifts to the normal ranges after the surgery. The obtained data are supposed for monitoring results of treatment in the patients.

Keywords: tuberculous granuloma, T-cells, γТ-cells, CD3⁺CD4⁺CD8⁺, CD3⁺CD25⁺HLA-DR⁺, M. tuberculosis

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН № гос. регистрации АААА-А21-121012090091-6.

Введение

Известно, что Т-лимфоциты играют важную роль в процессах формирования и поддержания туберкулемы легких [8]. Упомянутые клетки,

стимулируемые бактериальными антигенами, распознают инфицированные макрофаги и взаимодействуют с ними посредством секреции цитокинов (IFNγ, TNF), образуя гранулемы и одновременно усиливая микробицидные функции фагоцитов [6, 7]. Установлено, что количество Т-клеток, способных распознавать инфицированные макрофаги, коррелирует с резистентно-

стью к возбудителю заболевания [11]. Выявлено, что изменение функционального состояния этих клеток определяет течение инфекционного процесса [12]. Таким образом, предполагается, что Т-лимфоциты могут играть решающее значение в контроле за *M. tuberculosis*.

Широко распространенное в настоящее время мнение о том, что образование туберкулезной гранулемы является методом отграничения патологического процесса подвергается сомнению. Появились данные, свидетельствующие о том, что бактерии создают туберкулему с целью собственного распространения [3]. Это положение основано на сведениях об «открытости» зрелых гранул, допускающих миграцию клеток, а также о создаваемой внутри микросреде ослабленного иммунитета для поддержания роста *M. tuberculosis* [10]. Следовательно, в вопросе контроля за инфекционным процессом, при обнаружении туберкулемы, выбор решения между резекцией образования для снижения риска активации патологического процесса или сохранением и последующим наблюдением особенно важен. Одним из подходов, позволяющих приблизиться к решению данной проблемы, может быть мониторинг субпопуляционного состава Т-клеток периферической крови в процессе резекции туберкулемы на клинической модели.

Известно, что поиск биологических маркеров оценки состояния пациента при инфицировании *M. tuberculosis* является одной из важных задач [9]. С учетом имеющихся данных о том, что субпопуляции Т-лимфоцитов периферической крови у больных с туберкулемами легких могут являться инструментом определения состояния пациента и динамического наблюдения за патологическим процессом [1], можно полагать, что исследование популяционного состава Т-клеток до и после резекции туберкулемы является актуальным направлением. В частности, интересной представляется оценка некоторых малых популяций Т-лимфоцитов периферической крови, например дубль-позитивных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) – DPT (double-positive T-lymphocytes), выявление которых связывают с различными патологическими состояниями [5] или CD3⁺CD25⁺HLA-DR⁺ активированных Т-клеток: Т-регуляторных клеток (CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{low}) коэкспрессирующих HLA-DR [13], позволяющих иметь более высокую экспрессию генов молекул, определяющих контактно-зависимую активацию клеток и цитотоксичность [4].

Таким образом, целью данного исследования стал мониторинг количества и функционального состояния Т-лимфоцитов периферической крови при резекции туберкулемы легких.

Материалы и методы

В изучении приняло участие 22 человека с диагнозом «туберкулема легких» (код А15.0 по Международной классификации болезней), давших добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Работа проведена в соответствии с действующими правовыми нормами, в том числе Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Рекомендации для врачей, занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей», Федеральным законом № 323 от 21.11.2011 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 200н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил клинической практики в Российской Федерации». Диагноз во всех случаях был подтвержден клинико-инструментальными и лабораторными методами исследования.

Среди обследованных было 12 мужчин (54,5%) и 10 женщин (45,5%), возраст варьировал в диапазоне от 28 до 40 лет (медиана – 31 год). В 27,3% случаев у больных были сопутствующие заболевания, в частности хронический пиелонефрит в стадии ремиссии. Из исследования были исключены потребители наркотических средств, 41% больных курили табак. В исследовании не участвовали больные с иммунозависимыми заболеваниями. Также среди пациентов не было носителей вируса иммунодефицита человека ввиду необходимости оценки субпопуляций Т-клеток, которые являются патогенетической мишенью данного вируса. Туберкулезные гранулемы выявлялись в равных долях в правом и левом легком, размеры варьировали от 0,5 до 3,0 см (медиана – 1,9 см). В 59% случаев обнаруживались дополнительные единичные очаги, не превышавшие величины 0,7-0,5 см. Возбудитель заболевания во всех случаях имел множественную или предшироко лекарственную устойчивость. Туберкулема впервые выявлялась за 150-500 суток до операции (медиана – 270 суток).

Всем обследованным пациентам была выполнена резекция образования малоинвазивным методом (оперативный прием производился к.м.н. Баженовым А.В.). Кровопотеря была незначительной: от 52 до 75 мл (медиана – 70 мл), что не должно было отразиться на гемодинамике и значимо влиять на отклонения популяционного состава изучаемых клеток периферической крови. Полученный резектат подвергался гистологическому исследованию с определением активности процесса (исследование выполнено к.м.н. Бердниковым Р.Б). В большинстве случаев (68,2%) туберкулемы были умеренно-активными.

Кровь для исследования у больных получали из периферической вены дважды: первый раз –

до оперативного лечения, второй раз – на 5-7-е сутки после резекции туберкулемы. Исследования популяционного состава клеток осуществляли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Coulter Epicx XL (Beckman Coulter, USA). Во всех случаях определяли относительное и абсолютное количество клеток. В связи с тем, что наиболее выраженные изменения наблюдались при оценке абсолютных значений, в данной работе в подавляющем большинстве случаев представлены именно эти данные.

Оценку воспалительной реакции производили на основании данных о числе нейтрофильных гранулоцитов ($CD14^+CD13^{low}$), а также лейкоцитарной реакции (leukocytes). Определяли число Т-клеток ($CD45^+CD3^+$), их субпопуляций ($CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD4^+CD8^-$, $CD3^+CD4^+CD8^+$, $CD3^{bright}CD4^-$, $CD3^+CD16^+CD56^+$, $CD3^+HLA-DR^+$, $CD3^+CD25^+$, $CD3^+CD25^+HLA-DR^+$), а также отношение $CD3^+CD25^+/CD3^+HLA-DR^+$. Для оценки смещения числа Т-клеток в среде других популяций дополнительно исследовали динамику численности В-клеток ($CD45^+CD3^-CD19^+$) и NK-клеток ($CD45^+CD3^-16^+56^+$).

Полученные результаты оценены с использованием статистических методов и представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$). В связи с тем, что выборка была небольшой, распределение считали аномальным и использовали Т-критерий Вилкоксона / тест согласованных пар Вилкоксона (Wilcoxon Matched Pairs Test) для оценки различий между сравниваемыми группами. При выборе критерия учитывали необходимость производить сопоставление данных, измеренных в разные временные промежутки на одной и той же выборке. Отличия считали значимыми при $p_w < 0,05$. Оценка критерия, построение гистограмм и вероятностных графиков производили в программе Statistica v. 12.5.192.7 (StatSoft, USA). Для визуализации полученных данных дополнительно использовали программное обеспечение GraphPad Prism v. 8.0.2 (GraphPad Software, USA).

Результаты и обсуждение

Известно, что любая операция является травмой, инициирующей воспалительный процесс. В нашем исследовании лабораторными критериями, косвенно подтверждающими факт развития воспалительной реакции в послеоперационном периоде стали: лейкоцитоз с увеличением популяции клеток на 16,2%, $p_w < 0,05$: с $5,85 (4,68-7,50) \times 10^9/л$ до $6,80 (5,23-7,25) \times 10^9/л$ (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки), отмечавшийся на 5-7-е сутки, а также нейтрофилия, заключавшаяся в

увеличении числа клеток на 18,4%, $p_w < 0,049$: с $3,54 (2,40-4,17) \times 10^9/л$ до $4,18 (2,95-4,53) \times 10^9/л$.

Непосредственное изучение реакции Т-клеток на малоинвазивную операцию по удалению туберкулемы легких заключалось в оценке изменения количественного и популяционного состава, а также определении числа клеток, несущих активационные молекулы. Помимо этого, было определено отношение популяций активированных клеток $CD3^+CD25^+$ к $CD3^+HLA-DR^+$. Однако предвзяло исследование изучение смещения числа Т-клеток в среде двух других популяций иммунокомпетентных клеток: В-лимфоцитов и NK-клеток.

Установлено, что удаление туберкулемы приводило к перераспределению численности Т-, В- и NK-клеток в сравнении с дооперационным уровнем: популяция В-лимфоцитов ($CD45^+CD3^-CD19^+$) увеличивалась на 35,8%: с $0,17 (0,10-0,38) \times 10^9/л$ до $0,23 (0,17-0,33) \times 10^9/л$, тогда как число NK-клеток ($CD45^+CD3^-16^+56^+$) снижалось на 18,9%, $p_w < 0,05$: с $0,16 (0,12-0,26) \times 10^9/л$ до $0,13 (0,09-0,18) \times 10^9/л$. Несмотря на такие существенные изменения двух других популяций, общее количество Т-лимфоцитов в послеоперационном периоде снижалось незначительно, изменения варьировали в пределах 3,2% для абсолютных: с $1,32 (1,14-1,66) \times 10^9/л$ до $1,27 (1,02-1,47) \times 10^9/л$ и 3,8%, $p_w < 0,05$: с 77,7 (70,0-82,3) % до 74,8 (66,3-82,3) % – для относительных значений соответственно.

Динамика субпопуляционного состава Т-клеток выглядела несколько иначе. В частности, в послеоперационном периоде отмечалось снижение числа $CD3^+CD4^+$ клеток на 4,8%: с $0,84 (0,74-1,00) \times 10^9/л$ до $0,80 (0,64-0,98) \times 10^9/л$. Сокращение популяции $CD3^+CD8^+$ было более значимым и составляло 26,2%, $p_w < 0,05$: с $0,43 (0,31-0,52) \times 10^9/л$ до $0,32 (0,29-0,39) \times 10^9/л$. Помимо этого, происходило снижение количества дубль-негативных Т-клеток ($CD3^+CD4^-CD8^-$) – DNT (double-negative T-lymphocytes) на 9,3%: с $0,054 (0,038-0,076) \times 10^9/л$ до $0,049 (0,038-0,069) \times 10^9/л$. Число DPT увеличивалось на 13,6%, $p_w < 0,05$: с $0,011 (0,007-0,023) \times 10^9/л$ до $0,013 (0,006-0,022) \times 10^9/л$ (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки).

Динамическое наблюдение показало, что в послеоперационном периоде абсолютное число $\gamma\delta$ Т-клеток ($CD3^{bright}CD4^-$) снижалось на 20,8%, $p_w < 0,05$: с $0,012 (0,006-0,019) \times 10^9/л$ до $0,009 (0,005-0,015) \times 10^9/л$, абсолютное количество TNK-клеток ($CD3^+CD16^+CD56^+$) увеличивалось на 32,4%: с $0,034 (0,014-0,052) \times 10^9/л$ до $0,045 (0,033-0,053) \times 10^9/л$, тогда как относительное повышалось еще больше – в 1,65 раза ($p_w < 0,05$).

Маркеры активации Т-клеток изменялись следующим образом. Абсолютное число $CD3^+HLA-$

DR⁺ увеличивалось на 27,3%, $p_w < 0,05$: с $0,016 (0,010-0,046) \times 10^9/\text{л}$ до $0,021 (0,012-0,054) \times 10^9/\text{л}$, а количество CD3⁺CD25⁺ возрастало на 39,1%: с $0,011 (0,008-0,031) \times 10^9/\text{л}$ до $0,016 (0,005-0,033) \times 10^9/\text{л}$. Количество клеток, несущих на поверхности одновременно оба маркера активации HLA-DR и CD25 снижалось на 22,2%: с $0,005 (0,002-0,009) \times 10^9/\text{л}$ до $0,003 (0,001-0,008) \times 10^9/\text{л}$.

Отношение CD3⁺25⁺/CD3⁺DR⁺ снижалось на 28,6%: с 0,7 (0,4-1,8) до 0,5 (0,2-1,6) (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки).

В ранее проведенных исследованиях было установлено, что у больных с туберкулемами в сравнении со здоровыми людьми фиксируется повышенное количество Т-лимфоцитов в периферической крови [1]. Полученные в настоящем исследовании данные доказывают, что удаление гранулемы не приводит к существенному изменению числа Т-клеток в крови, однако перераспределение численности иммунокомпетентных клеток все же происходит. В частности, наблюдается увеличение числа В-лимфоцитов и достоверное снижение количества НК-клеток, которых у больных с туберкулемами, по ранее установленным данным [1], исходно меньше, чем у здоровых людей. Некоторое влияние, очевидно, может оказывать воспалительная реакция, вызванная операцией, которая в большинстве случаев сопровождается лимфопенией [2].

Вместе с тем удалось доказать, что субпопуляционный состав Т-лимфоцитов в периферической крови после резекции туберкулемы изменяется. В частности, наблюдается снижение числа Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), Т-цитотоксических (CD3⁺CD8⁺) и DNT, а вот количество DPT достоверно увеличивается. Возможно, такие отличия обусловлены функционированием CD3⁺CD4⁺CD8⁺ клеток, поскольку известно, что их деятельность определяется выраженностью экспрессии обоих маркеров (low/bright), а также маркеров активации (CD38, HLA-DR). В таких случаях клетки могут проявлять цитотоксический потенциал,

играть регуляторную роль, секретировать IL-4, TNF α [5].

Обнаруженное снижение в раннем послеоперационном периоде количество $\gamma\delta$ T-клеток однозначно может считаться благоприятным критерием оценки послеоперационного состояния больного, поскольку в опубликованных ранее данных представлены сведения о повышенном количестве этих клеток у больных с туберкулемами [1]. Другим благоприятным фактором может являться увеличение экспрессии Т-лимфоцитами HLA-DR (маркера поздней активации), поскольку известно, что у больных с туберкулемами число таких клеток в периферической крови меньше, чем у здоровых добровольцев [1]. В целом определение экспрессии активационных молекул показало, что происходит смещение экспрессии с CD25⁺ к HLA-DR⁺, а именно снижение первых и повышение числа вторых. Количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих одновременно и CD25⁺ и HLA-DR⁺, после операции возвращается к физиологической норме [13].

Заключение

Таким образом, установлено изменение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови у больных после резекции туберкулемы легких, что может отражать динамику патологического процесса. Полученные данные предполагается использовать для контроля за результатами лечения больных.

Благодарности

Автор выражает благодарность учреждению, на базе которого было выполнено данное исследование: Уральскому научно-исследовательскому институту фтизиопульмонологии – филиалу Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Список литературы / References

1. Бердюгина О.В., Ершова А.В. Иммунологические реакции у больных с туберкулемой легкого в разных фазах активности // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 3. С. 363-365. [Berdyugina O.V., Yershova A.V. Immunological reactions in patients with lung tuberculoma in different phases activity. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 3, pp. 363-365. (In Russ.)]
2. Carvelli J., Piperoglou C., Bourenne J., Farnarier C., Banzet N., Demerlé C., Gainnier M., Vély F. Imbalance of circulating innate lymphoid cell subpopulations in patients with septic shock. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2179. doi: 10.3389/fimmu.2019.02179.
3. Cosma C.L., Humbert O., Sherman D.R., Ramakrishnan L. Trafficking of superinfecting Mycobacterium organisms into established granulomas occurs in mammals and is independent of the Erp and ESX-1 mycobacterial virulence loci. *J. Infect. Dis.*, 2008, Vol. 198, no. 12, pp. 1851-1855.

4. Geraldes L., Morgado J., Almeida A., Todo-Bom A., Santos P., Paiva A., Cheira C., Pais M.L. Expression patterns of HLA-DR⁺ or HLA-DR⁻ on CD4⁺/CD25⁺⁺/CD127^{low} regulatory T cells in patients with allergy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 20, no. 3, pp. 201-209.
5. Gonzalez-Mancera M.S., Bolaños N.I., Salamanca M., Orjuela G.A., Rodriguez A.N., Gonzalez J.M. Percentages of CD4⁺CD8⁺ double-positive T lymphocytes in the peripheral blood of adults from a blood bank in Bogotá. *Turk. J. Haematol.*, 2020, Vol. 37, no. 1, pp. 36-41.
6. Jagatia H., Tsolaki A.G. The role of complement system and the immune response to tuberculosis infection. *Medicina (Kaunas)*, 2021, Vol. 57, no. 2, 84. doi: 10.3390/medicina57020084.
7. Maphasa R.E., Meyer M., Dube A. The macrophage response to Mycobacterium tuberculosis and opportunities for autophagy inducing nanomedicines for tuberculosis therapy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2021, Vol. 10, 618414. doi: 10.3389/fcimb.2020.618414.
8. Millar J.A., Butler J.R., Evans S., Mattila J.T., Linderman J.J., Flynn J.L., Kirschner D.E. Spatial organization and recruitment of non-specific T cells may limit T cell-macrophage interactions within Mycobacterium tuberculosis granulomas. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 11, 613638. doi: 10.3389/fimmu.2020.613638.
9. Morrison H., McShane H. Local pulmonary immunological biomarkers in tuberculosis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 640916. doi: 10.3389/fimmu.2021.640916.
10. Pagán A.J., Ramakrishnan L. Immunity and immunopathology in the tuberculous granuloma. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2014, Vol. 5, no. 9, a018499. doi: 10.1101/cshperspect.a018499.
11. Patankar Y.R., Sutiwisesak R., Boyce S., Lai R., Lindestam Arlehamn C.S., Sette A., Behar S.M. Limited recognition of Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages by polyclonal CD4 and CD8 T cells from the lungs of infected mice. *Mucosal Immunol.*, 2020, Vol. 13, no. 1, pp. 140-148.
12. Ruggiero S.M., Pilvankar M.R., Versypt A.N.F. Mathematical modeling of tuberculosis granuloma activation. *Processes*, 2017, Vol. 5, no. 4, 79. doi: 10.3390/pr5040079.
13. Villegas-Valverde C.A., Kokuina E., Breff-Fonseca M.C. Estimating normal values of rare T-lymphocyte populations in peripheral blood of healthy Cuban adults. *Medic Rev.*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 20-26.

Автор:

Бердюгина О.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник
лаборатории иммунологии воспаления
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

Author:

Berdyugina O.V., PhD, MD (Biology), Leading Research
Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute
of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian
Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 11.05.2021
Принята к печати 16.06.2021

Received 11.05.2021
Accepted 16.06.2021

ЦИТОКИНО-НЕЙРОЭНДОКРИННАЯ СИГНАТУРА ПЕРИФЕРИИ В КОНТЕКСТЕ ФЕНОМЕНА «УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ» ПРИ РАССТРОЙСТВАХ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА И ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Филиппова Ю.Ю., Бурмистрова А.Л.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Резюме. В настоящее время сегрегация расстройств аутистического спектра и расстройств шизофренического спектра у детей затруднена, т.к. в основном опирается на поведение и симптоматические характеристики, которые имеют высокую общность между этими расстройствами. Ранее нами показано, что показатели иммунной и нейроэндокринной систем, объединенные в цитокино-нейроэндокринную сигнатуру, могут отражать клинические фенотипы расстройств аутистического и шизофренического спектров. Кроме того, рядом исследователей у персон с шизофренией был обнаружен феномен «ускоренного старения», который включает в качестве основных симптомов недостаточность когнитивных и исполнительных функций. В настоящей работе представлены результаты поиска биологических маркеров феномена «ускоренного старения» у детей с расстройствами аутистического и шизофренического спектров. Цель: оценить возможность использования цитокино-нейроэндокринной сигнатуры для биологической индикации феномена «ускоренного старения» у детей с расстройствами аутистического и шизофренического спектров, для дифференциальной диагностики этих расстройств.

У 82 детей с аутизмом, 9 детей с шизофренией, 45 типично развивающихся детей, 25 людей репродуктивного возраста и 39 лиц пожилого возраста была проведена оценка 13 показателей, включенных в цитокино-нейроэндокринную сигнатуру: цитокинов (IL-6, IL-1 β , IFN γ , TNF α , IL-10, IL-4) и нейрорегуляторов (окситоцина, дофамина, адреналина, норадреналина, кортизола адренокортикотропного гормона и серотонина), в плазме крови методом иммуноферментного анализа. Для получения вариантов цитокино-нейроэндокринной сигнатуры, отражающих диагностические категории: «расстройство аутистического спектра», «расстройство шизофренического спектра», «здоровая старость», применяли метод нелинейных главных компонент по алгоритму CATPCA.

Вариант цитокино-нейроэндокринной сигнатуры «здоровая старость» презентовал классический феномен, реферируемый как «иммунное старение», представленный провоспалительными цитокинами старости – IL-6, IL-1 β , IFN γ . Только вариант сигнатуры «расстройство шизофренического спектра», в отличие от всех других вариантов сигнатуры, демонстрировал высокую общность с вариантом «здоровая старость» (отличия по 2 показателям из 13) – ниже уровни IL-1 β и IFN γ , на фоне равного по величине показателя «цитокина геронтологов» – IL-6. Таким образом, оценка цитокино-нейроэн-

Адрес для переписки:

Филиппова Юлия Юрьевна
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»
454001 Россия, г. Челябинск,
ул. Братьев Кашириных, 129.
Тел.: 8 (351) 799-71-76.
E-mail: julse@rambler.ru

Address for correspondence:

Filippova Yuliya Yu.
Chelyabinsk State University
454001, Russian Federation, Chelyabinsk, Bratiev
Kashirinykh str., 129.
Phone: 7 (351) 799-71-76.
E-mail: julse@rambler.ru

Образец цитирования:

Ю.Ю. Филиппова, А.Л. Бурмистрова «Цитокино-нейроэндокринная сигнатура периферии в контексте феномена «ускоренного старения» при расстройствах аутистического спектра и шизофренического спектра» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 249-256.
doi: 10.46235/1028-7221-988-CNP

© Филиппова Ю.Ю., Бурмистрова А.Л., 2021

For citation:

Yu. Yu. Filippova, A. L. Burmistrova "Cytokine-neuroendocrine peripheral signature in the context of the "accelerated ageing" phenomenon in autism spectrum and schizophrenia spectrum disorders", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 249-256.
doi: 10.46235/1028-7221-988-CNP

DOI: 10.46235/1028-7221-988-CNP

докринной сигнатуры может быть использована для дискриминации расстройств аутистического и шизофренического спектров, в том числе в предиктивной диагностике детей с аутизмом, что позволит выделить группу детей с последующей (в более позднем возрасте) конверсией в шизофрению.

Ключевые слова: цитокины, нейрогормоны, феномен ускоренного старения, дифференциальная диагностика, расстройства аутистического спектра, расстройства шизофренического спектра

CYTOKINE-NEUROENDOCRINE PERIPHERAL SIGNATURE IN THE CONTEXT OF THE “ACCELERATED AGEING” PHENOMENON IN AUTISM SPECTRUM AND SCHIZOPHRENIA SPECTRUM DISORDERS

Filippova Yu.Yu., Burmistrova A.L.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Currently, differentiation between autism spectrum disorders and schizophrenia spectrum disorders in children is a difficult task, because it relies mainly on behavioral and symptomatic characteristics, since these disorders are highly similar. We have previously demonstrated that peripheral indexes of immune and neuroendocrine systems, which we combined into cytokine-neuroendocrine signature, may reflect distinct clinical phenotypes of autism and schizophrenia spectrum disorders. Moreover, a number of researchers discovered the “accelerated ageing” phenomenon in the persons with schizophrenia, which includes deficiencies of cognitive functions and performance as the main symptoms. Here we carried out a search for biological markers of the “accelerated ageing” phenomenon in children with autistic conditions and schizophrenia spectrum disorders. Our aim was to assess the opportunity of applying the cytokine-neuroendocrine signature as biological evidence of “accelerated ageing” phenomenon in children with autism and schizophrenia spectrum disorders, which could be potentially useful for differential diagnosis of these disorders.

Thirteen parameters of the cytokine-neuroendocrine signature were assessed in blood plasma using ELISA method in 82 children with autism, 9 children with schizophrenia, 45 normally developing children, 25 subjects in their reproductive age, and 39 elderly persons: cytokines (IL-6, IL-1 β , IFN γ , TNF α , IL-10, IL-4) and neurohormones (oxytocin, dopamine, adrenaline, noradrenaline, adrenocorticotrophic hormone, cortisol, and serotonin). The nonlinear principal component analysis (CATPCA algorithm) was used to assess the variants of cytokine-neuroendocrine signature for different diagnostic categories, i.e., “autism spectrum disorders”, “schizophrenia spectrum disorders”, and “healthy ageing”.

The “healthy ageing” variant of cytokine-neuroendocrine signature presented a classic phenomenon, referred to as immune senescence presented by pro-inflammatory age-related cytokines – IL-6, IL-1 β , IFN γ . Only the “schizophrenia spectrum disorders” variant of the cytokine-neuroendocrine signature, unlike all the other signature variants, demonstrated high-level similarity with the “healthy ageing” variant (differing in 2 out of 13 indexes): lower levels of IL-1 β and IFN γ , at the same level of IL-6 “gerontological cytokine” index.

Evaluation of the cytokine-neuroendocrine signature can be used for differentiation between autistic disorders and schizophrenia spectrum disorders, including predictive diagnostics in children with autism, thus enabling group selection of children at risk for later conversion to schizophrenia.

Keywords: cytokines, neurohormones, accelerated ageing, differential diagnosis, autism spectrum disorders, schizophrenia spectrum disorders

Введение

В настоящее время представлен большой пакет доказательств, что социальное познание и социальное поведение находятся под регуляторным контролем мультифункциональной двунаправленной коммуникации иммунной (ее перифери-

ческого компартмента) и центральной нервной систем. Эти системы используют сигнальные молекулы общего пользования, высокой информационной емкости: цитокины, хемокины, нейропептиды, нейротрансмиттеры и т.д., что позволяет периферической иммунной системе

активировать функции мозга, а мозгу – посылать на периферию сигналы-указания для модификации иммунитета в контексте своих нужд [4, 12].

Наше понимание нейрофизиологических нарушений поведения, таких как расстройства аутистического спектра (РАС), расстройства шизофренического спектра (РШС) и ряда других, запаздывает по сравнению с другими областями медицины. Диагностика таких расстройств затруднена, т.к. опирается в основном на поведение и симптоматические характеристики, прежде всего симптомы социальной недостаточности и нарушений коммуникации [6]. РАС и РШС относятся к нарушениям нейроразвития неизвестной этиологии, с общими факторами риска, в том числе генетическими, и схожими клиническими фенотипами с гетерогенными наборами симптомов, из которых многие стоят на границе между нормальными и патологическими вариациями [2, 10]. Основные отличия между ними характеризуются манифестацией при РШС «позитивных» психопатических черт в возрасте позднего подростка или после 20 лет: галлюцинации, бред, грубая дезорганизация поведения (выраженная ментальная задержка) и речи, на фоне общих с РАС «негативных» черт [3, 10]. Однако значительная пропорция детей с диагнозом РАС в последующем демонстрирует симптомы РШС, в том числе слуховые и зрительные галлюцинации, подобно больным с острым психозом при шизофрении, со степенью конверсии 34,5% [1, 15].

Ранее нами показано, что вариации в коммуникации иммунной системы и мозга могут проявлять свои эффекты через периферические молекулярные сигналы – цитокино-нейроэндокринную (ЦНЭ) сигнатуру. ЦНЭ сигнатура включала показатели цитокиновой и нейроэндокринной систем и связей между ними. Модификации сигнатуры отражали клинические фенотипы РАС и РШС [1].

На основании полученных нами результатов о практически полном сходстве вариантов ЦНЭ сигнатуры РАС-шизотип и РШС, мы обратили внимание на один из дискуссионных вопросов, касающийся феномена «ускоренного старения», который наблюдается у многих/части персон с шизофренией, но не у детей с РАС. Биологический феномен «ускоренного старения» демонстрирует в качестве основных симптомов недостаточность когнитивных и исполнительных функций, презентуемых в ходе здорового старения организма. Однако, в отличие от последнего, феномен «ускоренного старения» у персон с шизофренией стартует начиная с двадцатипятилетнего возраста [8]. Данный биологический феномен инициировал широкую дискуссию, ка-

сающуюся ряда свойств, презентуемых при шизофрении: возраста манифестации психопатических симптомов (которые нередко появляются у детей с РАС), включая степень тяжести характерных симптомов; траектории развития, характера воспалительного потенциала, ассоциированного с данным феноменом [3, 8].

Опираясь на предыдущий опыт, мы использовали ЦНЭ сигнатуру для индикации варианта, ассоциированного с недостаточностью когнитивных и исполнительных функций в контексте здорового старения, реферируемого как «ускоренное старение», который может быть применен в качестве биологического показателя в сегрегации РАС и РШС. С этой целью мы провели сравнительный анализ вариантов ЦНЭ сигнатуры ТРД, РАС-тип, РАС-шизотип, РШС с вариантами «репродуктивный возраст» и «здоровая старость».

Материалы и методы

В исследование включены 136 детей: 82 ребенка (64 мальчика и 18 девочек, средний возраст 6 лет) с РАС – группы «РАС-тип» и «РАС-шизотип»; 9 детей с шизофренией (5 мальчиков и 4 девочки, средний возраст 15 лет) – группа «РШС», 45 типично развивающихся детей (ТРД, 32 мальчика и 13 девочек, средний возраст 9 лет) – группа «ТРД»; 25 людей репродуктивного возраста (16 мужчин и 9 женщин, средний возраст 39 лет) – доноры ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови» – группа «Репродуктивный возраст»; 39 людей старческого возраста (16 мужчин и 24 женщины, средний возраст 79 лет) без выраженных когнитивных нарушений – группа «здоровая старость». Всеми участниками исследования или их законными представителями были подписаны информированные согласия.

Концентрацию цитокинов: IL-6, IL-1 β , IFN γ , TNF α , IL-10, IL-4 (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск); нейрогормонов: окситоцина (Peninsula Laboratories International, США), дофамина, адреналина, норадреналина, серотонина (IBL International, Германия), кортизола (ООО «Хема», Россия) и адренкортикотропного гормона (АКТГ, Biomerica, Германия) определяли в плазме крови методом иммуноферментного анализа [1].

Сравнительный анализ показателей проводили с использованием критерия Краскела–Уоллеса с апостериорными парными сравнениями Коновера–Инмана. Для получения вариантов ЦНЭ сигнатуры, отражающих диагностические категории РАС, РШС, «репродуктивный возраст», «здоровая старость» применяли метод нелинейных главных компонент по алгоритму САТРСА. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Все расчеты и графические построения

выполнены в пакетах SPSS for Windows v. 18.0 и KyPlot v. 5.0.3.

Результаты и обсуждение

Кровь представляет периферический поток огромной информационной емкости, созданный в ходе эволюции, отражающий фило- и онтогенез видовых систем, предназначенный для целого организма – метаорганизма (состоящего из клеток эукариот и прокариот), сегрегация которого проходит на уровне клетки, ткани, органа, системы, и ответ на него – на локальном и системном уровнях. Ответы такого рода базируются на общности молекулярного языка информационных сигналов, систем их восприятия, процессирования и коллегиальных решений, вовлеченных в тканевое ремоделирование (в том числе скульптурирование мозга) [4, 11, 17].

В последние 10 лет достигнуто понимание механизмов коммуникации двух комплексных систем – иммунной и центральной нервной, в контексте высокой значимости Т-лимфоцитов, аутореактивных к антигенам мозга собственного организма, которые поступают по путям коммуникации (входят в дренажные пути мозга) к определенным нишам мозга [11, 12, 17]. Исследователи предполагают, что патологии, ассоциированные с когнитивной недостаточностью, возможно, связаны с количественной и функциональной мальадаптивностью аутореактивных Т-лимфоцитов – когнитивных промоторов. Речь идет не только о РАС и РШС, для которых характерны изменения когнитивных способностей и гомеостаза иммунной системы, но и процессе старения. Многочисленные наблюдения констатируют связь старения с увеличенной чувствительностью к нейродегенеративным заболеваниям в контексте «иммунного старения», ассоциированного со снижением количества и функций аутореактивных Т-лимфоцитов, изменением их репертуара и хоминга [5, 12, 16]. Но если говорить о здоровом старении, то для него характерен эффект «реконструкции», т.е. презентации модифицированных механизмов, обеспечивающих новый уровень иммунного гомеостаза в старом возрасте [16]. Именно такая группа пожилых персон (79 лет) участвовала в исследовании по индикации феномена «ускоренного старения».

Анализ сравнений показателей, включенных в периферическую ЦНЭ сигнатуру, состоял из 3 этапов (представлены только статистически значимые отличия):

1. Поиск различий показателей групп детей: РАС-тип, РАС-шизотип, РШС, ТРД, от показателей группы «репродуктивный возраст»: РАС-тип – высокие значения цитокинов – про-

воспалительного IL-1 β и противовоспалительного IL-10, а также нейрогормонов – дофамина, кортизола, АКТГ, на фоне низких значений адреналина. РАС-шизотип – высокие концентрации IL-6, IFN γ и противовоспалительного – IL-10 на фоне низких TNF α , IL-4 и моноаминов – дофамина и адреналина. РШС – уровни цитокинов и нейрогормонов, вошедших в ЦНЭ-сигнатуру, полностью совпадают со значениями показателей группы РАС-шизотип и презентуют аналогичные различия по отношению к группе «репродуктивный возраст». ТРД – высокие уровни цитокинов IL-1 β , IL-10 и нейрогормонов – кортизола, АКТГ, серотонина, при низких концентрациях IL-4 и адреналина.

2. Распределение отличий цитокино-нейроиммунных показателей в плазме крови группы «здоровая старость» в сравнении с группой «репродуктивный возраст»: группа «здоровая старость» презентует высокие уровни провоспалительных цитокинов – IL-6, IL-1 β , IFN γ , противовоспалительного IL-10, в ассоциации с низким уровнем IL-4. Нейрогормоны – кортизол и серотонин повышены, моноамины – дофамин и адреналин снижены.

3. Оценка различий периферических уровней цитокинов и нейрогормонов между группами РАС-тип, РАС-шизотип, РШС, ТРД и группой «здоровая старость»: РАС-тип – низкие концентрации цитокинов – IL-6, IL-1 β , IFN γ , на фоне высоких уровней TNF α IL-10, дофамина и АКТГ. РАС-шизотип – низкие концентрации цитокинов: IL-6, IL-1 β , IFN γ и нейрогормонов – адреналина, серотонина, кортизола. РШС – значимые отличия только по 2 показателям из 13 – низкие уровни IL-1 β и IFN γ . ТРД – низкие концентрации IL-6, IL-1 β , IFN γ и серотонина, высокие – TNF α IL-10, а также дофамина, что практически полностью совпадает со значениями показателей группы РАС-тип.

Модификация ЦНЭ сигнатуры в контексте диагностических категорий: РАС-тип, РАС-шизотип, РШС, ТРД, «репродуктивный возраст» и «здоровая старость» была оценена с помощью многомерного эксплораторного анализа методом нелинейных главных компонент (рис. 1).

В результате анализа было выделено 5 паттернов взаимосвязанных показателей – главных компонент (ГК), которые объясняли 64,0% общей дисперсии показателей. Однофакторный дисперсионный анализ выявил статистически значимые различия в ЦНЭ сигнатуре (по ГК 1 и ГК 2) в контексте диагностических категорий, что позволило говорить о ее вариантах (рис. 1).

Как видно из рисунка 1, показатели, вошедшие в ГК 1, четко разделены на 2 кластера, противопоставленные друг другу. Первый кластер

(отрицательные корреляции, область отрицательных значений оси X) включает показатели и связи между симпато-адреномедуллярной осью (САМ-осью, адреналин, дофамин), гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой осью (ГГН-осью, АКТГ) и провоспалительным цитокином – TNF α .

Второй кластер (положительные корреляции, область положительных значений оси X) образуют только два цитокина: IL-6 и IFN γ , в нем пол-

ностью отсутствуют корреляции между показателями цитокиновой и нейроэндокринной систем (рис. 1).

Все показатели, вошедшие в ГК 2, формируют один кластер (положительные корреляции, область положительных значений оси Y), в который включены показатели и связи между провоспалительными цитокинами – IL-1 β , IFN γ и нейроморонами – кортизолом и серотонином (рис. 1).

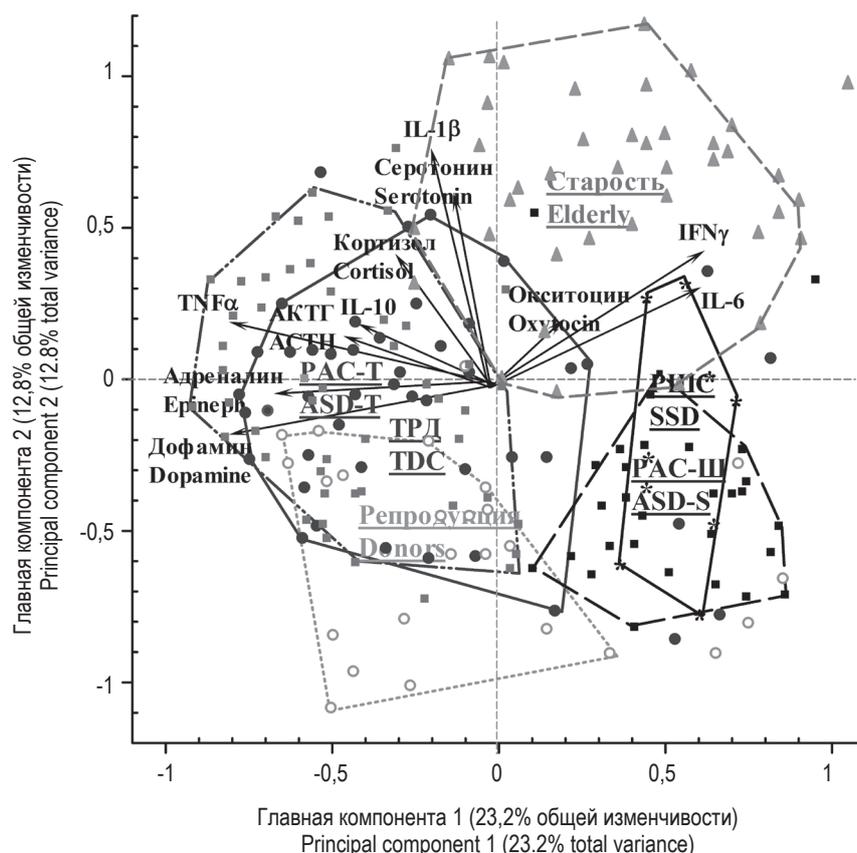


Рисунок 1. Ординационная диаграмма взаимодействия цитокиновой и нейроэндокринной систем у детей с РАС, РШС, ТРД, людей репродуктивного и пожилого возраста

Примечание. Показатели, внесшие наибольший вклад в ГК1 и ГК2, показаны векторами. Расположение каждого человека в пространстве двух ГК для группы ТРД показано серыми кругами, для группы РАС-тип – серыми квадратами, группы РАС-шизотип – черными квадратами, группы РШС – звездочками, группы «репродуктивный возраст» – белыми кругами, «здоровая старость» – треугольниками. Полигонами выделены области, в которые входят: дети, относящиеся к группе ТРД – серая непрерывная линия, РАС-тип – серая прерывистая линия (штрих-точка), РАС-шизотип – черная пунктирная линия, РШС – черная непрерывная линия, «репродуктивный возраст» – светло-серая прерывистая линия (точки), группы «здоровое старение» – серая пунктирная линия.

Figure 1. Ordination diagram of the interaction of cytokine and neuroendocrine systems in children with ASD, SSD, TDC, people of reproductive and elderly age

Note. The figure is plotted based on all indicators included in PC 1 (X axis) and PC 2 (Y axis). The indicators that contributed most to PC 1 and PC 2 are shown by vectors. The larger the vector length, the greater the contribution of this indicator in the PC. The location of each person in the space of two PC for the TDC is shown by grey circles, ASD-type, by grey squares; ASD-schizotype, by black squares; SSD, by asterisks; reproductive age (called Donors), by white circles, and healthy ageing, by triangles. Polygons highlight areas which include: TDC, grey continuous line; ASD-type, grey intermittent line (dash-dot); ASD-schizotype, black dashed line; SSD, black continuous line; reproductive age, light grey intermittent line (dots), and healthy ageing, grey dashed line.

Разделение показателей, полученное в результате анализа, отражало различные варианты сигнатуры: варианты ЦНЭ сигнатуры детей (6-15 лет): ТРД, РАС-тип, РАС-шизотип и РШС отличались от варианта «репродуктивный возраст» (39 лет) высокими уровнями IL-10 и низкими — адреналина и образовывали, в зависимости от сходства и различий от варианта «репродуктивный возраст», два кластера.

Один кластер (включал ТРД и РАС-тип) демонстрировал высокое сходство с вариантом «репродуктивный возраст» — провоспалительный потенциал — незначительно выше, а нейроэндокринный свидетельствовал о более выраженной активности ГГН-оси, чем САМ-оси. Что касается высоко значимых связей, то варианты ЦНЭ сигнатуры демонстрировали высокую связанность показателей внутри и между системами по сравнению с вариантом «репродуктивный возраст», в связи с присущей этой возрастной категории конгруэнтности в коммуникации иммунной и нейроэндокринной систем, в отличие от детского возраста (ТРД-9 лет, РАС-тип — 6 лет), для которого характерна эмоционально-физиологическая лабильность, ассоциированная с процессами научения, в т.ч. социальной коммуникации и адаптации.

Другой кластер включал варианты ЦНЭ сигнатуры — РАС-шизотип (6 лет) и РШС (15 лет), которые (несмотря на разницу в возрасте детей) демонстрировали полное сходство между собой по набору и величинам показателей, отличающих их от варианта ЦНЭ сигнатуры «репродуктивный возраст» (39 лет). Провоспалительный потенциал данного кластера находился на «пограничном уровне» в контексте про/противовоспалительного баланса (величины показателей IL-6 и IFN γ выше, при высоком IL-10 и низких TNF α и IL-4), и оценить его патофизиологическую значимость в клинических фенотипах детей, входящих в этот кластер, представляется сложной задачей, т.к. динамичные комбинации цитокинов несут различную «смысловую нагрузку» в конгруэнтных ситуациях. Результаты многих работ по презентации провоспалительного потенциала цитокинов на периферии при РАС и РШС носят противоречивый характер [12]. Нейроэндокринная составляющая демонстрировала низкую концентрацию катехоламинов на фоне одинаковой с вариантом сигнатуры «репродуктивный возраст» активностью ГГН-оси. Значимость корреляционных связей внутри и между системами была невысокой. Совершенно очевидно, что низкие уровни дофамина и адреналина оказывают негативные эффекты на функциональную активность мозга, в частности на обучение и память. Известно, что практически все клетки периферической им-

мунной системы экспрессируют широкий ранг рецепторов для нейротрансмиттеров САМ-оси, через которые способны влиять на продукцию и секрецию воспалительных медиаторов, более того, через ауторегуляцию, т.к. являются продуцентами многих из них. Так, например, дофамин способен индуцировать селективную секрецию Т-лимфоцитами либо TNF α , либо IL-10, в зависимости от специфических дофаминовых рецепторов на клетках. Авторы отмечают, что феномен двойного действия на Т-лимфоциты определяется уровнем их активности — дофамин активирует отдыхающие клетки, но супрессирует преактивированные другими молекулами лимфоциты [12, 17].

Для решения вопроса о возможности использования ЦНЭ сигнатуры в качестве биологической индикативной единицы сравнения вариантов сигнатуры РШС, РАС-шизотип и РАС-тип в контексте презентации феномена «ускоренное старение» мы сопоставили варианты сигнатуры «здоровая старость» и «репродуктивный возраст». Вариант сигнатуры «здоровая старость» продемонстрировал классический феномен, реферируемый как «иммуносенесценция», презентуемый «триумвиратом» классических провоспалительных цитокинов старения — IL-6, IL-1 β и IFN γ . Возникнув на периферии, он несет свой негативный потенциал к мозгу, вызывая дезорганизацию процессов обучения, памяти, нервной пластичности и нейрогенеза, активацию его клеток к продукции и секреции провоспалительных медиаторов, участвующих в последующей реактивации систем стресс-ответа — ГГН-оси и САМ-оси [17], активность которых могут сдерживать IL-10 и кортизол [4, 9, 17]. Кроме того, при здоровом старении можно отметить преобладание активности ГГН-оси над симпато-адреномедулярной системой, дезорганизацию последней, что находится в соответствии с распространенной концепцией [4, 7, 9, 17].

Следующие значимые результаты продемонстрировали, что в отличие от всех вариантов ЦНЭ сигнатуры — ТРД, РАС-тип, РАС-шизотип и «репродуктивный возраст», только вариант РШС демонстрирует высокую общность с вариантом «здоровая старость» (отличие по 2 показателям из 13). Для него характерен менее выраженный провоспалительный потенциал по показателям (IL-1 β и IFN γ) на фоне равного по величине показателя «цитокина для геронтологов» — IL-6 [13], и взаимосвязям (значимые отсутствуют). Такие отличия, возможно, свидетельствуют о различной природе провоспалительных цитокинов, находящихся в циркуляции и способных оказывать негативное влияние на процессы коммуникации иммунной и центральной нервной систем. Так,

особую значимость (в ремоделировании цитокиновой продукции) в ходе старения организма приобретают разнообразные комплексы накапливающихся стареющих клеток, обладающих мощными секреторными способностями — секретируют сотни факторов, в том числе провоспалительные цитокины (особенно IL-1 β , IL-6, IFN γ) [14].

Выводы

Таким образом, мы предполагаем, что вариант ЦНЭ сигнатуры РШС несет модификацию, ассоциированную с недостаточностью когнитивных и исполнительных функций в контексте здорового старения, реферируемого как феномен «ускоренного старения». Кроме того, в ходе работы показано, что вариант ЦНЭ сигнатуры РАС-шизотип, хотя и полностью схож с вариантом

РШС, но демонстрирует выраженные отличия по отношению к варианту ЦНЭ сигнатуры «здоровая старость». Возможно, это свидетельствует об отсроченных по возрасту «положительных» симптомах РШС у детей, демонстрирующих вариант ЦНЭ сигнатуры РАС-шизотип, т.к. они еще не достигли возраста подростка (6 лет).

В заключение мы подтверждаем, что оценка ЦНЭ сигнатуры позволяет провести дискриминацию между диагнозами РАС и РШС, т.к. только вариант ЦНЭ сигнатуры РШС из всех изученных нами, презентует модификацию, характеризующую феномен «ускоренного старения» в контексте здоровой старости. Кроме того, считаем возможным использовать ЦНЭ сигнатуру в предиктивной диагностике детей с РАС, что позволит выделить группу детей с последующей (в более старшем возрасте) конверсией в РШС.

Список литературы / References

1. Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю. Конгруэнтность и фенотипическая пластичность иммунной и нервной систем у детей с расстройствами аутистического спектра в сравнении с расстройствами шизофренического спектра // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 703-716. [Burmistrova A.L., Filippova Yu.Yu. Congruency and phenotypic plasticity of immune and nervous systems in children with autism spectrum disorders compared to schizophrenia spectrum disorders. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 703-716. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625 -CAP-1968.
2. Barlati S., Deste G. Autism spectrum disorder and schizophrenia: do they overlap? *Int. J. Emerg. Ment. Health*, 2016, Vol. 18, no. 1, pp. 760-763.
3. Caspi A., Reichenberg A., Weiser M., Rabinowitz J., Kaplan Z., Knobler H., Davidson-Sagi N., Davidson M. Cognitive performance in schizophrenia patients assessed before and following the first psychotic episode. *Schizophr. Res.*, 2003, Vol. 65, no. 2-3, pp. 87-94.
4. Del Rey A., Besedovsky H.O. Immune-neuro-endocrine reflexes, circuits, and networks: physiologic and evolutionary implications. *Front. Horm. Res.*, 2017, Vol. 48, pp. 1-18.
5. Franceschi C., Salvioli S., Garagnani P., de Eguileor M., Monti D., Capri M. Immunobiography and the heterogeneity of immune responses in the elderly: a focus on inflammaging and trained immunity. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 982. doi: 10.3389/fimmu.2017.00982.
6. Gandal M.J., Zhang P., Hadjimichael E., Walker R.L., Chen C., Liu S., Won H., van Bakel H., Varghese M., Wang Y., Shieh A.W., Haney J., Parhami S., Belmont J., Kim M., Moran Losada P., Khan Z., Mleczko J., Xia Y., Dai R., Wang D., Yang Y.T., Xu M., Fish K., Hof P.R., Warrell J., Fitzgerald D., White K., Jaffe A.E., PsychENCODE Consortium, Peters M.A., Gerstein M., Liu C., Iakoucheva L.M., Pinto D., Geschwind D.H. Transcriptome-wide isoform-level dysregulation in ASD, schizophrenia, and bipolar disorder. *Science*, 2018, Vol. 362, no. 6420, eaat8127. doi: 10.1126/science.aat8127.
7. Gupta D., Morley J.E. Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging. *Compr. Physiol.*, 2014, Vol. 4, no. 4, pp. 1495-1510.
8. Harvey P.D., Rosenthal J.B. Cognitive and functional deficits in people with schizophrenia: evidence for accelerated or exaggerated aging? *Schizophr. Res.*, 2018, Vol. 196, pp. 14-21.
9. Heffner K.L. Neuroendocrine effects of stress on immunity in the elderly: implications for inflammatory disease. *Immunol. Allergy Clin. North. Am.*, 2011, Vol. 31, no. 1, pp. 95-108.
10. Hommer R.E., Swedo S.E. Schizophrenia and autism-related disorders. *Schizophr. Bull.*, 2015, Vol. 41, no. 2, pp. 313-314.
11. Kelley K.W., McCusker R.H. Getting nervous about immunity. *Semin. Immunol.*, 2014, Vol. 26, no. 5, pp. 389-393.
12. Kipnis J., Gadani S., Derecki N.C. Pro-cognitive properties of T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 9, pp. 663-669.
13. Krabbe K.S., Pedersen M., Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp. Gerontol.*, 2004, Vol. 39, no. 5, pp. 687-699.

14. McHugh D., Gil J. Senescence and aging: causes, consequences, and therapeutic avenues. *J. Cell. Biol.*, 2018, Vol. 217, no. 1, pp. 65-77.
15. Mouridsen S.E., Rich B., Isager T. Psychiatric disorders in adults diagnosed as children with atypical autism. A case control study. *J. Neural. Transm.*, 2008, Vol. 115, no. 1, pp. 135-138.
16. Vallejo A.N., Mueller R.G., Hamel D.L. Jr., Way A., Dvergsten J.A., Griffin P., Newman A.B. Expansions of NK-like $\alpha\beta$ T cells with chronologic aging: novel lymphocyte effectors that compensate for functional deficits of conventional NK cells and T cells. *Ageing Res. Rev.*, 2011, Vol. 10, no. 3, pp. 354-361.
17. Yirmiya R., Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav. Immun.*, 2011, Vol. 25, no. 2, pp. 181-213.

Авторы:

Филиппова Ю.Ю. — к.б.н., доцент, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Бурмистрова А.Л. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Filippova Yu. Yu., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation.

Burmistrova A.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 16.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 16.06.2021

АНТИЦИТОКИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ И СПОСОБНОСТЬ К ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ СТАФИЛОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СЕКРЕТА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У МУЖЧИН С СИМПТОМАМИ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Пашина О.А., Морозова Н.В.

ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Резюме. Для того чтобы микроорганизмы состоялись в качестве возбудителей инфекционно-воспалительного заболевания, они должны обладать патогенным потенциалом, каркас которого формируют факторы персистенции, обеспечивающие их защиту от разных эффекторов иммунитета организма хозяина. Ряд микроорганизмов может обладать антицитокиновой активностью (АЦА), в то же время установлено, что микроорганизмы могут синтезировать цитокиноподобные вещества, т.е. фактически проявлять цитокиновую активность. Цель исследования состояла в установлении наличия цитокиноподобных веществ и антицитокиновой активности у штаммов стафилококков, выделенных из секрета предстательной железы у мужчин с симптомами урогенитальной инфекции.

В эксперименте использованы 24 клинических изолята стафилококков разных видов, выделенных из секрета предстательной железы у мужчин с симптомами урогенитальной инфекции. Изучение способности стафилококков вызывать изменение концентрации IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и TNF α проводили путем соинкубирования взвеси бактерий в физиологическом растворе с раствором цитокинов в соотношении 1:1 (опытные пробы). В качестве контроля использовали раствор цитокинов, внесенный в физиологический раствор. Определение концентрации цитокинов в опытных и контрольных пробах проводили иммуноферментным методом. Антицитокиновую активность (АЦА) выражали в процентах (%) инактивации цитокинов в опыте по сравнению с контролем, цитокиновую активность – в % продукции цитокинов в опыте по сравнению с контролем.

У изученных стафилококков установлена антицитокиновая активность в отношении IL-4 и IL-10, и способность продуцировать IL-6 и TNF α . Вместе с тем среди стафилококков встречались штаммы как проявляющие антицитокиновую активность в отношении IL-8, так и продуцирующие данный цитокин.

У стафилококков разных видов, выделенных из секрета предстательной железы у мужчин с симптомами урогенитальной инфекции, установлено наличие антицитокиновой активности и способности к продукции цитокинов причем их продукция (наличие и уровень) характеризуется внутривидовой

Адрес для переписки:

*Карташова Ольга Львовна
ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» Уральского отделения Российской академии наук
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11.
Тел.: 8 (353) 277-44-63.
E-mail: labpersist@mail.ru*

Address for correspondence:

*Kartashova Olga L.
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch,
Russian Academy of Sciences
460000, Russian Federation, Orenburg, Pionerskaya str., 11.
Phone: 7 (353) 277-44-63.
E-mail: labpersist@mail.ru*

Образец цитирования:

*О.Л. Карташова, Т.М. Пашкова, О.А. Пашина, Н.В. Морозова «Антицитокиновая активность и способность к продукции цитокиноподобных веществ стафилококков, выделенных из секрета предстательной железы у мужчин с симптомами урогенитальной инфекции» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 257-260.
doi: 10.46235/1028-7221-995-AAA*

© Карташова О.Л. и соавт., 2021

For citation:

*O.L. Kartashova, T.M. Pashkova, O.A. Pashinina, N.V. Morozova "Anticytokine activity and the ability to produce cytokine-like substances of staphylococci isolated from the prostatic secretions in men with symptoms of urogenital infection", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 257-260.
doi: 10.46235/1028-7221-995-AAA
DOI: 10.46235/1028-7221-995-AAA*

вариабельностью. Наиболее активными продуцентами цитокинов среди изученных изолятов явились *S. xylosum*, у которых отмечена также самая высокая антицитокиновая активность в отношении IL-4.

Ключевые слова: цитокиноподобные вещества, антицитокиновая активность, стафилококки, урогенитальные инфекции

ANTICYTOKINE ACTIVITY AND THE ABILITY TO PRODUCE CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES OF STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM THE PROSTATIC SECRETIONS IN MEN WITH SYMPTOMS OF UROGENITAL INFECTION

Kartashova O.L., Pashkova T.M., Pashinina O.A., Morozova N.V.

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Abstract. To be causal agents for infectious and inflammatory diseases, the microorganisms should have a pathogenic potential, the framework of which is based on persistence factors that ensure their protection from various effectors of the host's immunity. There is evidence that some microorganisms can have anti-cytokine activity (ACA), and at the same time, many microorganisms many synthesize cytokine-like substances, thus, in fact, exhibit cytokine activity. The aim of the present study was to establish the presence of cytokine-like substances and anti-cytokine activity in Staphylococcus strains isolated from prostate secretions in men with symptoms of urogenital infection. This study involved 24 clinical isolates of different Staphylococci types isolated from the prostate gland secretions in men with symptoms of urogenital infection. Ability of staphylococci to cause changes in the IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF α contents was carried out by co-incubating bacteria suspended in normal saline solution together with cytokine solutions, at a ratio of 1:1 (experimental samples). As a control, a solution of cytokines supplemented by normal saline was used. Concentration of cytokines in experimental and control samples was determined by enzyme immunoassay. Anti-cytokine activity (ACA) was expressed as a percentage (%) of cytokine inactivation in experimental mixtures compared to the controls, cytokine activity, as % of cytokine production in the experimental samples compared to the control.

The studied staphylococci showed anti-cytokine activity against IL-4 and IL-10, and exhibited ability to produce IL-6 and TNF. At the same time, among staphylococci, there were strains both showing anti-cytokine activity against IL-8, and producing this cytokine.

Among different staphylococcal species isolated from prostate secretions in men with symptoms of urogenital infection, the presence of anti-cytokine activity and the ability to produce cytokines was detected; their production (presence and level) was characterized by intraspecific variability. *S. xylosum* proved to be the most active cytokine producer, which also have the highest anti-cytokine activity against IL-4.

Keywords: cytokine-like substances, anticytokine activity, staphylococci, urogenital infections

Введение

Для того чтобы микроорганизмы состоялись в качестве возбудителей инфекционно-воспалительного заболевания, они должны обладать патогенным потенциалом, каркас которого формируют факторы персистенции, обеспечивающие их защиту от разных эффекторов иммунитета организма хозяина [1]. Имеются данные о том, что ряд микроорганизмов может обладать антицитокиновой активностью (АЦА), которая проявляется снижением концентрации ряда рекомбинантных цитокинов при их соинкубировании с супернатантами суточных культур бактерий [2, 7]. В то же время недавно экспериментально установлено, что как грамположительные, так и

грамотрицательные бактерии могут синтезировать ряд цитокинов (цитокиноподобные вещества – ЦПВ) [4, 8], т.е. фактически проявлять цитокиновую активность.

Цель исследования – установить наличие цитокиноподобных веществ и антицитокиновой активности у штаммов стафилококков, выделенных из секрета предстательной железы у мужчин с симптомами урогенитальной инфекции.

Материалы и методы

В опытах использовали 24 клинических изолята стафилококков разных видов: *Staphylococcus intermedius*, *S. gallinarum*, *S. epidermidis*, *S. xylosum*, выделенных из секрета предстательной железы

у мужчин с симптомами урогенитальной инфекции. Изучение способности микроорганизмов вызывать изменение концентрации ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и TNF α проводили путем соинкубирования взвеси бактерий в физиологическом растворе (БАК-5) с раствором цитокинов в соотношении 1:1 (опытные пробы). В качестве контроля использовали раствор цитокинов, внесенный в физиологический раствор. Конечная концентрация цитокинов в опытных и контрольных пробах составляла для ИЛ-4 – 20 пг/мл, ИЛ-6 – 50 пг/мл, ИЛ-8 – 50 пг/мл, ИЛ-10 – 50 пг/мл, TNF α – 25 пг/мл.

Опытные и контрольные пробы инкубировали в течение 2 часов (37 °С), реакцию останавливали на холоде, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин (+4 °С) и отбирали супернатант. Определение концентрации цитокинов в опытных и контрольных пробах проводили иммуноферментным анализом с использованием реагентов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург), учет результатов проводили на фотометре StatFax 2100 (США) при длине волны 450 нм. Антицитокиновую активность (АЦА) выражали в процентах (%) инактивации цитокинов в опыте по сравнению с контролем, цитокиновую активность – в % продукции цитокинов в опыте по сравнению с контролем.

Данные обработаны методами вариационной статистики [6].

Результаты и обсуждение

У изученных стафилококков установлена антицитокиновая активность в отношении ИЛ-4 и ИЛ-10 и способность продуцировать ИЛ-6 и TNF. Вместе с тем среди стафилококков встречались штаммы как проявляющие антицитокиновую активность в отношении ИЛ-8, так и продуцирующие данный цитокин.

По 2 штамма (33,3%) *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. xylosus* и все исследованные *S. gallinarum* характеризовались антицитокиновой активностью в отношении ИЛ-4, с уровнем выраженности признака равным 6,4; 6,8; 14,1; 5,6% соответственно.

Из 24 штаммов стафилококков 23 (95,8%) обладали АЦА в отношении ИЛ-10, уровень ее выраженности составил 34,4% у *S. intermedius*, 31,4% у *S. gallinarum*, 40% у *S. epidermidis* и 33,4% у *S. xylosus*, причем один штамм, относящийся к данному виду, продуцировал ИЛ-10.

Все штаммы *S. epidermidis* и по 2 штамма *S. intermedius* и *S. gallinarum* инактивировали ИЛ-8, средний уровень выраженности признака составил 9,5; 6,9; 5,03% соответственно. По 4 штамма *S. intermedius* и *S. xylosus*, не обладающие антицитокиновой активностью в отношении ИЛ-8, продуцировали данный цитокин (уровень признака 7,6 и 22,6%).

Установлено, что все штаммы *S. gallinarum* и *S. xylosus*, использованные в работе, обладали способностью к продукции ИЛ-6, тогда как у *S. intermedius* антицитокиновая активность в отношении ИЛ-6 отмечена в 33,3% случаев, а у *S. epidermidis* – в 50% случаев. При этом значения признака были максимальными у *S. xylosus* (17,0%) и снижались в ряду *S. gallinarum* (13,1%), *S. intermedius* (8,8%), *S. epidermidis* (5,2%).

Цитокиновая активность в отношении фактора некроза опухолей зарегистрирована у *S. gallinarum* и *S. xylosus* в 100% случаев со средним значением признака, равным 24,8% и 70,0%, у *S. intermedius* – в 66,7% случаев, среднее значение уровня выраженности составило 79,6%, у штаммов *S. epidermidis* признак не обнаружен.

Заключение

Установлено наличие антицитокиновой активности и способности к продукции цитокинов у стафилококков разных видов, выделенных из секрета предстательной железы у мужчин с симптомами урогенитальной инфекции, причем их продукция (наличие и уровень) характеризуется внутривидовой вариабельностью. Наиболее активными продуцентами цитокинов являются *S. xylosus*, у которых отмечена также самая высокая антицитокиновая активность в отношении ИЛ-4. Полученные данные представляют несомненный интерес, поскольку рядом исследователей обсуждается возможное патогенетическое значение продукции ЦПВ бактериями [5]. С другой стороны, высокий уровень антицитокиновой активности свидетельствует о возможном влиянии экзометаболитов стафилококков на локальный цитокиновый баланс, что поддерживает воспалительный процесс [3]. Дальнейшие исследования цитокиновой и антицитокиновой активностей у штаммов стафилококков, выделенных из секрета предстательной железы мужчин с симптомами урогенитальной инфекции, позволят выявить информативные параметры, пригодные для оценки степени тяжести заболевания.

Список литературы / References

1. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина; Екатеринбург: УрО РАН, 1999. 366 с. [Bukharin O.V. Persistence of pathogenic bacteria]. Moscow: Meditsina; Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 1999. 366 p.

2. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Никифоров И.А., Бондаренко Т.А. Иммунорегуляторные свойства метаболитов бифидобактерий при эубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2015. № 4. С. 89-96. [Bukharin O.V., Ivanova E.V., Perunova N.B., Chainikova I.N., Nikiforov I.A., Bondarenko T.A. Immunoregulatory properties of metabolites of bifidobacteria in eubiosis and dysbiosis of the human large intestine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, no. 4, pp. 89-96. (In Russ.)]

3. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Иванова Е.В., Смолягин А.И. Антицитокиновая активность микроорганизмов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2011. № 4. С. 56-61. [Bukharin O.V., Perunova N.B., Chainikova I.N., Ivanova E.V., Smolyagin A.I. Anticytokine activity of microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, no. 4, pp. 56-61. (In Russ.)]

4. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. Бактерии как продуценты цитокино-подобных веществ // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 3. С. 374-376. [Zurochka A.V., Dukardt V.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Tyapaeva Ya.V., Gritsenko V.A. Bacteria as producers of cytokine-like substances. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 3, pp. 374-376. (In Russ.)]

5. Зурочка В.А., Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. Оценка уровней цитокиноподобных веществ в супернатантах культур бактерий // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19. № 5. С. 45. [Zurochka V.A., Zurochka A.V., Dukart V.V., Zueva E.B., Dobrynina M.A., Tyapaeva Ya.V., Gritsenko V.A. Assessment of the levels of cytokine-like substances in the supernatants of bacterial cultures. *Meditsinskaya immunologiya = Medical immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 5, p. 45. (In Russ.)]

6. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с. [Lakin G.F. Biometrics]. Moscow: Higher School, 1990. 352 p.

7. Сычева М.В., Пашкова Т.М., Карташова О.Л., Пашинина О.А., Попова Л.П. Характеристика антицитокиновой активности энтерококков // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2015. № 3. С. 1-6 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-3/Articles/SMV-2015-3.pdf>. [Sycheva M.V., Pashkova T.M., Kartashova O.L., Pashinina O.A., Popova L.P. Characterization of the anticytokine activity of enterococci. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2015, Vol. 3, pp. 1-6. [Electronic resource]. Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-3/Articles/SMV-2015-3.pdf>.

8. 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, № 3. С. 460-465. [Fomina L.O., Fayzullina A.I., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Symbircev 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, no. 3, pp. 460-465. (In Russ.)]

Авторы:

Карташова О.Л. — д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Пашкова Т.М. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Пашинина О.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Морозова Н.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Authors:

Kartashova O.L., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Persistence and Symbiosis of Microorganisms, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Pashkova T.M., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Persistence and Symbiosis of Microorganisms, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Pashinina O.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Persistence and Symbiosis of Microorganisms, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Morozova N.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Persistence and Symbiosis of Microorganisms, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 17.06.2021

ДИНАМИКА КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ВУЛЬВОВАГИНАЛЬНЫМ КАНДИДОЗОМ НА ФОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЙ КАВИТИРОВАННЫМ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ РАСТВОРОМ

Сорокин Ю.А.¹, Гизингер О.А.²

¹ Центр репродуктивного здоровья АО Группа компаний «Медси», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Резюме. Дисфункции факторов колонизационной резистентности слизистых оболочек мочеполовой системы на фоне адгезии грибами рода *Candida* – распространенная патогенетическая ситуация, приводящая к нарушению процессов регенерации слизистых оболочек, неудачным попыткам ЭКО, повышает риск осложнений гестационного процесса. Цель исследования – на основании анализа прооксидантных, антиоксидантных факторов, статуса клеточных факторов врожденного иммунитета слизистых оболочек мочеполовой системы обосновать возможность комплексной терапии хронического вульвовагинального кандидоза с помощью воздействий кавитированным физиологическим раствором и использованием альфа-2b человеческим рекомбинантным интерфероном α в суппозиториях (Виферон[®], ООО «ФЕРОН», (Россия). В исследовании приняло участие 90 женщин с клиническими и лабораторно подтвержденными признаками вульвовагинального кандидоза в возрасте $25,45 \pm 7,16$ лет, рецидивы заболевания наблюдались в среднем $5,55 \pm 0,45$ раза. Группу 1 составили 30 женщин, средний возраст $27,11 \pm 1,52$ года, проводилась терапия препаратом Флуконазол по 150 мг 1 раз в 7 дней. Группу 2 составили 30 женщин с инфицированием слизистых оболочек *C. albicans*, средний возраст $27,31 \pm 1,99$ года, лечение включало Флуконазол 150 мг 1 раз в 7 дней и 5 минутное орошение влажной ультразвуковым физиологическим раствором, 7 дней с использованием аппаратного комплекса Фотек АК100-25, частота ультразвуковых колебаний 25 кГц (г. Екатеринбург, Россия). Группу 3 составили 30 женщин лечение состояло из препарата Флуконазол 150 мг 1 раз в 7 дней, орошения слизистых оболочек ультразвуковым кавитированным раствором с последующим введением суппозитория Виферон[®] 500 000 МЕ, 1 раз в сутки 7 дней. Биохимические исследования включали определение изопропанол- и гептан-растворимых первичных, вторичных, конечных продуктов

Адрес для переписки:

Гизингер Оксана Анатольевна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
117049, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8.
Тел.: 8 (919) 319-46-04.
E-mail: OGizinger@gmail.com

Address for correspondence:

Gizinger Oksana A.
Peoples' Friendship University of Russia
117049, Russian Federation, Moscow,
Miklukho-Maclay str., 8.
Phone: 7 (919) 319-46-04.
E-mail: OGizinger@gmail.com

Образец цитирования:

Ю.А. Сорокин, О.А. Гизингер «Динамика клеточных факторов врожденного иммунитета и антиоксидантной защиты у пациентов с хроническим рецидивирующим вульвовагинальным кандидозом на фоне воздействий кавитированным физиологическим раствором» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 261-268.
doi: 10.46235/1028-7221-1000-DOC

© Сорокин Ю.А., Гизингер О.А., 2021

For citation:

Yu.A. Sorokin, O.A. Gizinger "Dynamics of cellular factors of innate immunity and antioxidant protection in the patients with chronic recurrent vulvovaginal candidosis upon exposure to cavitated physiological solution", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 261-268.
doi: 10.46235/1028-7221-1000-DOC
DOI: 10.46235/1028-7221-1000-DOC

перекисного окисления липидов. Активность антиоксидантной системы изучена по показателям: супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, церулоплазмина, витамина С качественные и количественные характеристики нейтрофильных гранулоцитов вагинального секрета проанализированы, в тестах определения фагоцитарной активности, восстановления соединения нитросинего тетразолия в диформазан. Изучение цитокинов IL-8, TNF α , IL-2, IL-10, проводилось в бесклеточных супернатантах вагинального секрета методом ИФА, тест-системы (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). На фоне применения низкочастотной ультразвуковой кавитации в сочетании с антиоксидантным препаратом происходит снижение концентрации провоспалительных цитокинов, восстанавливается баланс в системе перекисное окисление липидов-антиоксидантная защита, нормализуется функционально-метаболический статус фагоцитов вагинального секрета

Ключевые слова: антиоксиданты, Candida, кавитация, цитокины

DYNAMICS OF CELLULAR FACTORS OF INNATE IMMUNITY AND ANTIOXIDANT PROTECTION IN THE PATIENTS WITH CHRONIC RECURRENT VULVOVAGINAL CANDIDOSIS UPON EXPOSURE TO CAVITATED PHYSIOLOGICAL SOLUTION

Sorokin Yu.A.^a, Gizinger O.A.^b

^a Center for Reproductive Health, MEDSI. "Medsi" Group, Moscow, Russian Federation

^b Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. Dysfunction of colonization resistance factors at the mucous membranes of genitourinary system during adhesion of *Candida* fungi is a common pathogenic situation leading to impairment of the mucous membrane regeneration, unsuccessful attempts at in vitro fertilization (IVF), increased risk of complications during gestation. The aim of present study was to substantiate the opportunity of complex therapy for chronic vulvovaginal candidiasis using cavitated saline and usage suppositories with alpha-2b human recombinant interferon α (Viferon LLC, Russia). The study involved 90 women at the age of 25.45 ± 7.16 years, with clinically and laboratory confirmed recurrences of chronic vulvovaginal candidiasis observed, on average, 5.55 ± 0.45 times. Group 1 consisted of 30 women with *C. albicans* infection of urogenital tract, at the mean age of 27.11 ± 1.52 years, who received therapy with fluconazole (150 mg once every 7 days). Group 2 consisted of 30 women with *C. albicans* infection of mucous membranes, mean age 27.31 ± 1.99 years, treated with Fluconazole (150 mg 1 time in 7 days, and 5-min. irrigation of vagina with ultrasonicated saline solution, 7 days; Low-intensity ultrasound exposure was performed using the Fotek AK100-25 hardware complex, ultrasonic vibration frequency of 25 kHz (Yekaterinburg, Russia). Group 3 consisted of 30 women whose treatment included Fluconazole (150 mg once every 6 days), irrigation of mucous membranes with ultrasonicated cavitated solution and subsequent administration of suppositories containing Viferon[®] 500,000 IU (1 suppository daily for 7 days). Biochemical studies included determination of isopropanol- and heptane-soluble primary, secondary end products of lipid peroxidation. Activity of the antioxidant system was studied by determination of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, ceruloplasmin, vitamin C. Qualitative and quantitative characteristics of neutrophilic granulocytes from vaginal secretions were evaluated by testing phagocytic activity, reduction of nitroblue tetrazolium compound to diformazan. The studies of IL-8, TNF α , IL-2, and IL-10 cytokines were carried out in cell-free supernates of vaginal secretions by ELISA test systems (LLC "Vector Best", Novosibirsk). Results: upon therapeutic exposure to low-frequency ultrasonic cavitation combined with antioxidant drug, we have observed a decreased local concentration of pro-inflammatory cytokines, the balance of lipid peroxidation-antioxidant defense system was restored, and functional metabolic status of the phagocytes in vaginal secretions was normalized.

Keywords: antioxidants, Candida, cavitation, cytokines

Введение

Дисфункции факторов колонизационной резистентности слизистых оболочек мочеполовой системы на фоне адгезии грибами рода *Candida* — распространенная эпидемиологической и патогенетической ситуацией. Частота осложнений, связанных с нарушением процессов регенерации слизистых оболочек на фоне колонизации грибами рода *Candida* остается высокой, демонстрируя ежегодный экспонентный прирост новых случаев вульвовагинального кандидоза [4]. Причинами нарушения баланса в системе «Макроорганизм — условный патоген» являются снижение способности слизистых оболочек к регенерации, нарушение клеточных факторов врожденной антимикробной защиты, дефицит интерферонов I типа, оксидативный стресс. Кроме того, на фоне иммунного дисбаланса, нарушения факторов прооксидантной и антиоксидантных систем, колонизация слизистых грибами рода *Candida* в концентрации КОЕ 10^6 - 10^7 приводят к формированию биопленок с измененным качественным и количественным составом микроорганизмов при нарушенных дисбиотических отношениях. Клинически, вышеописанная ситуация выражается в рецидивировании и хронизации, в патогенезе которой именно прооксиданты играют ключевую роль в балансе между воспалительными и супрессивными механизмами. Модулирующий механизм антиоксидантов в этом случае заключается в способности антиоксидантов регулировать взаимодействие клеток, участвующих в иммунном ответе, усиливая экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости класса I, активации макрофагов, дендритных и НК-клеток [5]. Новые данные о роли и особенностях прооксидантных факторов в патогенезе, хронизации, количестве и длительности рецидивов и, соответственно, новые подходы к лечению данного заболевания пока мало систематизированы, ряд из них требует уточнения. Сложность лечения вульвовагинального кандидоза состоит в том, что большинство применяемых методов его терапии имеет невысокую эффективность по причине роста резистентности к этиотропным препаратам, усилению дисбаланса в системе «перекисное окисление липидов (ПОЛ)-антиоксидантная система (АОС)». Подходы к лечению с учетом патогенетических изменений с применением средств этиотропной и патогенетической терапии давно и успешно применяются в гинекологии, но при этом необходимо обосновать клинико-иммуно-

логическую эффективность метода, проанализировать результаты лечения их влияние на баланс факторов антиоксидантной защиты, способность ликвидировать избыток прооксидантных компонентов на поверхности слизистых оболочек. Методом комплексной терапии является орошение слизистых оболочек влагалища и шейки матки кавитированным физиологическим раствором и дополнительное введение антиоксидантного компонента [1]. Такой подход научно обоснован, поскольку доказана активность компонентов неферментативной АОС: глутатиона, α -токоферола, аскорбата, обладающих выраженной способностью к снижению скорости генерации свободных радикалов при окислительном стрессе на фоне хронических заболеваний. В основе антиоксидантных свойств аскорбата лежит одноэлектронный циклический переход между дигидро-, монодегидро, дегидроаскорбатными формами, что создает предпосылки для повышения колонизационной резистентности слизистых оболочек за счет прооксидантных эффектов аскорбата [4].

Цель настоящего исследования — на основании анализа прооксидантных, антиоксидантных факторов, статуса клеточных факторов врожденного иммунитета слизистых оболочек мочеполовой системы обосновать возможность комплексной терапии хронического вульвовагинального кандидоза с помощью воздействий кавитированным физиологическим раствором и использованием альфа-2b человеческим рекомбинантным интерфероном α в суппозиториях.

Материалы и методы

Настоящее исследование проведено в поликлиническом отделении Центра репродуктивного здоровья ОА «МЕДСИ» (Москва, Солянка, 12, строение 1). В исследовании на основании добровольного информированного согласия приняло участие 90 женщин с клиническими и лабораторно подтвержденными признаками хронического вульвовагинального кандидоза в возрасте $25,45 \pm 7,16$ лет, рецидивы заболевания наблюдались от 4 до 7 раз в год, в среднем $5,55 \pm 0,45$ раза. Диагноз поставлен в соответствии с классификатором МКБ-10, код диагноза В 37.3 — воспалительное заболевание, обусловленное дрожжеподобными грибами рода *Candida*, с наличием 4 и более эпизодов в течение года. В зависимости от метода лечения 90 женщин без соматической патологии, не использовавшие до начала лечения гормональную и иммунотерапию, имеющие кан-

дидозную инфекцию, обусловленную наличием во влагалище преимущественно грибов *Candida*, преимущественно *Candida albicans* (95%), были рандомизированы на 3 основных группы. Группу 1 составили 30 женщин с инфицированием урогенитального тракта *C. albicans*, средний возраст $27,11 \pm 1,52$ года, которым проводилась терапия препаратом флуконазол по 150 мг 1 раз в 7 дней. Группу 2 составили 30 женщин с инфицированием слизистых оболочек *C. albicans*, средний возраст $27,31 \pm 1,99$ года, лечение включало Флуконазол 150 мг 1 раз в 7 дней, 5-минутное орошение влагалища ультразвуковым физиологическим раствором, нагретым до 37°C 7 дней, которое проводили в специально оборудованном кабинете с соблюдением правил техники безопасности с использованием аппаратного комплекса Фотек АК100-25, частота ультразвуковых колебаний 25 кГц (г. Екатеринбург, Россия). Механизм проведения лечебной процедуры ультразвуковой кавитационной терапии заключался во введении во влагалище ультразвукового инструмента с внутренним ирригационным каналом малого диаметра в защитном кожухе. Группу 3 составили 30 женщин, лечение которых включало Флуконазол 150 мг 1 раз в 7 дней, орошение слизистых оболочек ультразвуковым кавитированным раствором и введение суппозитория рекомбинантного интерферона $\alpha 2\text{в}$ с антиоксидантами (Виферон®) 1 000 000 МЕ, 1 раз в сутки 7 дней. Клинико-иммунологическое и микробиологическое исследование проводили всем пациенткам до начала и после проводимого лечения, наличие *C. albicans* в изучаемом материале подтверждено результатами микроскопических и микологических исследований, выполненных путем посевов отделяемого на среду Сабуро с идентификацией микроорганизмов методом МАСС-спектрометрии (MALDI-TOF) и определением чувствительности к антимикотическим препаратам. Биохимические исследования проводили экстракционно-спектрофотометрическим методом с определением изопропанол- и гептан-растворимых первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Активность антиоксидантной системы (АОС) была изучена по показателям: супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, церулоплазмина, витамина С в вагинальном секрете спектрофотометрическим методом, содержание цитокинов проведено в ООО «Лаборатория "Гемотест"» (сертификат соответствия требованиям ГОСТ Р ИСО 9001-2015, ГОСТ Р ИСО 15189-2015). Качественные и количественные характеристики нейтрофильных гра-

нулоцитов (преобладающей клеточной популяции) вагинального секрета были изучены в тестах определения фагоцитарной активности, кислородзависимого метаболизма по восстановлению соединения нитросинего тетразолия в диформазан [2]. Цитокиновый профиль анализ IL-8, TNF α , IL-2, IL-10, изучение цитокинов проводилось в бесклеточных супернатантах вагинального секрета методом ИФА с использованием тест-систем (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), полученные результаты выражали в пг/мл. Всем участникам исследования проведен забор вагинального секрета в первую фазу цикла, стерильными одноразовыми пипетками. Для проведения иммунологических и биохимических исследований материал забирали в пробирки с ЭДТА.

Результаты и обсуждение

До начала терапии у женщин с хроническим вульвовагинальным кандидозом выявлены нарушения клеточных факторов локальной антимикробной защиты: увеличение количества нейтрофильных гранулоцитов в вагинальном секрете со снижением их фагоцитарной активности и нарушением кислородзависимого метаболизма. Биохимическое исследование системы ПОЛ включало в себя изучение системы перекисного окисления липидов по анализу изопропанол- и гептан-растворимых первичных, вторичных и конечных продуктов липидного экстракта вагинального секрета, активность антиоксидантной системы изучена по показателям: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, церулоплазмина, витамина С в вагинальном секрете (табл. 1).

Применение кавитированного физиологического раствора и последующее внутривагинальное введение антиоксиданта привело к снижению повышенного до начала лечения количества нейтрофильных гранулоцитов в вагинальном секрете, нормализации их фагоцитарной активности и восстановлению кислородзависимого метаболизма, $p_{1-3} < 0,05$; $p_{2-3} < 0,05$, регистрируемого в тесте восстановления нитросинего тетразолия, что характеризует высокую эффективность сочетанного локального применения ультразвуковой кавитационной терапии и терапии с использованием антиоксидантного комплекса и рекомбинантного интерферона α в коррекции локальных дисфункций нейтрофильных гранулоцитов у женщин с хроническим вульвовагинальным кандидозом. Исследование изопропанол- и гептан-растворимых первичных, вторичных и конечных

продуктов липидного экстракта вагинального секрета до начала лечения показало превышение содержания всех фракций липидного экстракта вагинального секрета и нормализацию в группе, где пациентки получали комплексную терапию $p_{1-3} < 0,05$; $p_{2-3} < 0,05$. В ходе терапевтических мероприятий на фоне нормализации показателей ПОЛ зарегистрировано восстановление активности фермента супероксиддисмутазы.

Выводы

Таким образом, комплексная терапия у пациентов группы 3 приводит к восстановлению компонентов ПОЛ и факторов антиоксидантной системы слизистых оболочек мочеполовой системы.

На фоне применения низкочастотной ультразвуковой кавитации в сочетании с введением

ТАБЛИЦА 1. ФАКТОРЫ АНТИМИКРОБНОЙ ЗАЩИТЫ, ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ, АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ, СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В ВАГИНАЛЬНОМ СЕКРЕТЕ ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМ РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ВУЛЬВОВАГИНАЛЬНЫМ КАНДИДОЗОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМАХ ТЕРАПИИ

TABLE 1. FACTORS OF ANTIMICROBIAL PROTECTION, LIPID PEROXIDATION, ANTIOXIDANT SYSTEM, BALANCE OF CYTOKINES IN THE VAGINAL SECRETIONS OF WOMEN WITH CHRONIC RECURRENT VULVOVAGINAL CANDIDIASIS UNDER VARIOUS TREATMENT REGIMENS

Врожденные факторы антимикробной защиты, факторы антиоксидантной системы, содержание цитокинов в бесклеточных супернатантах вагинального секрета Antimicrobial defense factors, antioxidant system factors, vaginal secretion cytokine content	Группа 1 Пациентки с хроническим вульвовагинальным кандидозом (базисная терапия) Group 1 Patients with chronic vulvovaginal candidiasis (basic therapy) n = 30		Группа 2 Пациентки с хроническим вульвовагинальным кандидозом (орошение ультразвуковым физиологическим раствором) Group 2 Patients with chronic vulvovaginal candidiasis (irrigation with ultrasonic saline) n = 30		Группа 3 Пациентки с хроническим вульвовагинальным кандидозом (орошение ультразвуковым физиологическим раствором + антиоксидант) Group 3 Patients with chronic vulvovaginal candidiasis (irrigation with ultrasonic saline) n = 30	
	1-й день лечения 1 st day of treatment	7-й день лечения 7 th day of treatment	1-й день лечения 1 st day of treatment	7-й день лечения 7 th day of treatment	1-й день лечения 1 st day of treatment	7-й день лечения 7 th day of treatment
Абсолютное количество нейтрофильных гранулоцитов (10^9) Absolute number of neutrophilic granulocytes, % (10^9)	9,34±1,22	5,45±0,95	10,01±0,48	4,22±1,02	9,99±1,01	2,31±0,78
Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов, % Phagocytic activity of neutrophilic granulocytes, %	13,45±2,43	15,67±3,22	13,34±1,67	20,56±1,34	14,34±1,39	35,34±2,17
Активность нейтрофильных гранулоцитов в НСТ-тесте, % Activity of neutrophilic granulocytes in the NBT test, %	12,95±2,56	23,67±1,21	13,53±2,67	34,14±1,23	12,36±1,25	45,23±1,89

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Врожденные факторы антимикробной защиты, факторы антиоксидантной системы, содержание цитокинов в бесклеточных супернатантах вагинального секрета Antimicrobial defense factors, antioxidant system factors, vaginal secretion cytokine content	Группа 1 Пациентки с хроническим вульвовагинальным кандидозом (базисная терапия) Group 1 Patients with chronic vulvovaginal candidiasis (basic therapy) n = 30		Группа 2 Пациентки с хроническим вульвовагинальным кандидозом (орошение ультразвученным физиологическим раствором) Group 2 Patients with chronic vulvovaginal candidiasis (irrigation with ultrasonic saline) n = 30		Группа 3 Пациентки с хроническим вульвовагинальным кандидозом (орошение ультразвученным физиологическим раствором + антиоксидант) Group 3 Patients with chronic vulvovaginal candidiasis (irrigation with ultrasonic saline) n = 30	
	1-й день лечения 1 st day of treatment	7-й день лечения 7 th day of treatment	1-й день лечения 1 st day of treatment	7-й день лечения 7 th day of treatment	1-й день лечения 1 st day of treatment	7-й день лечения 7 th day of treatment
Интерлейкин-2, пг/мл Interleukin 2, pg/ml	2,15±0,23	3,98±0,45	1,09±0,18	1,99±0,32	2,03±0,16	3,99±0,11
Фактор некроза опухоли α, пг/мл TNFα, pg/ml	3,66±0,05	3,85±0,45	3,34±0,11	2,78±0,09	2,99±0,11	0,99±0,18
Интерлейкин-10, пг/мл Interleukin 10, pg/ml	2,89±1,12	5,67±1,01	1,45±1,17	2,34±1,45	2,09±1,34	7,12±1,02
Интерлейкин-8, пг/мл Interleukin 8, pg/ml	6,56±0,05	1,87±0,21	6,34±0,79	5,78±0,12	1,76±0,10	1,71±0,32
Супероксиддисмутаза, Ед/мл Superoxidedismutase, U/ml	123,05±10,11	263,90±10,43	118,00±10,98	153,90±10,56	255,90±10,23	253,88±10,76
Глутатионпероксидаз, нг/мл Glutathione, ng/ml	24,18±1,45	234,11±10,09	24,17±1,33	595,12±10,67	123,00±10,11	125,11±10,97
Церулоплазмин, нг/мл Ceruloplasmin, ng/ml	4,81±0,69	2,84±0,22	4,89±0,45	3,67±0,34	4,98±0,18	2,81±0,23
p	$p_{1-3} < 0,05$, $p_{2-3} < 0,05$, $p_{1-2} \geq 0,05$ (1-й день лечения / 1 st day of treatment) $p_{1-3} < 0,05$, $p_{2-3} < 0,05$, $p_{1-2} \geq 0,05$ (7-й день лечения / 7 th day of treatment)					

Примечание. p_{1-3} – достоверность различий показателей между группами пациентов пролеченных с использованием антимикотика, орошений кавитированным раствором и рекомбинантным интерфероном α с антиоксидантами до и после лечения и в сравнении с показателями группы пациентов, пролеченных по базисной методике на 7-й день терапии; p_{2-3} – достоверность различий показателей между группами пациентов пролеченных с использованием антимикотика, кавитированного раствора и показателями пациентов, пролеченных с использованием антимикотика, рекомбинантного интерферона α с антиоксидантами и кавитированного раствора, рассчитана по критерию Манна–Уитни, различия считаются достоверными и статистически значимыми при $p < 0,05$.

Note. p_{1-3} , reliability of the differences between the groups of patients treated with antimycotics, irrigation with cavitated solution and recombinant interferon α with antioxidants before and after treatment and in comparison with the indicators of the group of patients treated according to the basic method on the 7th day of therapy; p_{2-3} , the reliability of differences in indicators between groups of patients treated with antimycotic, cavitated solution and indicators of patients treated with an antimycotic, recombinant interferon α with antioxidants and a cavitated solution, calculated according to the Mann–Whitney criterion, the differences are considered reliable and statistically significant at $p < 0.05$.

суппозиторийев рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ с антиоксидантами (Виферон®) 1 000 000 МЕ происходит восстановление баланса цитокинов в системе Th1/Th2, в результате которого мы регистрируем снижение концентрации провоспалительных цитокинов, восстановление содержания интерлейкина 2, положительная динамика иммунных факторов связана с нормализацией клинической картины и стиханием активности воспалительной реакции на поверхности слизистых оболочек мочеполовой системы [3]. Эффективность использования кавитированных растворов в терапии воспалительных заболеваний мочеполовой системы, вызванных микроорганизмами, передающимися половым путем – научно доказанный факт. Выявленные позитивные

изменения основаны на эффектах низкочастотной ультразвуковой кавитации, и действию антиоксидантов, входящих в состав рекомбинантного IFN α с антиоксидантами, связанных с активацией окислительно-восстановительных процессов на поверхности мембран эпителиоцитов и фагоцитирующих клеток, приводящих к накоплению окислительного глутатиона, активацией ферментов, глюкозофосфатного шунта, повышению уровня глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы, накопление восстановленного НАДФ-Н, т.е. именно тех компонентов, которые нормализуют работу глутатионовой системы, восстанавливают НСТ-редуцирующую активность и метаболический потенциал нейтрофильных гранулоцитов.

Список литературы / References

1. Гизингер О.А., Москвин С.В., Шеметова М.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на изменения функциональной активности и скорости НАДФ-оксидазной реакции нейтрофилов периферической крови человека (экспериментальное исследование) // *Лазерная медицина*, 2016. Т. 20, № 1. С. 46-49. [Gizinger O.A., Moskvina S.V., Shemetova M.A. The effect of continuous low-intensity laser irradiation of the red spectrum on the changes in the functional activity and speed of NADPH-oxidase response of human peripheral blood neutrophils. *Lazernaya meditsina = Laser Medicine*, 2016, Vol. 20, no. 1, pp. 46-49.]
2. Долгушин И.И., Гизингер О.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы цервикального секрета у женщин с микоплазменной инфекцией // *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*, 2008. № 4. С. 29-31. [Dolgushin I.I., Gizinger O.A. Effect of low-intensity laser radiation on neutrophils from cervical discharge of women with mycoplasma infection. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizicheskoy kultury = Problems of Balneology, Physiotherapy and Physical Therapy*, 2008, Vol. 4, pp. 29-31.]
3. Akimoto-Gunther L., de Bonfim-Mendonça P.S., Takahachi G., Irie M.M.T., Miyamoto S., Consolaro M.E., Svidzinsk T.I. Highlights regarding host predisposing factors to recurrent vulvovaginal candidiasis: chronic stress and reduced antioxidant capacity. *PLoS One*, 2016, Vol. 14, no. 11 (7), e0158870. doi: 110.1371/journal.pone.0158870.
4. Denning D.W., Kneale M., Sobel J.D., Rautema-Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.*, 2018, Vol. 18, no. 11, pp. e339-e347.
5. Gonçalves B., Ferreira C., Alves C.T., Henriques M., Azeredo J., Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2016, Vol. 42, no. 6, pp. 905-927.

Авторы:

Сорокин Ю.А. – врач – акушер-гинеколог, руководитель Центра репродуктивного здоровья АО Группа компаний «Медси», Москва, Россия

Authors:

Sorokin Yu.A., Obstetrician-Gynecologist, Head, Center for Reproductive Health, "Medsi" Group, Moscow, Russian Federation

Гизингер О.А. — д.б.н., профессор кафедры
микробиологии и вирусологии Медицинского института
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
Москва, Россия

Gizinger O.A., PhD, MD (Biology), Professor, Department
of Microbiology and Virology, Medical Institute, Peoples'
Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 17.06.2021

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ В10-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Зиганшина М.М.¹, Хайдуков С.В.^{1,2}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. Актуальным трендом в исследованиях В-клеточного звена иммунной системы является изучение малых субпопуляций. Установлено, что минорная субпопуляция IL-10 продуцирующих В-клеток (В10-reg клетки) обладает свойствами ограничивать избыточные реакции врожденного и адаптивного иммунного ответа. Показан их регуляторный и патогенетический эффект при различных физиологических и патофизиологических состояниях, в частности при патологии беременности.

Вследствие низкого содержания В10-reg клеток в крови (до 1%) и сложностей визуализации данных проточной цитометрии, разработанный ранее метод, основанный на продолжительной стимуляции клеток периферической крови коктейлем факторов ((CD40L + CpG) и PMA), вызывающих активацию, пролиферацию и созревание клеток, позволяет визуализировать обогащенную фракцию В10-reg клеток (В10-клетки + про-В10-клетки), содержание которой превышает 5%. Целью данного исследования явилось получение стимулированной *ex vivo* популяции В10-клеток + про-В10-клеток из периферической крови пациенток с физиологической беременностью и разработка оптимальной стратегии гейтирования В10-reg клеток для их визуализации.

У пациенток с физиологической беременностью в III триместре осуществляли забор периферической крови. Проводилась стимуляция клеток по двум протоколам. Первый протокол: короткая (5 часов) стимуляция клеток цельной крови в стерильных условиях коктейлем PMA + иономицин + брефельдин А. Второй протокол: продолжительная (48 часов) стимуляция выделенной мононуклеарной фракции в стерильных условиях коктейлем (CD40L + CpG) с добавлением в последние 5 часов PMA + иономицин + брефельдин А. Проводилось окрашивание клеток на поверхностные маркеры (CD45, CD19, CD24, CD27, CD38) и внутриклеточное содержание IL-10. Анализ образцов выполняли на проточном цитометре Navios™.

Проведен пятицветный цитометрический анализ и разработана стратегия последовательного гейтирования, основанная на выделении гейта по лимфоцитам (маркер CD45); ограничении В-лимфоцитов (маркер CD19); выделении субпопуляции В-клеток, экспрессирующих маркер CD24; ограничении двух искомым субпопуляций В10-reg клеток по CD27 и CD38: CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺

Адрес для переписки:

Зиганшина Марина Михайловна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Акад. Опарина, 4.
Тел.: 8 (903) 105-97-46.
E-mail: mmz@mail.ru

Address for correspondence:

Ziganshina Marina M.
V. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology
117997, Russian Federation, Moscow, Acad. Oparin str., 4.
Phone: 7 (903) 105-97-46.
E-mail: mmz@mail.ru

Образец цитирования:

М.М. Зиганшина, С.В. Хайдуков «Визуализация В10-регуляторных клеток в периферической крови при физиологической беременности» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 269-274.
doi: 10.46235/1028-7221-1004-VOB

© Зиганшина М.М., Хайдуков С.В., 2021

For citation:

M.M. Ziganshina, S.V. Khaidukov "Visualization of B10 regulatory cells in peripheral blood in physiological pregnancy", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 269-274.
doi: 10.46235/1028-7221-1004-VOB

DOI: 10.46235/1028-7221-1004-VOB

и CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺. Стимуляция клеток по первому протоколу позволяет визуализировать до 1% обеих субпопуляций, по второму около – 10%. Метод открывает перспективы фундаментальных исследований B10-reg клеток при беременности. Детектируемые количества обогащенной популяции B10-reg клеток могут иметь диагностическое и прогностическое значение в клинике при идиопатических акушерских осложнениях.

Ключевые слова: B10-клетки, B-регуляторные клетки, стратегия гейтирования, проточная цитометрия, беременность

VISUALIZATION OF B10 REGULATORY CELLS IN PERIPHERAL BLOOD IN PHYSIOLOGICAL PREGNANCY

Ziganshina M.M.^a, Khaidukov S.V.^{a, b}

^a V. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

^b M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Research Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Abstract. Assessment of minor subpopulations is an actual trend in the studies of B cells. Minor subpopulations of IL-10 producing B-cells (B10-regs) is able to limit excessive reactions of innate and adaptive immune response. Their regulatory and pathogenetic effect is shown in different physiological and pathophysiological conditions, e.g., in pregnancy disorders.

Due to low contents of B-10 regs in peripheral blood (up to 1%) and difficulties of flow cytometric visualization, the previously developed technique based on continuous stimulation of blood cells with a cocktail of (CD40L + CpG) and PMA, causes activation, proliferation and maturation of the cells, thus allowing visualization of enriched B10-reg fraction (B10-cells + pro-B10-cells), which exceeds 5% of total. The aim of this study was to obtain the *ex vivo* stimulated (B10 + pro-B10) cells from peripheral blood of the patients with physiological pregnancy, and development of optimal B10 cell gating strategy for better visualization.

Peripheral blood was drawn in the patients with physiological pregnancy in the III trimester. The cells were stimulated by 2 protocols, as follows: (1) short (5 hours) cell stimulation of the whole blood cells under sterile conditions with (PMA + ionomycin + brefeldin A) cocktail; (2) continuous (48 hours) stimulation of isolated mononuclear fraction under sterile conditions with (CD40L+CpG) cocktail followed by supplementation with (PMA + ionomycin + brefeldin A) cocktail. Immunostaining of the cells was performed for surface markers (CD45, CD19, CD24, CD27, CD38) and intracellular IL-10 contents. Analysis of the samples was carried out at the Navios™ flow cytometer.

Five-colour cytometric analysis was performed, and a strategy of sequential gating was developed based on discrimination of the lymphocytic (CD45⁺) gate; limitation of B lymphocytes (CD19⁺); discrimination of CD24-expressing B-cell subpopulation; delimitation of two targeted B10-reg subpopulations for CD27 and CD38, i.e., CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ и CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺. Stimulation of the cells by first protocol allows to visualize up to 1% of the both subpopulations, by the second protocol, about 10%. This technique opens prospective for fundamental studies of B10-reg cells in pregnancy. Detectable amounts of enriched B10-reg cells may be of diagnostic and prognostic significance in idiopathic obstetric complications.

Keywords: B10-cells, B regulatory cells, gating strategy, flow cytometry, pregnancy

Исследование выполнено в рамках государственного задания № 116082210002.

Введение

Благодаря успешно развивающейся технологии производства моноклональных антител и возможностям проточной цитометрии в настоящее время визуализируются и определяются В-клетки различных стадий дифференцировки.

Традиционно наибольший интерес представляют субпопуляции В1, В2-клеток и В-клеток памяти. В последние годы, среди малых субпопуляций В-лимфоцитов особое внимание уделяется субпопуляции В-клеток участвующих в иммуномодуляции и супрессии иммунного ответа, которые, по аналогии с широко исследованными IL-10 продуцирующими В-клетками мыши, были названы «B10-регуляторные клетки» (B10-

reg клетки) [6]. В течение почти двух десятилетий их исследования, было описано множество фенотипов В10-reg клеток, которые различаются экспрессией различных маркеров [1, 11, 13], показана их ключевая регулирующая роль в подавлении реакций врожденного и адаптивного иммунного ответа, воспаления, аутоиммунных реакций и обосновано их участие в патогенезе при различных заболеваниях [9, 10, 12]. В частности, установлено значимое повышение числа В10-reg клетки при нормальной беременности; показана важная роль в развитии толерантности к плоду; выявлено их снижение при акушерской патологии [5, 7, 8].

Установлено, что основные места локализации В10-reg клеток – селезенка и лимфоидные ткани, ассоциированные с кишечником (лимфатические узлы брыжейки и брюшной полости). В периферической крови их содержание минимально по сравнению с другими тканями и биологическими жидкостями и составляет в среднем $0,8 \pm 0,1\%$ ($1,9 \pm 0,3 \times 10^{-3}$ клеток/мл) [2], что создает сложности в их визуализации и использовании в клинической диагностике.

Описанный ранее метод, основанный на последовательной стимуляции В-клеток периферической крови коктейлем (CD40L + CpG) и РМА позволяет визуализировать дополнительно субпопуляцию прогениторных В-клеток (про-В-клетки), которые активируются, пролиферируют и «дозревают» в присутствии вышеуказанных факторов и становятся функционально компетентными В10-reg клетками [3]. Метод позволяет визуализировать от 5% (В10-клеток + про-В10-клеток), что значительно превышает количество исходно присутствующих в крови В10-reg клеток (до 1%) и может использоваться в отдельных случаях для диагностических целей.

Вследствие методологических сложностей в визуализации и оценке минорной субпопуляции В10-reg клеток в периферической крови целью данного исследования явилось получение стимулированной *ex vivo* популяции В10-клеток + про-В10-клеток из периферической крови пациенток с физиологической беременностью и разработка стратегии гейтирования В10-reg клеток для их визуализации.

Материалы и методы

У пациенток с физиологической беременностью ($n = 3$) был произведен забор периферической крови по стандартной процедуре. Проводилась стимуляция клеток двумя способами в соответствии с [3]. Первый способ включал стимуляцию клеток цельной крови в стерильных условиях при 37°C в лунках 24-луночного планшета (Nunc, Дания) с использованием Cell

Stimulation Cocktail (eBioscience, США), содержащий РМА и иономицин, а также брэфельдин А (Sigma, США). Во втором способе было предусмотрено выделение из крови мононуклеарной фракции в стерильных условиях с использованием Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, США) в соответствии со стандартной методикой. Мононуклеарная фракция в среде RPMI, содержащей 10% фетальной сыворотки, 2 ммоль/л глутамина и 80 мкг/мл гентамицина, помещалась в лунки 24-луночного планшета в концентрации 2×10^6 клеток/лунку, и проводилась стимуляция клеток коктейлем CD40L (R&D Systems, США) + CpG (Invivogen, США) в течение 48 часов при 37°C . За 5 часов до окончания инкубации в лунку добавляли Cell Stimulation Cocktail (eBioscience, США), содержащий РМА и иономицин, а также брэфельдин А (Sigma, США) в соответствии с методикой, описанной в [3] и инструкцией используемых реагентов. По окончании времени инкубации клетки, стимулированные способом 1 и способом 2 отмывались окрашивающим буфером (BD Pharmingen, США) и добавлялись конъюгированные мышиные моноклональные антитела ((мкАТ), BD Pharmingen, США) к кластерам дифференцировки человека в сочетаниях: а) анти-CD45-ECD мкАТ + анти-CD19-FITC мкАТ + анти-CD24-PerCP-Cy5.5 мкАТ + анти-CD27-APC мкАТ (вариант А); б) анти-CD45-ECD мкАТ + анти-CD19-FITC мкАТ + анти-CD24-PerCP-Cy5.5 мкАТ + анти-CD38-APC мкАТ (вариант Б) и проводилась инкубация ($+4^\circ\text{C}$, 30 мин). По истечении времени инкубации клетки отмывались дважды и проводилась фиксация и пермеабилзация клеток с использованием Fixation and Permeabilization Solution Kit (BD Pharmingen, США) и дальнейшим окрашиванием на внутриклеточное содержание IL-10 с использованием анти-IL-10-PE мкАТ (BioLegend, США), в соответствии с инструкцией используемых реагентов. Исследование В10-reg клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США).

Результаты и обсуждение

С помощью цитометрического анализа были визуализированы две субпопуляции функционально активных В10-reg клеток, которые по данным литературы выявляются и имеют патогенетическое значение у пациентов с акушерскими и репродуктивными проблемами $\text{CD}19^+\text{CD}24^{\text{hi}}\text{CD}27^+\text{IL}-10^+$ и $\text{CD}19^+\text{CD}24^{\text{hi}}\text{CD}38^{\text{hi}}\text{IL}-10^+$ [5, 7, 8]. Проводился пятицветный анализ, стратегия гейтирования представлена на рисунке 1.

Сначала выделялся лейкоцитарный гейт по экспрессии CD45, который присутствует на всех лейкоцитах, с максимальной экспрессией на лим-

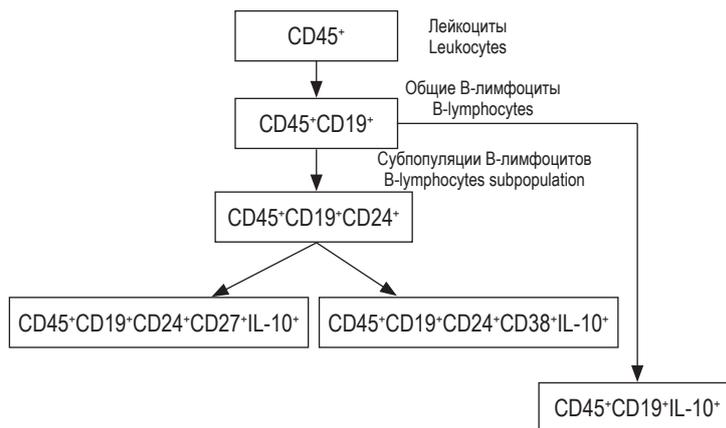


Рисунок 1. Стратегия последовательного гейтирования при многоцветном анализе с использованием CD45⁺, CD19⁺, CD24⁺, CD27⁺, CD38⁺, IL-10⁺ (5 цветов) для локализации субпопуляции В-клеток

Figure 1. Sequential gating strategy in multicolor assay using CD45⁺, CD19⁺, CD24⁺, CD27⁺, CD38⁺, IL-10⁺ (5 colors) to localize B cell subpopulation

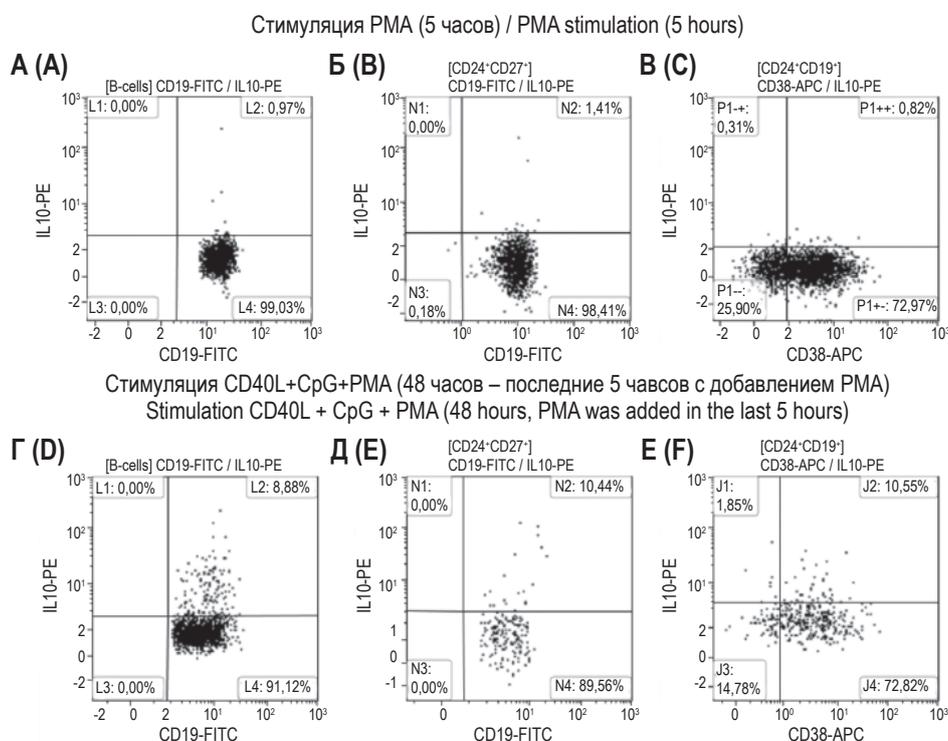


Рисунок 2. Гистограммы распределения фенотипических маркеров на В-лимфоцитах периферической крови после стимуляции цельной крови с PMA в течение 5 часов (А, Б, В) и стимуляции мононуклеарной фракции клеток с CD40L + CpG + PMA в течение 48 часов (Г, Д, Е)

Примечание. А – общее количество В-клеток, продуцирующих IL-10 в цельной крови (квадрант L2). Б – количество В10-reg клеток фенотипа CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ в цельной крови (квадрант N2). В – количество В10-reg клеток фенотипа CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ в цельной крови (квадрант P++). Г – общее количество В-клеток, продуцирующих IL-10 в мононуклеарной фракции клеток крови (квадрант L2). Д – количество В10-reg клеток фенотипа CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ в мононуклеарной фракции клеток крови (квадрант N2). Е – количество В10-reg клеток фенотипа CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ мононуклеарной фракции клеток крови (квадрант J2).

Figure 2. Histograms of the distribution of peripheral blood B lymphocytes phenotypic markers after stimulation of whole blood with PMA for 5 hours (A, B, C) and stimulation of the mononuclear fraction of cells with CD40L + CpG + PMA for 48 hours (D, E, F)

Note. A, the total number of IL-10 producing B cells in whole blood (L2 quadrant). B, number of whole blood B10-reg cells with CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ phenotype (quadrant N2). C, number of whole blood B10-reg cells with CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ phenotype (P++ quadrant). D, total number of B cells producing IL-10 in the mononuclear cell fraction (L2 quadrant). E, number of mononuclear cell fraction B10-reg cells with CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ phenotype (quadrant N2). F, number of mononuclear cell fraction B10-reg cells with CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ phenotype (quadrant J2).

фоцитах. Далее визуализировались В-лимфоциты, что обеспечивалось выделением клеток, экспрессирующих маркер линейной принадлежности В-клеток CD19. Затем ограничивали В-клетки, экспрессирующие дифференцировочный антиген CD24, который преимущественно экспрессируется дифференцирующимися клетками-предшественниками, метаболически активными клетками и значим для адаптивного иммунного ответа. Далее в популяции В-клеток, экспрессирующих маркер CD24, были визуализированы клетки, в первом случае экспрессирующие поверхностный маркер CD27 и внутриклеточный IL-10 (первая субпопуляция В10-reg клеток) и, во втором случае, экспрессирующие поверхностный CD38 и внутриклеточный IL-10 (вторая субпопуляция В10-reg клеток). Также дополнительно можно рассматривать общую фракцию В-лимфоцитов, продуцирующих цитокин IL-10.

Как свидетельствуют гистограммы, представленные на рисунке 2, описанная стратегия гейтирования позволяет визуализировать до 1% В-клеток, продуцирующих IL-10 после стимуляции с РМА (рис. 2А). Второй вариант стимуляции позволяет выявить общую популяцию IL-10 продуцирующих В-клеток, включающую про-В10 клетки, которая в сумме достигает 9% (рис. 2Г).

Вышеописанной стратегией гейтирования визуализируются истинные В10-reg клетки фенотипа CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺, которые являются эквивалентом широко изученных В10-клеток мыши (рисунок 2 Б соответствует клеткам цельной крови, стимулированной РМА, что позволяет визуализировать 1,4% В10-reg клеток и рисунок 2Д, демонстрирующий 10,4% искомой субпопуляции после длительной стимуляции коктейлем активирующих факторов). Также в субпопуляции транзитных клеток и плазмбластов визуализируются В10-reg клетки фенотипа CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ продуцирующие IL-10. Их количество составляет около 1% (рис. 2В) и 10,5% (рис. 2Е) при первом и втором типе стимуляции соответственно.

Полученные результаты подтверждают как данные Ивата Ю. и соавт., согласно которым у некоторых пациентов, в частности страдающих аутоиммунными заболеваниями, количество общей фракции В10-клеток + про-В10-клеток после аналогичной стимуляции увеличивается до 20% [3], так и данные немногочисленных исследований, свидетельствующих о значительной представленности субпопуляции В10-reg клеток при нормальной беременности [5, 7, 8].

На сегодняшний день основные данные о функции В10-reg клеток при беременности получены на мышиных моделях, согласно которым, при нормальной беременности происходит селективная экспансия IL-10 продуцирующих В-reg клеток, осуществляющих регуляцию иммунного ответа на фетальные антигены и супрессию провоспалительного ответа [4]. Известно, что у мышей с угрожающим выкидышем, наблюдается снижение В10-reg клеток, что предотвращается их селективным трансфером [4]. Подробное изучение функций В10-reg клеток при беременности у человека может открыть новые перспективы для диагностики, прогноза и персонализированной терапии идиопатических случаев акушерской патологии.

Выводы

Стимуляция *ex vivo* клеток мононуклеарной фракции периферической крови пациенток с физиологической беременностью позволяет визуализировать около 10% популяции В10-клеток+про-В10-клеток с использованием последовательного гейтирования при пятицветном цитометрическом анализе. Метод требует значительных временных и экономических затрат, но открывает перспективы фундаментальных исследований В10-reg клеток при беременности и детектируемые количества В10-reg клеток могут иметь диагностическое и прогностическое значение в клинике при идиопатических акушерских осложнениях.

Список литературы / References

1. Alhabbab R.Y., Nova-Lamperti E., Aravena O., Burton H.M., Lechler R.I., Dorling A., Lombardi G. Regulatory B cells: Development, phenotypes, functions, and role in transplantation. *Immunol. Rev.*, 2019, Vol. 292, no. 1, pp. 164-179.
2. Candando K.M., Lykken J.M., Tedder T.F. B10 cell regulation of health and disease. *Immunol. Rev.*, 2014, Vol. 259, no. 1, pp. 259-272.
3. Iwata Y., Matsushita T., Horikawa M., Dilillo D.J., Yanaba K., Venturi G.M., Szabolcs P.M., Bernstein S.H., Magro C.M., Williams A.D., Hall R.P., St Clair E.W., Tedder T.F. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 2, pp. 530-541.
4. Jensen F., Muzzio D., Soldati R., Fest S., Zenclussen A.C. Regulatory B10 cells restore pregnancy tolerance in a mouse model. *Biol. Reprod.*, 2013, Vol. 89, no. 4, 90. doi: 10.1095/biolreprod.113.110791.
5. Lima J., Martins C., Leandro M.J., Nunes G., Sousa M.J., Branco J.C., Borrego L.M. Characterization of B cells in healthy pregnant women from late pregnancy to post-partum: a prospective observational study. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2016, Vol. 16, no. 1, 139. doi: 10.1186/s12884-016-0927-7.

6. Mizoguchi A., Mizoguchi E., Takedatsu H., Blumberg R.S., Bhan A.K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*, 2002, Vol. 16, no. 2, pp. 219-230.
7. Muzzio D., Zenclussen A.C., Jensen F. The role of B cells in pregnancy: the good and the bad. *Am. J. Reprod Immunol.*, 2013, Vol. 69, no. 4, pp. 408-412.
8. Rolle L., Memarzadeh Tehran M., Morell-García A., Raeva Y., Schumacher A., Hartig R., Costa S.D., Jensen F., Zenclussen A.C. Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 70, no. 6, pp. 448-453.
9. Tedder TF. B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 4, pp. 1395-1401.
10. Wang L., Fu Y., Chu Y. Regulatory B Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2020, Vol. 1254, pp. 87-103.
11. Wortel C.M., Heidt S. Regulatory B cells: Phenotype, function and role in transplantation. *Transpl. Immunol.*, 2017, Vol. 41, pp. 1-9.
12. Wu H., Su Z., Barnie P.A. The role of B regulatory (B10) cells in inflammatory disorders and their potential as therapeutic targets. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 78, 106111. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106111.
13. Zhao H., Feng R., Peng A., Li G., Zhou L. The expanding family of noncanonical regulatory cell subsets. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, Vol. 106, no. 2, pp. 369-383.

Авторы:

Зиганшина М.М. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Хайдуков С.В. — д.б.н., советник директора ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник лаборатории углеводов ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Ziganshina M.M., PhD (Biology), Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Khaidukov S.V., PhD, MD (Biology), Director's Advisor, V. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology; Senior Research Associate, Laboratory of Carbohydrates, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Research Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 17.06.2021

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ЛЮДЕЙ, ХРОНИЧЕСКИ ОБЛУЧЕННЫХ *IN UTERO* И ПОСТНАТАЛЬНО, В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ

Кодинцева Е.А.^{1,2}, Аклеев А.А.^{1,3}, Блинова Е.А.^{1,2}, Аклеев А.В.^{1,2}

¹ ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, г. Челябинск, Россия

² ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

³ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. Лица, облученные внутриутробно и в раннем детском возрасте, составляют группу риска в отношении развития отдаленных стохастических последствий облучения. Дисбаланс цитокинов в отдаленные сроки после облучения может рассматриваться как один из триггеров, запускающих онкогенез у людей, облученных *in utero* и в раннем детском возрасте, что определяет актуальность исследования. Цель исследования заключалась в анализе уровней сывороточных цитокинов у жителей прибрежных сел реки Течи, хроническое облучение которых началось антенатально, и изучении зависимости выявленных изменений от факторов радиационной и нерадиационной природы в отдаленные сроки после начала облучения. В основную группу был включен 61 человек из когорты реки Течи 1950–1960 годов рождения, облучение которых началось *in utero* и продолжилось в раннем постнатальном периоде. Средняя доза антенатального облучения, рассчитанная на красный костный мозг, составила в основной группе 74,7 мГр, средняя доза постнатального облучения, рассчитанная на красный костный мозг, – 537,5 мГр, медиана возраста пациентов – 64,0 года. Группа сравнения (90 необлученных лиц) была сопоставима с основной группой по возрастному, половому и этническому составу и социально-экономическим условиям проживания. Медианные уровни для IL-2 в основной группе составили 1,37 пг/мл, в группе сравнения – 2,70 пг/мл, $p = 0,020$; для IL-10 – 4,53 пг/мл и 7,58 пг/мл, $p = 0,030$ соответственно; для GM-CSF – 0,39 пг/мл у облученных *in utero* и в раннем постнатальном периоде и 0,86 пг/мл у необлученных людей, $p = 0,040$. Медианные сывороточные концентрации IL-1 β , IL-1 α , IL-1(ra), IL-4, IL-6, IL-8, G-CSF, TNF α , IFN α , IFN γ в основной группе облученных людей не отличались от значений в группе необлученных лиц. Уровни IL-2, IL-10 и GM-CSF в сыворотке крови у лиц основной группы не зависели от дозы антенатального и постнатального облучения красного костного мозга. В основной группе установлена умеренная обратная зависимость уровня сывороточного IL-10 от возраста на момент обследования (SR = -0,53, $p < 0,001$). Сывороточные концентрации IL-2 и IL-10 у людей из группы сравнения умеренно положительно коррелировали с возрастом на момент обследования (SR = 0,47, $p < 0,001$ и SR = 0,42, $p < 0,001$ соответственно).

Ключевые слова: хроническое облучение, антенатальный период онтогенеза, постнатальный период онтогенеза, цитокины

Адрес для переписки:

Кодинцева Екатерина Александровна
ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, г. Челябинск, Россия
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, Е.А. Блинова, А.В. Аклеев
«Цитокиновый профиль людей, хронически облученных *in utero* и постнатально, в отдаленные сроки»
// Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 275–282. doi: 10.46235/1028-7221-1005-CPI
© Кодинцева Е.А. и соавт., 2021

For citation:

E.A. Kodintseva, A.A. Akleyev, E.A. Blinova, A.V. Akleyev
“Cytokine profile in the subjects after long-term in utero and postnatal exposure to chronic irradiation”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 275–282.
doi: 10.46235/1028-7221-1005-CPI
DOI: 10.46235/1028-7221-1005-CPI

CYTOKINE PROFILE IN THE SUBJECTS AFTER LONG-TERM *IN UTERO* AND POSTNATAL EXPOSURE TO CHRONIC IRRADIATION

Kodintseva E.A.^{a, b}, Akleyev A.A.^{a, c}, Blinova E.A.^{a, b}, Akleyev A.V.^{a, b}

^a Ural Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

^c South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Persons exposed to ionizing radiation *in utero* and in early childhood constitute a risk group for the development of long-term stochastic consequences of irradiation. The imbalance of cytokines at the long terms after irradiation could be considered a carcinogenic triggering factor in subjects previously irradiated *in utero* and in early childhood, thus determining relevance of the study. The aim of the present study was to assess the levels of serum cytokines in native residents of coastal villages at the Techa River, whose chronic irradiation had been begun antenatally and to study probable interrelations between the detected changes, radiation and non-radiation factors at long terms after the exposure was begun. The main group included 61 persons from the Techa River Cohort who were born in 1950-1960, whose irradiation was begun *in utero*, being continued over the early postnatal period. For patients from the main group, the mean dose of antenatal radiation was calculated 74.7 mGy for red bone marrow as of, the mean dose of postnatal irradiation was calculated for red bone marrow as 537.5 mGy, and the median age of patients was 64.0 years. The comparison group (90 non-irradiated persons) was comparable to the main group in terms of age, gender, ethnicity and socio-economic status. The median levels for IL-2 in the main group were 1.37 pg/ml; in the comparison group, 2.70 pg/ml, $p = 0.020$; for IL-10, 4.53 pg/ml versus 7.58 pg/ml, $p = 0.030$ respectively; for GM-CSF, 0.39 pg/ml in the subjects who were irradiated *in utero* and in the early postnatal period versus 0.86 pg/ml in non-irradiated persons, $p = 0.040$. The median serum concentrations of IL-1 β , IL-1 α , IL-1(ra), IL-4, IL-6, IL-8, G-CSF, TNF α , IFN α , IFN γ in the study group did not show differences from the values in a group of non-irradiated persons. The decrease of the serum IL-2, IL-10 and GM-CSF levels in the persons of the main group did not depend on the dose of antenatal irradiation to red bone marrow, and on the radiation dose to red bone marrow received during the postnatal period of ontogenesis. In the main group, there was a moderate inverse relationship between the serum IL-10 level and age at the time of examination (SR = -0.53, $p < 0.001$). Serum concentrations of IL-2 and IL-10 in the people from comparison group showed a moderate positive correlation with their present age (SR = 0.47, $p < 0.001$ and SR = 0.42, $p < 0.001$ respectively).

Keywords: chronic radiation exposure, antenatal period, postnatal period, cytokines

Введение

Результаты исследования отдаленных эффектов хронического радиационного воздействия на показатели иммунной системы человека в мировой литературе представлены в ограниченном объеме [2, 6]. Единичные публикации содержат информацию об особенностях цитокинового профиля у людей, неравномерное хроническое облучение которых началось в антенатальном периоде развития и продолжалось постнатально в течение многих лет. Сообщается о снижении в сыворотке крови у внутриутробно облученных внешним гамма- и внутренним альфа-излучениями детей сотрудников ПО «Маяк» уровней С3, С5, С5А-компонентов комплемента (для С5 – дозозависимом) и повышении содержания IL-1 α , IL-4, IFN γ и TNF α в сыворотке крови (для TNF α – также дозозависимом) [7].

Важно отметить, что исследования системного иммунитета, проведенные у антенатально облученных жителей прибрежных сел реки Течи спустя 35-44 года после начала облучения, позволили получить данные, свидетельствующие о возможности преждевременного радиационно-индуцированного старения иммунной системы у этих людей [6]. В исследованиях иммунитета у членов когорты реки Течи, облученных антенатально и детском возрасте до 5 лет, проведенных через 60-68 лет после начала хронического облучения, отмечено, что изменения уровней отдельных сывороточных цитокинов у них были более выражены по сравнению с людьми, которые подверглись воздействию ионизирующего излучения в возрасте старше 5 лет [1]. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой радиочувствительности тканей эмбриона, плода и

детского организма, обусловленной активностью пролиферативных процессов [10], и согласуются с литературными данными [15], что позволяет включать лиц, облученных внутриутробно и в раннем детском возрасте, в группу риска в отношении развития отдаленных стохастических последствий облучения. Настоящая работа продолжает ранее исследование иммунного статуса у жителей прибрежных сел реки Течи в отдаленные сроки [3].

Эксперименты на животных и исследования внутриутробно облученных людей, переживших атомную бомбардировку, техногенный радиационный инцидент в Китае [12], перенесших радиологические обследования, показывают, что порог дозы при внутриутробном облучении составляет не менее 100 мГр, при этом к основным эффектам относятся ранняя гибель эмбриона или плода, врожденные пороки развития, задержка роста и интеллектуального развития [15]. Внутриутробное воздействие ионизирующего излучения в любой дозе связано с повышенным риском развития злокачественных новообразований в детском возрасте, особенно лейкозов [15]. Имеются данные о повышенном риске развития солидных опухолей после облучения *in utero* и в раннем детском возрасте (до 5 лет) у лиц, выживших после атомной бомбардировки городов Хиросимы и Нагасаки [13]. Ранее сообщалось о повышенном избыточном относительном риске развития лейкозов (кроме хронического лимфолейкоза) у потомков сотрудников ПО «Маяк», облученных антенатально (средняя доза облучения *in utero* – 80 мГр), однако более поздние исследования у облученных *in utero* потомков работников ПО «Маяк» не позволили выявить увеличения риска онкологической смертности, связанной с дозой внешнего облучения [14]. У антенатально облученных при сбросах радиоактивных отходов в реку Течу людей при постнатальном облучении в дозе, превышающей 10 мГр, накопленной в мягких тканях, показано статистически значимое и независимое от накопленной внутриутробно дозы увеличение коэффициентов заболеваемости солидными злокачественными новообразованиями [8]. В более поздних исследованиях для данной группы населения установлен статистически значимый избыточный относительный риск заболеваемости солидными злокачественными новообразованиями без зависимости его величины от дозы облучения, накопленной *in utero* [11]. В эпидемиологическом исследовании, выполненном на Уральской когорте пренатально облученных лиц, куда вошли *in utero* облученные на Тече люди и антенатально облученные потомки работников ПО «Маяк», не было выявлено зависимости положительного риска заболеваемости солид-

ными злокачественными новообразованиями от дозы, полученной внутриутробно, но величина относительного риска статистически значимо зависела от дозы облучения, накопленной постнатально [9]. Результаты обследования населения, облученного в возрасте до 20 лет в двух радиационных ситуациях на Южном Урале, свидетельствуют о наличии статистически значимого избыточного относительного риска заболеваемости солидными злокачественными новообразованиями, линейно коррелировавшего с дозой облучения, преимущественно накопленной в возрасте до 1 года [5]. Дисбаланс цитокинов в отдаленные сроки после облучения может рассматриваться как один из триггеров, запускающих онкогенез у лиц, облученных внутриутробно и в раннем детском возрасте, что определяет актуальность исследования.

Цель исследования заключалась в анализе уровней сывороточных цитокинов у жителей прибрежных сел реки Течи, хроническое облучение которых началось антенатально, и изучении зависимости выявленных изменений от факторов радиационной и нерадиационной природы в отдаленные сроки после начала облучения.

Материалы и методы

Все участники исследования проходили регулярное обследование сотрудниками клинического отделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России). Расчет индивидуальных доз облучения обследованных людей был выполнен сотрудниками биофизической лаборатории ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России с использованием дозиметрической системы TRDS-2016 [4].

В основную группу (лица, облученные *in utero* и постнатально) был включен 61 человек из когорты жителей прибрежных сел реки Течи, облучение которых началось *in utero* и продолжилось в раннем постнатальном периоде. Эти лица были рождены в период с 1950 по 1960 годы и постоянно проживали на территориях, загрязненных в результате сбросов жидких радиоактивных отходов ПО «Маяк» в 1949-1956 годах в реку Течу. Доза облучения, накопленная обследованными людьми, была обусловлена равномерным внешним и внутренним облучением, преимущественно за счет ^{137}Cs и неравномерным внутренним облучением красного костного мозга (ККМ) от инкорпорированных изотопов ^{89}Sr и $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ [6]. Средняя доза антенатального облучения, рассчитанная на ККМ, составила в основной группе 74,7 мГр, средняя доза постнатального облуче-

ния, рассчитанная на ККМ, – 537,5 мГр, медиана возраста пациентов – 64,0 года.

Группу сравнения (необлученные лица) составили 90 человек, рожденных с 1950 по 1960 годы, доза облучения которых не превышала допустимого НРБ-99/2009 предела для населения России (70 мГр), проживавших в аналогичных социально-экономических условиях. Средняя доза антенатального облучения, рассчитанная на ККМ, в группе сравнения составила 5,7 мГр, средняя доза постнатального облучения, рассчитанная на ККМ, за весь период жизни не превышала уровень естественного радиационного фона и составила 17,8 мГр, медиана возраста пациентов этой группы составила 63,0 года.

Группа сравнения статистически не отличалась от основной группы по относительному количеству мужчин и женщин, а также по процентному соотношению представителей основных этнических групп (славяне и тюрки). Женщины и люди славянской этнической группы преобладали в каждой из исследуемых групп. Относительное количество лиц женского пола составило 58,3% в основной группе и 66,7% – в группе сравнения. К славянской этнической группе в основной группе принадлежали 53,3% обследованных, в группе сравнения этот показатель составил 56,8%.

Перед исследованием каждый участник подписывал добровольное информированное согласие и проходил медицинский осмотр.

Из исследования исключались лица, имеющие на момент обследования острые или хронические воспалительные заболевания в стадии обострения, почечную или печеночную недостаточность, находившиеся в остром или промежуточном периоде черепно-мозговой травмы, имевшие острое нарушение мозгового кровообращения в течение последних трех месяцев, принимавшие антибиотики, глюкокортикоиды, цитостатики, проходившие радиологические обследования в течение предшествующего обследованию полугодия, а также пациенты с гемобластомами, онкологическими и аутоиммунными заболеваниями в анамнезе или впервые диагностированными при обследовании.

В качестве биологического материала для количественной оценки уровней цитокинов использовали сыворотку периферической крови человека. Уровни цитокинов оценивали на анализаторе Lazurite фирмы DYNEX Technologies (США) с помощью ИФА-наборов. Для IL-1 β , IL-1(ra), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , IFN α , IFN γ использовали аналитические системы фирмы «Вектор-Бест» (Россия), для IL-1 α , GM-CSF и G-CSF – фирмы Thermo Fisher Scientific (eBioScience, США).

При описании данных рассчитывали среднее арифметическое значение и 95%-ный доверительный интервал или медиану, 25 и 75 процентиля. Отличия распределения частот от нормального оценивали по критерию Колмогорова–Смирнова. Количественные данные сравнивали при помощи U-критерия Уилкоксона–Манна–Уитни; относительные частоты – методом χ^2 с расчетом доверительных интервалов методом Клоппера–Пирсона. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$. Корреляционные зависимости оценивали методом ранговой корреляции Спирмена с 5%-ным уровнем значимости. При статистической обработке данных использовали программы Excel фирмы Microsoft (США) и Statistica фирмы StatSoft (США).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования уровней цитокинов в сыворотке крови у людей из основной группы и группы сравнения представлены в таблице 1. Видно, что у представителей основной группы регистрировалось более низкое, чем в группе сравнения, содержание сывороточных IL-2, IL-10 и GM-CSF.

Доля обследованных лиц с содержанием IL-2 и GM-CSF в сыворотке крови, выходящим за границы референтного интервала, в группе людей, облученных *in utero* и в раннем постнатальном периоде, и в группе необлученных лиц статистически значимо не различалась, что свидетельствовало об относительно равномерном снижении содержания данных цитокинов в сыворотке крови у большей части представителей основной группы.

Обращало внимание, что более низкая концентрация противовоспалительного IL-10 в сыворотке крови у лиц основной группы была обусловлена статистически значимым увеличением доли людей с индивидуальными значениями данного показателя, выходящими за нижнюю границу референтного интервала. При этом доля лиц с уровнем сывороточного IL-10, превышающим верхнюю границу доверительного интервала, в основной группе была сопоставима с таковой в группе сравнения.

Не было выявлено статистически значимых зависимостей показателей, различающихся в основной группе и в группе сравнения, от дозы облучения, рассчитанной на ККМ и накопленной в антенатальном периоде. Обнаруженные в отдаленные сроки после начала хронического низкоинтенсивного облучения изменения уровней IL-2, IL-10 и GM-CSF в сыворотке крови не зависели от дозы облучения ККМ, накопленной обследованными людьми в течение постнатального периода онтогенеза.

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. LEVELS OF SERUM CYTOKINES IN THE STUDY GROUPS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

№ п/п Item No.	Наименование цитокина Cytokine name	Концентрация, пг/мл Concentration, pg/ml	
		Лица, облученные <i>in utero</i> и в раннем постнатальном периоде Persons, who were irradiated <i>in utero</i> and in the early postnatal period n = 61	Необлученные лица Unirradiated persons n = 90
1	IL-1 β	2,64 (2,09-3,63)	2,66 (1,38-5,77)
2	IL-1 α	0,90 (0,05-1,10)	0,43 (0,08-1,16)
3	IL-1(ra)	118,18 (61,61-258,96)	121,18 (101,89-387,57)
4	IL-2	1,37 (0,79-2,86) p = 0,020*	2,70 (1,16-5,17)
5	IL-4	0,71 (0,27-1,18)	0,78 (0,37-3,65)
6	IL-6	1,71 (0,76-3,80)	2,05 (1,02-3,54)
7	IL-8	6,40 (2,58-11,66)	6,39 (1,52-12,95)
8	IL-10	4,53 (2,69-9,66) p = 0,030	7,58 (4,98-13,77)
9	GM-CSF	0,39 (0,17-1,10) p = 0,040	0,86 (0,39-4,66)
10	G-CSF	8,81 (4,66-10,99)	4,45 (2,09-11,93)
11	TNF α	2,47 (1,29-4,07)	2,80 (1,20-4,43)
12	IFN α	5,39 (2,32-7,93)	4,15 (1,86-7,40)
13	IFN γ	15,62 (7,79-21,12)	11,22 (4,08-19,48)

Примечание. * p – доверительная вероятность различий в основной группе относительно группы сравнения.

Note. * p, confidence probability of differences in the main group relative to the comparison group.

В основной группе установлена умеренная обратная зависимость уровня сывороточного IL-10 от возраста на момент обследования (SR = -0,53, p < 0,001). Сывороточные концентрации IL-2 и IL-10 у людей из группы сравнения умеренно положительно коррелировали с возрастом на момент обследования (SR = 0,47, p < 0,001 и SR = 0,42, p < 0,001 соответственно).

В отдаленные сроки после начала облучения не обнаружено статистически значимых зависимостей изменений уровней IL-2, IL-10 и GM-CSF в сыворотке крови в группе лиц, облученных *in utero* и в раннем постнатальном периоде, от пола и этнической принадлежности обследованных.

В более раннем исследовании цитокинового профиля у 38 жителей прибрежных сел реки Течи, хронически облученных *in utero* и в раннем постнатальном периоде, сообщалось об увеличении средних уровней IL-1 α , IFN α и IFN γ в сыворотке крови по сравнению с необлученными

людьми [3]. В настоящей работе была расширена выборка обследованных лиц из основной группы. Статистически значимых различий в концентрациях сывороточных IL-1 α , IFN α и IFN γ у 61 человека из основной группы и 90 человек из группы сравнения выявлено не было. Различия между полученными результатами предыдущего и настоящего исследования обусловлены увеличением количества обследованных лиц в основной группе, использованием непараметрических методов при статистической обработке данных, а также крайне высокой индивидуальной вариабельностью сывороточных концентраций цитокинов.

Выводы

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии в отдаленные сроки после хронического радиационного воздействия некоторого дисбаланса в цитокиновом профиле у хро-

тически облученных людей, низкоинтенсивное облучение которых началось в период внутриутробного развития и продолжалось постнатально. Дисбаланс выражался в снижении уровней IL-2, IL-10, GM-CSF в сыворотке крови и был компенсирован на уровне целого организма. Описанные изменения не коррелировали с дозой облучения ККМ, накопленной *in utero*, и дозой облучения ККМ, накопленной постнатально, но разнонаправлено коррелировали с отдельными факторами нерадиационной природы (полом,

возрастом на момент обследования, этнической принадлежностью).

Благодарности

Авторы благодарят заведующего отделом Базы данных «Человек» ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России Н.В. Старцева за помощь в формировании исследуемых групп и выражают признательность старшему лаборанту лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России Н.П. Литвиненко за техническое содействие при проведении исследования.

Список литературы / References

1. Аклеев А.А., Блинова Е.А., Котикова А.И. Особенности цитокинового профиля и связи полиморфизмов генов иммунной системы с уровнями сывороточных цитокинов у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12, № 3. С. 199-204. [Akleyev A.A., Blinova E.A., Kotikova A.I. Features of the cytokine profile and relationships of polymorphisms of the immune system with levels of serum cytokines in individuals exposed to chronic radiation exposure. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12, no. 3, pp. 199-204. (In Russ.)]
2. Аклеев 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.)]
3. Аклеев А.А. Особенности функционального состояния иммунной системы в отдаленном периоде у лиц, подвергшихся хроническому облучению *in utero* // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 2. С. 93-96. [Akleyev A.A. Features of the functional state of the immune system in persons subjected to chronic radiation exposure *in utero* in the remote period. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 2, pp. 93-96. (In Russ.)]
4. Дегтева М.О., Напье Б.А., Толстых Е.И., Шишкина Е.А., Бугров Н.Г., Крестинина Л.Ю., Аклеев А.В. Распределение индивидуальных доз в когорте людей, облученных в результате радиоактивного загрязнения реки Течи // Медицинская радиология и радиационная безопасность, 2019. Т. 64, № 3. С. 46-53. [Degteva M.O., Napier B.A., Tolstykh E.I., Shishkina E.A., Bougrov N.G., Krestinina L.Yu., Akleyev A.V. Individual dose distribution in cohort of people exposed as a result of radioactive contamination of the Techa River. *Meditinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost = Medical Radiology and Radiation Safety*, 2019, Vol. 64, no. 3, pp. 46-53. (In Russ.)]
5. Крестинина Л.Ю., Шалагинов С.А., Силкин С.С., Епифанова С.Б., Аклеев А.В. Радиогенный риск заболеваемости солидными злокачественными новообразованиями у лиц, облученных на Южном Урале в детском возрасте // Радиационная гигиена, 2021. Т. 14, № 1. С. 49-59. [Krestinina L.Yu., Shalaginov S.A., Silkin S.S., Epifanova S.B., Akleyev A.V. Radiogenic risk of solid cancer incidence in persons exposed to radiation in childhood in the Southern Urals. *Radiatsionnaya gigiena = Radiation Hygiene*, 2021, Vol. 14, no. 1, pp. 49-59. (In Russ.)]
6. Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи / Под ред. А.В. Аклеева. Челябинск: Книга, 2016. 400 с. [Consequences of radioactive contamination of the river Techa. Ed. Akleyev A.V.] Chelyabinsk: Kniga, 2016. 400 p.
7. Рыбкина В.Л., Жунтова Г.В., Азизова Т.В. Компоненты системы комплемента, иммуноглобулины и цитокины у внутриутробно облученных лиц // Иммунология, 2016. Т. 37, № 3. С. 162-169. [Rybkina V.L., Zhuntova G.V., Azizova T.V. Components of the complement system, immunoglobulines and cytokines in prenatally irradiated persons. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 3, pp. 162-169. (In Russ.)]
8. Харюзов Ю.Е., Крестинина Л.Ю., Толстых Е.И., Аклеев А.В. Методология наблюдения и описательный анализ смертности и онкологической заболеваемости в когорте лиц, облучившихся на реке Тече в период внутриутробного развития // Радиация и риск, 2015. Т. 24, № 3. С. 92-104. [Kharyuzov Yu.E., Krestinina L.Yu., Tolstykh E.I., Akleyev A.V. Follow-up methodology and analysis of mortality and cancer incidence in the cohort of people *in utero* exposed to radiation as a result of radioactive contamination of environment and the Techa River. *Radiatsiya i risk = Radiation and Risk*, 2015, Vol. 24, no. 3, pp. 92-104. (In Russ.)]
9. Akleyev A., Deltour I., Krestinina L., Sokolnikov M., Tsareva Yu., Tolstykh E., Schüz J. Incidence and mortality of solid cancers in people exposed *in utero* to ionizing radiation: pooled analyses of two cohorts from the Southern Urals, Russia. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 8, e0160372. doi: 10.1371/journal.pone.0160372.
10. Barber R.C., Hardwick R.J., Shanks M.E., Glen C.D., Mughal S.K., Voutounou M., Dubrova Yu.E. The effects of *in utero* irradiation on mutation induction and transgenerational instability in mice. *Mutat. Res.*, 2009, no. 664, pp. 6-12.

11. Krestinina L.Yu., Kharyuzov Yu.E., Epiphanova S.B., Tolstykh E.I., Deltour I., Schüz J., Akleyev A.V. Cancer incidence after *in utero* exposure to ionizing radiation in Techa River residents. *Radiat. Res.*, 2017, Vol. 188, pp. 314-324.
12. Liang L., Zhang Z., Chen S., Ma L., Chen Y., Zhang S., Jia T., Liu Y., Liu Q., Su X., Qin B., Wang Z. Clinical observation of a 16-year-old female exposed to radiation *in utero*: follow-up after the Shanxi Xinzhou radiation accident. *J. Radiol. Prot.*, 2011, Vol. 31, no. 4, pp. 495-498.
13. Preston D.L., Cullings H., Suyama A., Funamoto S., Nishi N., Soda M., Mabuchi K., Kodama K., Kasagi F., Shore R.E. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors exposed *in utero* or as young children. *J. Natl Cancer Inst.*, 2008, Vol. 100, no. 6, pp. 428-436.
14. Schonfeld S.J., Tsareva Y.V., Preston D.L., Okatenko P.V., Gilbert E.S., Ron E., Sokolnikov M.E., Koshurnikova N.A. Cancer mortality following *in utero* exposure among offspring of female Mayak worker cohort members. *Radiat. Res.*, 2012, Vol. 178, no. 3, pp. 160-165.
15. Wakeford R., Little M.P. Risk coefficients for childhood cancer after intrauterine irradiation: a review. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2003, Vol. 79, no. 5, pp. 293-309.

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. — д.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 and Cellular Radiobiology, Ural Research Center for Radiation Medicine; Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Akleyev A.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural State Medical University; Senior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Radiobiology, Ural Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russian Federation

Блинова Е.А. — к.б.н., заведующий лабораторией молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России; доцент кафедры радиационной биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Аклеев А.В. — д.м.н., профессор, директор ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России; заведующий кафедрой радиационной биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Blinova E.A., PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular and Cell Radiobiology, Ural Research Center for Radiation Medicine; Associate Professor, Department of Radiation Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Akleyev A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Ural Research Center for Radiation Medicine, Head, Department of Radiation Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 17.06.2021

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БАЗОВОГО СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В НЕСТИМУЛИРОВАННЫХ ОБРАЗЦАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Лагерева Ю.Г.^{1,2}, Палицына О.В.³, Ищенко Н.В.¹

¹ ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

³ ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Базовая концентрация цитокинов в нестимулированных образцах периферической крови варьирует в зависимости от возраста, экологической ситуации в регионе проживания, уровня медицинского обслуживания и качества жизни, а также многих других факторов, что обуславливает необходимость определения «нормального» уровня цитокинов периферической крови для каждой возрастной группы с учетом региональных особенностей. Цель настоящего исследования состояла в исследовании ассоциированных с возрастом особенностей базового содержания отдельных цитокинов в нестимулированных образцах периферической крови практически здоровых детей и взрослых, проживающих в г. Екатеринбурге. Исследования проведены на базе лаборатории клинической иммунологии ГАУЗ СО «КДЦ» г. Екатеринбург. Исследованы образцы периферической крови 149 практически здоровых детей в возрасте от 7 месяцев до 18 лет (1 группа – 7-12 мес. (29 человек), 2 группа – 1-3 года (33 человека), 3 группа – 4-7 лет (29 человек), 4 группа 8-14 лет (26 человек), 5 группа-15-18 лет (32 человека) и 6 группа – 42 взрослых (19-45 лет)). Концентрацию цитокинов TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 и IL-18 в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия). Анализ полученных данных позволил выделить различные паттерны изменения базовой концентрации определяемых цитокинов в зависимости от возраста: IL-2 – увеличение концентрации к 1-3-летнему возрасту, стабильное содержание до 18 лет и снижение концентрации во взрослом возрасте; IFN γ – нулевое содержание у детей и подростков и повышение уровня во взрослом возрасте; IL-4 и IL-6 – стабильно невысокое содержание у детей и подростков со снижением до нуля у взрослых; IL-18, TNF α – максимальное содержание в возрасте до 7 лет с последующим снижением концентрации; IL-1 β , IL-17 – бимодальный вариант с максимумом содержания в 1-3 года и повторным увеличением концентрации у взрослых; практически стабильная базовая концентрация с небольшим повышением в 1-3 года (IL-10) и 15-18 лет (IL-8).

Максимальное базовое содержание большинства анализируемых цитокинов в нестимулированных образцах периферической крови обнаружено у детей в возрасте 1-3 года.

Ключевые слова: возраст, цитокины, дети, взрослые, нестимулированные образцы, периферическая кровь

Адрес для переписки:

Лагерева Юлия Геннадьевна
ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр»
620142, Россия, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 78в.
Тел.: 8 (343) 205-82-58.
E-mail: anna-lagereva@yandex.ru

Address for correspondence:

Lagereva Yulia G.
Clinical Diagnostic Center
620142, Russian Federation, Yekaterinburg, 8 March str., 78v.
Phone: 7 (343) 205-82-58.
E-mail: anna-lagereva@yandex.ru

Образец цитирования:

Ю.Г. Лагерева, О.В. Палицына, Н.В. Ищенко
«Возрастные особенности базового содержания
цитокинов в нестимулированных образцах
периферической крови» // Российский
иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 283-290.
doi: 10.46235/1028-7221-1007-ADP

© Лагерева Ю.Г. и соавт., 2021

For citation:

Yu.G. Lagereva, O.V. Palitsyna, N.V. Ischenko
“Age-dependent patterns of the baseline cytokine levels in
unstimulated peripheral blood samples”, Russian Journal of
Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021,
Vol. 24, no. 2, pp. 283-290.
doi: 10.46235/1028-7221-1007-ADP

DOI: 10.46235/1028-7221-1007-ADP

AGE-DEPENDENT PATTERNS OF THE BASELINE CYTOKINE LEVELS IN UNSTIMULATED PERIPHERAL BLOOD SAMPLES

Lagereva Yu.G.^{a, b}, Palitsyna O.V.^c, Ischenko N.V.^a

^a Clinical Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation

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

^c B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The cytokine levels in unstimulated peripheral blood samples differ in relation to age, living conditions (environmental situation, state of medical care, quality of life, etc). Thus, the essential task is to determine normal levels of peripheral blood cytokines for different age groups with respect to regional characteristics. This study aimed to investigate age-associated patterns of the baseline levels for some cytokines in unstimulated peripheral blood samples in healthy children and adults. The studies were carried out at the Laboratory of Clinical Immunology (Clinical and Diagnostic Centre, Yekaterinburg). Peripheral blood samples were taken in 149 healthy children aged from 7 months to 18 years. Group 1 was 7 to 12 months old (29 infants); group 2 was 1 to 3 years old (33 children); group 3 was 4 to 7 years old (29 children); 4th group was 8 to 14 years old (26 children); 5th group, 15 to 18 years old (32 children); and 6th group included 42 adults (19 to 45 years old). The concentrations of TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, and IL-18 in blood serum were determined by common ELISA technique using Vector-Best kits (Novosibirsk, Russia). Analysis of the data made it possible to identify various patterns of age-dependent changes of baseline levels for the determined cytokines: IL-2 showed an increase in concentration by the age of 1-3 years, stable contents up to 18 years, and decreased concentrations in adulthood. IFN γ was at zero levels in children and adolescents, followed by increased levels in adults. IL-4 and IL-6 showed consistently low levels in children and adolescents, with a decrease to zero levels in adult subjects. IL-18, TNF α were at maximal levels at the age of below 7 years followed by a decrease in concentration; IL-1 β , IL-17 exhibited bimodal changes, with maximal contents at the age of 1-3 years, and repeated increase in adult age. Nearly stable baseline concentration was noted for IL-10, with a slight increase at 1-3 years, like as for IL-8, with a moderate increase at 15-18 years. For majority of analyzed cytokines, the maximal baseline contents in unstimulated peripheral blood samples were found in children aged 1-3 years.

Keywords: age, cytokines, children, adults, unstimulated samples, peripheral blood

Введение

Оценка цитокинового профиля привлекает внимание исследователей в связи с их ключевым участием в процессах межклеточных взаимодействий. Концентрацию цитокинов можно определять в самых разнообразных биологических жидкостях, тканях и клетках с диагностической и прогностической целью. Перечень заболеваний и состояний, при которых целесообразно оценивать уровень цитокинов, постоянно увеличивается. Помимо системных аутоиммунных заболеваний соединительной ткани определение уровня цитокинов может использоваться в диагностике и терапии тяжелых бактериальных инфекций, таких как сепсис и пневмония у детей и взрослых [11]. В педиатрии определение уровня цито-

кинов применяется в диагностических целях при неонатальном сепсисе, туберкулезе, пневмонии, нейровоспалительных заболеваниях и гемофагоцитарном лимфогистиоцитозе [11, 18]. Кроме того, в настоящее время широко проводятся исследования и разработка диагностических тестов с использованием цитокинов при вирусных респираторных инфекциях, астме, аутовоспалительных заболеваниях и расстройствах аутистического спектра.

Исследования «нормальной» концентрации цитокинов у практически здоровых детей, отличающиеся разнообразием обследуемых групп и методических подходов, легли в основу проведенного в 2017 г. Marie-Luise Decker и соавт. метаанализа [12], основным выводом которого является бесспорное влияние возраста как одного

из наиболее значимых факторов на базовый уровень концентрации цитокинов. Анализ опубликованных по этой теме результатов исследований свидетельствует также о значительных вариациях цитокиновых показателей в зависимости от условий жизни (экологическая ситуация в регионе проживания, уровень медицинского обслуживания и качества жизни), что обуславливает необходимость определения «нормального» уровня цитокинов периферической крови для каждой возрастной группы с учетом региональных особенностей. Таким образом, данные о базовом уровне цитокинового синтеза в разных возрастных группах с учетом региона проживания имеют принципиальное значение для интерпретации любого теста, основанного на измерении цитокиновой экспрессии, при этом представления о нормальном уровне цитокиновой экспрессии и базовом уровне их содержания у здоровых детей разного возраста крайне ограничены.

Цель настоящего исследования состояла в исследовании ассоциированных с возрастом особенностей базового содержания отдельных цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-4, IL-10, IL-2, IL-17, IL-18) в нестимулированных образцах периферической крови практически здоровых детей и взрослых.

Материалы и методы

Исследования проведены на базе лаборатории клинической иммунологии МАУ Клинико-диагностический Центр (главный врач – д.м.н., профессор Бейкин Я.Б.) г. Екатеринбург. Исследованы образцы периферической крови 149 практически здоровых детей в возрасте от 7 месяцев до 18 лет (1-я группа – 7-12 мес. (29 человек), 2-я группа – 1-3 года (33 человека), 3-я группа – 4-7 лет (29 человек), 4-я группа 8-14 лет (26 человек), 5-я группа – 15-18 лет (32 человека) и 6-я группа – 42 взрослых (19-45 лет). Обследование женщин и подростков с установившимся менструальным циклом проводили в фолликулярную фазу на 5-7-й день менструального цикла. Концентрацию цитокинов TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 и IL-18 в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия). Измерение оптической плотности проводили с помощью ИФА-ридера Multiscan EX (Thermo Electron Corporation, Китай). Статистическую обработку материала проводили с использованием ППП Statistica 10 (StatSoft Inc.). Описательная статистика заключалась в определении медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (25-го и

75-го процентилей, $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для сравнения количественных признаков в независимых группах применяли U-критерий Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test).

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных (табл. 1) позволил выделить 6 основных паттернов изменения базовой концентрации определяемых цитокинов в зависимости от возраста:

1. Увеличение концентрации к 1-3-летнему возрасту, стабильное содержание до 18 лет и снижение концентрации во взрослом возрасте – IL-2.
2. Не определяемое содержание у детей и подростков и повышение уровня во взрослом возрасте – IFN γ .
3. Стабильно невысокое содержание у детей и подростков со снижением до неопределяемых значений у взрослых – IL-4 и IL-6.
4. Максимальное содержание в возрасте до 7 лет с последующим снижением концентрации – IL-18, TNF α .
5. Бимодальный вариант с максимумом содержания в 1-3 года и повторным увеличением концентрации у взрослых – IL-1 β , IL-17.
6. Практически стабильная базовая концентрация с небольшим повышением в 1-3 года (IL-10) и 15-18 лет (IL-8).

Наблюдаемый для IL-2 вариант изменения концентрации в зависимости от возраста тесно связан с естественной динамикой изменения соотношения и численности наивных Т-лимфоцитов, а также центральных и эффекторных Т-клеток памяти. Наивные Т-лимфоциты и центральные Т-клетки памяти способны в ответ на активацию синтезировать IL-2, но в меньшей степени продуцируют другие цитокины. В отличие от наивных клеток короткоживущие эффекторы, а также эффекторные клетки памяти и терминально-дифференцированные Т-эффекторы памяти способны к синтезу большого количества эффекторных молекул (гранзимов, перфорина и цитокинов, таких как IL-4, IFN γ , IL-17 и т.д.), в меньшей степени экспрессируя IL-2. С возрастом в периферической крови происходит постепенное снижение количества наивных Т-клеток и эффекторных клеток памяти и увеличение абсолютного содержания центральных Т-клеток памяти [3], что отражается на базовом содержании IL-2 в периферической крови у детей разного возраста и взрослых.

Поскольку основными продуцентами IFN γ являются Т-хелперы и Т-цитотоксические лимфоциты первого типа, а также НК-клетки, воз-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATION OF CYTOKINES IN UNSTIMULATED PERIPHERAL BLOOD SAMPLES IN DIFFERENT AGE GROUPS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокин Cytokine	Возрастные группы Age					
	1 7-12 мес. 7-12 months n = 29	2 1-3 года 1-3 years n = 33	3 4-7 лет 4-7 years n = 29	4 8-14 лет 8-14 years n = 26	5 15-18 лет 15-18 years n = 32	6 19-45 лет 19-45 years n = 42
	пкг/мл pg/ml					
IL-2	5,92 (2, 6) 4,72-7,38	7,35 (1, 3, 5, 6) 6,50-9,96	6,10 (2, 6) 4,61-7,40	6,93 (6) 5,28-9,26	6,35 (2, 6) 4,69-7,32	4,11 (1, 2, 3, 4, 5) 1,02-5,75
IL-4	2,76 (6) 1,43-3,20	2,97 (6) 0,46-3,91	2,895 (6) 0,20-3,26	2,91 (6) 2,67-5,94	2,825 (6) 1,93-3,27	0 (1, 2, 3, 4, 5) 0,00-0,78
IL-6	2,81 (6) 0,00-3,41	3,41 (6) 2,34-5,67	2,975 (6) 1,795-5,180	3,075 (6) 2,2-5,6	2,99 (6) 2,36-4,09	0 (1, 2, 3, 4, 5) 0,00-2,04
IL-1β	0,262 (2, 6) 0,00-1,89	3,29 (1, 3, 5) 0,0-4,5	1,435 (2) 0,000-2,435	1,055 (6) 0,0-2,5	0 (2, 6) 0,000-2,715	1,7135 (1, 5) 0,867-2,640
IL-17	9,56 (5, 6) 4,55-17,60	13,2 (4, 5, 6) 5,12-16,40	8,15 (5) 5,69-12,10	6,685 (2) 4,35-10,80	5,815 (1, 2, 3) 4,515-8,100	7,5 (1, 2) 2,5-10,6
IL-18	102,48 77,7-196,7	124 (6) 78,6-174,4	139,4 (4, 5, 6) 99,92-214,20	106,7 (3) 85,94-135,20	104,7 (3) 63,83-153,20	96,16 (2, 3) 68,77-125,20
IL-10	12,25 4,58-16,04	13,24 (6) 7,97-23,79	8,96 5,12-14,62	13,95 5,15-17,53	8,94 5,24-14,89	9,58 (2) 5,46-13,90
IFNγ	0 (6) 0	0 (6) 0,00-4,61	0 (6) 0,00-3,51	0 (6) 0,0-2,6	0 (6) 0,00-3,82	3,41 (1, 2, 3, 4, 5) 0,14-7,49
TNFα	4,04 (4,5,6) 2,88-4,88	4,49 (4,5,6) 2,62-6,55	3,665 (4,6) 2,385-5,51	1,86 (1,2,3) 0,66-4,07	2,945 (1,2,6) 1,615-4	1,415 (1,2,3,5) 0,331-2,68
IL-8	5,92 3,85-11,81	5,67 2,95-9,74	5,73 2,46-10,10	4,3 (5) 3,38-6,62	7,555 (4) 3,90-10,65	4,604 1,797-9,340

Примечание: значения в скобках указывают на значимые различия в группах, p < 0,05.

Note. Values in parentheses indicate significant group differences, p < 0.05.

растные закономерности содержания этих субпопуляций лимфоцитов безусловно оказывают влияние на базовую концентрацию данного цитокина. Как показали результаты ранее проведенных исследований, в 7-12 мес. возрасте у детей значительно снижено содержание Th1 и Tc1 лимфоцитов. Далее, увеличение относительного содержания этих субпопуляции лимфоцитов происходит в логарифмической зависимости

от возраста [3], коррелируя с образованием пула Т-лимфоцитов памяти. В результате у детей и подростков IFNγ экспрессируется в низких или даже неопределяемых концентрациях в связи с низкой IFNγ-продуцирующей способностью Т-лимфоцитов и относительно небольшим содержанием эффекторных клеток памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов памяти соответствующего типа, в то время как у

взрослых их более высокое содержание обуславливает и более высокую фоновую концентрацию $IFN\gamma$. Кроме того, NK-клетки новорожденных, также являющиеся продуцентами $IFN\gamma$, мало чувствительны к активации $IL-2$ и $IL-15$ и секретируют ограниченное количество $IFN\gamma$ [1]. $IFN\gamma$ является ключевым цитокином, продуцируемыми клетками врожденной и адаптивной иммунной системы и участвующим в иммунном ответе на многие патогены в раннем детстве [19]. По-видимому, более низкая экспрессия этого цитокина у младенцев и детей младшего возраста обуславливает повышенную восприимчивость к инфекционным заболеваниям в раннем детстве и связана с неэффективностью диагностики, основанной на экспрессии данного цитокина [10, 19]. Важно отметить, что, поскольку $IFN\gamma$ включен в диагностические тесты и является, наряду с $TNF\alpha$ мишенями для лекарств, необходимо учитывать изменения в их базовой концентрации в детстве при выборе пороговых значений теста для дозирования лекарств, влияющих на эти цитокины.

Еще два цитокина, продуцируемые в том числе $Th2$ -, $Tc2$ -лимфоцитами, уровень которых также должен в какой-то степени зависеть от возрастных закономерностей содержания основных клеток-продуцентов, $IL-4$ и $IL-6$, демонстрируют стабильно невысокую базовую концентрацию у детей и подростков со снижением практически до нуля у взрослых. Как показывают проведенные ранее исследования, на фоне сниженного содержания $Th1$ - и $Tc1$ -клеток количество $Th2$ -лимфоцитов у 7-12-мес. детей соответствует возрастной норме взрослых людей, а абсолютное содержание $Tc2$ -лимфоцитов даже выше, чем во всех остальных возрастных группах. К причинам относительно более высокого содержания $Th2$ -субпопуляции у детей первого года жизни относят: апоптоз стимулированных $Th1$ -лимфоцитов, эпигенетические трансформации, влияющие на дифференцировку $Th2$ -лимфоцитов и т.д. [20]. У детей старше одного года абсолютное количество $Th2$ - и $Tc2$ -лимфоцитов (за исключением подростков с относительно более низким содержанием $Th2$ -клеток) значимо не отличается от содержания этих субпопуляций у взрослых. Однако с возрастом увеличивается содержание «антагонистических» субпопуляций $Th1$ - и $Tc1$ -лимфоцитов, оказывающих ингибирующее влияние на синтез цитокинов $Th2$ -типа. Четыре исследования изучали связанные с возрастом изменения концентраций $IL-13$, цитокина, «дублирующего» $IL-4$, также продуцируемого $Th2$ -клетками. В трех из них было показано снижение

его концентрации с возрастом [13, 16]. Кроме того, $IL-4$ и $IL-6$ продуцируются и другими типами клеток нелимфоидной природы (тучные клетки, макрофаги, клетки эндотелия и т.д.), изменение содержания и функциональной активности которых также может оказывать влияние на их концентрацию.

Близкой по характеру является динамика изменения в зависимости от возраста концентраций $IL-18$ и $TNF\alpha$. Оба этих цитокина демонстрируют максимальное содержание в возрасте до 7 лет с последующим снижением концентрации у взрослых. Оба цитокина обладают про-воспалительным действием. $TNF\alpha$ секретируют нейтрофилы, эндотелиальные и эпителиальные клетки, эозинофилы, тучные клетки, В- и Т-лимфоциты при их вовлечении в воспалительный процесс [7]. В свою очередь $IL-18$ синтезируется в том числе дендритными клетками. Но основными продуцентами данных цитокинов являются моноциты и макрофаги. В этой связи показательной является динамика изменения численности моноцитов периферической крови в разных возрастных группах. Если абсолютное содержание гранулоцитов, а также содержание фагоцитирующих гранулоцитов (функционально активных) значимо не отличается у детей разных возрастных групп и взрослых, то содержание моноцитов повышено у детей младшего возраста, отличаясь от показателей в старших возрастных группах. Активность врожденного иммунитета, по-видимому, компенсирует у детей младшего возраста функциональную незрелость системы адаптивного иммунитета.

Бимодальным вариантом с максимумом содержания в 1-3 года и повторным увеличением концентрации у взрослых характеризуется концентрация $IL-1\beta$ и $IL-17$. Основными продуцентами обоих цитокинов являются моноциты-макрофаги, кроме того, $IL-17$ продуцируется также $Th17$ -субпопуляций Т-хелперов и подобной субпопуляций Т-цитотоксических лимфоцитов. Повышенное содержание данных цитокинов у детей младшего возраста, по-видимому, также связано с более высоким содержанием моноцитов. Существует также мнение о том, что с возрастом происходит постепенный прирост субпопуляции $Th17$ по мере формирования пула Т-клеток памяти $Th17$ -типа [5]. В свою очередь под влиянием $IL-17$ макрофаги усиленно синтезируют и выделяют провоспалительные цитокины, в частности $IL-1\beta$, что находится в прямой зависимости от дозы исследуемого цитокина [6].

В целом, возраст 1-3 года характеризуется максимальным содержанием целого ряда анали-

зируемых цитокинов, включая IL-2, IL-4, IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-17 и TNF α . В этом возрасте повышается антигенная нагрузка (свобода передвижения, общение со взрослыми, детьми). Созревают Th-клетки и повышается чувствительность В-лимфоцитов к действию цитокинов [4].

Минимальные уровни цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-18, TNF α , наблюдаются во взрослом возрасте с 19 до 45 лет, тогда как IL-17 и IL-1 β демонстрируют свой минимум в возрасте 15-18 лет.

Практически стабильная базовая концентрация вне зависимости от возраста характерна для IL-10 и IL-8. Анализ опубликованных данных ранее проведенных исследований показал, что концентрация IL-10 в нестимулированных образцах не характеризуется возрастной ассоциацией, однако 6 из 11 исследований, исследующих стимулированные образцы, показали связанное с возрастом снижение под действием некоторых активаторов [9, 15]. Важнейшей биологической функцией IL-8 является высочайшая активность хемоаттрактанта для нейтрофилов, базофилов и Т-лимфоцитов. Он стимулирует секрецию гистамина базофилами и является одним из стимуляторов ангиогенеза. IL-8 вызывает экспрессию молекул клеточной адгезии и усиливает прилипание нейтрофилов к эндотелиальным клеткам (с последующей их дегрануляцией) и субэндотелиальным матричным белкам, что свидетельствует о его основной роли в опосредовании воспалительного ответа [2].

Сравнение полученных нами результатов с данными подобных исследований провести затруднительно по ряду причин. Во-первых, многие цитокины экспрессируются в низких или даже неопределяемых концентрациях (IFN γ). Кроме того, в разных исследованиях сильно различается возрастной диапазон обследуемых групп от младенцев до 6 месяцев, детей до 5 лет, только подростков или охватывающих широкий возрастной диапазон [8, 14, 17]. В исследованиях с участием детей узкого возрастного диапазона анализ влияния возраста на содержание цитокинов обычно не проводился. К сожалению исследования, в которых использовались как стимулированные, так и нестимулированные образцы, в основном описывают линейные закономерности, поскольку результаты анализировались в более крупных возрастных группах, что не позволяет анализировать более сложные образцы экспрессии цитокинов.

Выводы

1. Анализ полученных данных позволил выделить различные паттерны изменения базовой концентрации определяемых цитокинов в зависимости от возраста.

2. Максимальное базовое содержание большинства анализируемых цитокинов в нестимулированных образцах периферической крови, включая IL-2, IL-4, IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-17 и TNF α , характеризует детей в возрасте 1-3 года.

Список литературы / References

1. Абатуров А.Е., Агафонова Е.А., Абатурова Н.И., Бабич В.Л. Эволюция и возрастные особенности врожденной и адаптивной иммунной системы // Современная педиатрия, 2016. Т. 3, № 74. С. 56-61. [Abaturov A.E., Agafonova E.A., Abaturova N.I., Babich V.L. Evolution and age characteristics of the innate and adaptive immune system. *Sovremennaya pediatriya = Modern Pediatrics*, Vol. 3, no. 74, pp. 56-61. (In Russ.)]
2. Ешмолов С.Н., Ситников И.Г., Мельникова И.М. Цитокины ФНО- α , ИФН- γ , ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-8 и их роль в иммунном ответе при инфекционном поражении ЦНС у детей // Детские инфекции, 2018. Т. 17, № 1. С. 17-22. [Eshmolov S.N., Sitnikov I.G., Melnikova I.M. The Role of Cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-4, IL-8 in the Immune Response in Infectious Lesions of CNS in Children. *Detskiye infektsii = Children Infections*, 2018, Vol. 17, no. 1, pp. 17-22. (In Russ.)]
3. Лагерева Ю.Г., Меньшиков С.В., Савинова Т.Л., Бейкин Я.Б., Черешнев В.А. Оценка содержания различных Т-эффекторных субпопуляций у детей и взрослых методом внутриклеточного окрашивания цитокинов // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 295-304. [Lagereva Yu.G., Menshikov S.V., Savinova T.L., Beikin Ya.B., Chereshev V.A. Assessment of the content of various T-effector subpopulations in children and adults by intracellular cytokine staining. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 295-304. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-295-304.
4. Снимщикова И.А. Курс лекций по частной иммунологии. Орел: ОГУ, 2015. 120 с. [Snimshchikova I.A. A course of lectures on private immunology]. Orel: Oryol State University, 2015. 120 p.
5. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Петричук С.В., Закиров Р.Ш., Курбатова О.В., Копыльцова Е.А., Комах Ю.А. Изменение уровня субпопуляций Т-регуляторных клеток и Т-хелперов в периферической крови здоровых людей в зависимости от возраста // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 409-420.

[Toptygina A.P., Semikina E.L., Petrichuk S.V., Zakirov R.Sh., Kurbatova O.V., Kopyltsova E.A., Komakh Yu.A. Age-dependent changes of T-regulatory and Th17 subset levels in peripheral blood from healthy humans. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 409-420. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-409-420.

6. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Линькова Н.С., Проняева В.Е. Влияние пептидных биорегуляторов и цитокинов на продолжительность жизни и возрастные изменения системы гемостаза // Успехи физиологических наук, 2013. Т. 44, № 1. С. 39-54. [Khavinson V.Kh., Kuznik B.I., Linkova N.S., Pronyaeva V.E. Effect of Peptide Bioregulators and Cytokines on Life Span and Age-Related Changes of Hemostasis. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk = Advances in Physiological Sciences*, 2013, Vol. 44, no. 1, pp. 39-54. (In Russ.)]

7. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. Yarilin A.A. Immunology: tutorial. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.

8. Berdat P.A., Wehrle T.J., Küng A., Achermann F., Sutter M., Carrel T.P., Nydegger U.E. Agespecific analysis of normal cytokine levels in healthy infants. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003, Vol. 41, no. 10, pp. 1335-1339.

9. Burl S., Townend J., Njie-Jobe J., Cox M., Adetifa U.J., Touray E., Philbin V. J., Mancuso C., Kampmann B., Whittle H., Jaye A., Flanagan K.L., Levy O. Age-dependent maturation of Toll-like receptor-mediated cytokine responses in Gambian infants. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 4, e18185. doi: 10.1371/journal.pone.0018185.

10. Connell T.G., Tebruegge M., Ritz N., Bryant P.A., Leslie D., Curtis N. Indeterminate interferon-gamma release assay results in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2010, Vol. 29, no. 3, pp. 285-286.

11. Decker M.L., Gotta V., Wellmann S., Ritz N. Cytokine profiling in healthy children shows association of age with cytokine concentrations. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 17842, pp. 1-10.

12. Decker M.L., Grobusch M.P., Ritz N. Influence of age and other factors on cytokine expression profiles in healthy children – a systematic review. *Front. Pediatr.*, 2017, Vol. 5, no. 255, pp. 1-12.

13. Djuardi Y., Supali T., Wibowo H., Heijmans B.T., Deelen J., Slagboom E.P., Houwing-Duistermaat J.J., Sartono E., Yazdanbakhsh M. Maternal and child cytokine relationship in early life is not altered by cytokine gene polymorphisms. *Genes Immun.*, 2016, Vol. 17, no. 7, pp. 380-385.

14. Dorn L.D., Gayles J.G., Engeland C.G., Houts R., Cizza G., Denson L.A. Cytokine patterns in healthy adolescent girls: heterogeneity captured by variable and person-centered statistical strategies. *Psychosom. Med.*, 2016, Vol. 78, no. 6, pp. 646-656.

15. Eriksson M., Sartono E., Martins C.L., Balé C., Garly M.L., Whittle H., Aaby P., Pedersen B.K., Yazdanbakhsh M., Erikstrup C., Benn C.S. A comparison of *ex vivo* cytokine production in venous and capillary blood. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 150, no. 3, pp. 469-476.

16. Figueiredo C.A., Alcântara-Neves N.M., Veiga R., Amorim L.D., Dattoli V., Mendonça L.R., Junqueira S., Genser B., Santos M., de Carvalho L.C.P., Cooper P.J., Rodrigues L., Barreto M. L. Spontaneous cytokine production in children according to biological characteristics and environmental exposures. *Environ. Health Perspect.*, 2009, Vol. 117, no. 5, pp. 845-849.

17. Kleiner G., Marcuzzi A., Zanin V., Monasta L., Zauli G. Cytokine levels in the serum of healthy subjects. *Mediators Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, 434010. doi: 10.1155/2013/434010.

18. Kothur K., Wienholt L., Brilot F., Dale R.C. CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders: a systematic review. *Cytokine*, 2016, Vol. 77, pp. 227-237.

19. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 5, pp. 379-390.

20. Li L., Lee H.H., Bell J.J., Gregg R.K., Ellis J.S., Gessner A., Zaghouni H. IL-4 utilizes an alternative receptor to drive apoptosis of Th1 cells and skews neonatal immunity toward Th2. *Immunity*, 2004, Vol. 20, no. 4, pp. 429-440.

Авторы:

Лагерева Ю.Г. – д.б.н., заведующая лабораторией иммунологии ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр»; старший научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Lagereva Yu.G., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Immunology, Clinical Diagnostic Center; Leading Research Associate, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Палицына О.В. — студент кафедры медицинской биохимии и биофизики биологического факультета Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Palitsyna O.V., Student, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Faculty of Biology, Institute of Natural Sciences and Mathematics, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Ищенко Н.В. — врач лаборатории иммунологии ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр», г. Екатеринбург, Россия

Ischenko N.V., Doctor, Laboratory of Immunology, Clinical Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 17.06.2021

СВЯЗЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СПЕРМОГРАММЫ МУЖЧИН С ХРОНИЧЕСКИМ БАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРОСТАТИТОМ С УРОВНЕМ ЛОКАЛЬНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ФАКТОРОВ

**Бекпергенова А.В., Бондаренко Т.А., Перунова Н.Б.,
Челпаченко О.Е., Никифоров И.А.**

ФГБУН «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. При хроническом бактериальном простатите прямое или опосредованное воздействие на качество спермы могут оказывать белковые компоненты мукозного иммунитета, включая лактоферрин, секреторный иммуноглобулин А и лизоцим. В связи с чем, актуальной задачей является исследование взаимосвязи показателей спермограммы у здоровых мужчин и пациентов с хроническим бактериальным простатитом с уровнем антимикробных факторов спермоплазмы.

В работе представлены результаты исследования образцов спермы от 72 мужчин в возрасте от 20 до 45 лет. Образцы были собраны в стерильные контейнеры путем мастурбации после минимального периода воздержания в 3-5 дней. Ни один из пациентов ранее не принимал антибиотики. Пациенты с инфекциями, передаваемыми половым путем, были исключены из исследования. Пациенты были разделены на две группы – условно здоровые мужчины (n = 30) и пациенты с хроническим бактериальным простатитом (n = 42). Получение семенной плазмы осуществлялось при двухэтапном центрифугировании эякулята (1000-3000 об/мин) в течение 30 мин. Оценку уровня лактоферрина и секреторного иммуноглобулина А в семенной плазме проводили ИФА («Вектор-Бест», г. Новосибирск), лизоцима – турбидиметрическим методом. Учет результатов регистрировали на фотометре Multiskan Labsystems (Финляндия) при длине волны 492 нм. Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, США). Для оценки характера связи между изучаемыми параметрами использовали метод расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена. При использовании коэффициента ранговой корреляции оценивали тесноту связи между признаками, считая значения коэффициента, равные 0,3 и менее, показателями слабой связи; значения более 0,4, но менее 0,7 – показателями умеренной связи, а значения 0,7 и более – показателями высокой связи.

Установлено, что повышенный уровень лактоферрина при некоторых лейкоцитоспермиях, олигоспермиях и астеноспермиях сопровождается снижением количества лейкоцитов, повышением подвижности сперматозоидов, сохранением морфологии сперматозоидов, что свидетельствовало об улучшении качества спермы. Учитывая универсальные биологические свойства лактоферрина и его рецепторов, выявленное в работе увеличение количества положительных корреляционных связей у

Адрес для переписки:

Перунова Наталья Борисовна
ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук»
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11.
Тел.: 8 (922) 555-30-80.
E-mail: perunovanb@gmail.com

Address for correspondence:

Perunova Natalia B.
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis
460000, Russian Federation, Orenburg, Pionerskaya str., 11.
Phone: 7 (922) 555-30-80.
E-mail: perunovanb@gmail.com

Образец цитирования:

А.В. Бекпергенова, Т.А. Бондаренко, Н.Б. Перунова, О.Е. Челпаченко, И.А. Никифоров «Связь показателей спермограммы мужчин с хроническим бактериальным простатитом с уровнем локальных антимикробных факторов» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 291-296.
doi: 10.46235/1028-7221-1029-RBS
© Бекпергенова А.В. и соавт., 2021

For citation:

A.V. Bekpergenova, T.A. Bondarenko, N.B. Perunova, O.E. Chelpachenko, I.A. Nikiforov "Relationships between spermogram indexes in males with chronic bacterial prostatitis and the levels of local antimicrobial factors", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 291-296.
doi: 10.46235/1028-7221-1029-RBS
DOI: 10.46235/1028-7221-1029-RBS

пациентов с хроническим бактериальным простатитом между уровнем лактоферрина и параметрами спермограммы, по сравнению со здоровыми мужчинами, отражает высокую диагностическую ценность данного маркера. Таким образом, диагностическая ценность параметров спермограммы определяется не только их количественными значениями, но и видом корреляционных связей с уровнем антимикробных факторов, в частности лактоферрина, секреторного иммуноглобулина А и лизоцима.

Ключевые слова: спермограмма, хронический бактериальный простатит, антимикробные факторы, иммуноглобулин А, лактоферрин, лизоцим, корреляция

RELATIONSHIPS BETWEEN SPERMOGRAM INDEXES IN MALES WITH CHRONIC BACTERIAL PROSTATITIS AND THE LEVELS OF LOCAL ANTIMICROBIAL FACTORS

Bekpergenova A.V., Bondarenko T.A., Perunova N.B., Chelpachenko O.E., Nikiforov I.A.

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Abstract. Sperm quality can be directly or indirectly affected in chronic bacterial prostatitis, due to protein components of mucosal immunity, including lactoferrin, secretory immunoglobulin A, and lysozyme. Therefore, a search for relationships between spermogram indices and levels of antimicrobial factors in sperm plasma presents an urgent task in healthy men and patients with chronic bacterial prostatitis. The present paper contains the results of a study of sperm samples from 72 men aged 20 to 45 years. Samples were collected in sterile containers by masturbation after a minimum abstinence period of 3-5 days. None of the patients had previously taken antibiotics. Patients with sexually transmitted infections were excluded from the study. The patients were divided into two groups – conditionally healthy males ($n = 30$) and patients with chronic bacterial prostatitis ($n = 42$). Seminal plasma was obtained by two-stage centrifugation of ejaculate samples (1000-3000 rpm) for 30 minutes. Evaluation of lactoferrin and secretory immunoglobulin A levels in seminal plasma was carried out by ELISA technique (Vector-Best, Novosibirsk), lysozyme – by turbidimetric method. The results were recorded with Multiscan Labsystems photometer (Finland) at 492-nm wavelength. Statistical evaluation of the obtained data was carried out using Statistica 10 package (StatSoft, USA). To assess the kind of relationships between the studied parameters, the Spearman's rank correlation quotient was applied. When using the Spearman rank-correlation approach, the strength of the relationships between the features was assessed, considering the values of < 0.3 as a weak connection; quotient levels of 0.4 to 0.7 as indexes of moderate relationships, and values of 0.7 and more, as high connection indexes.

We have found that an increased level of lactoferrin in some cases of leukocytospermia, oligospermia, and asthenospermia is accompanied by decreased number of leukocytes, increased sperm motility, preservation of sperm morphology, thus suggesting improvement of the sperm quality. Considering universal biological properties of lactoferrin and its receptors, an increased number of positive correlations between level lactoferrin level and spermogram parameters was shown in the patients with chronic bacterial prostatitis, as compared with healthy males, thus presuming high diagnostic value of this marker. Hence, diagnostic value of spermogram parameters is determined not only by their quantitative values, but also by the types of correlations with antimicrobial factor levels, in particular, with those of lactoferrin, secretory immunoglobulin A and lysozyme.

Keywords: spermogram, chronic bacterial prostatitis, antimicrobial factors, immunoglobulin A, lactoferrin, lysozyme, correlation

Введение

Активация врожденной и адаптивной иммунной систем, вызванная инфекцией или другими воспалительными факторами, оказывает негативное воздействие на функцию мужского репродуктивного тракта, приводя к супрессии про-

дукции андрогенов, нарушению сперматогенеза и к повреждению тканей с развитием аутоиммунной патологии и бесплодия [2]. При хроническом бактериальном простатите (ХБП) прямое или опосредованное воздействие на качество спермы могут оказывать белковые компоненты мукозного иммунитета, включая лактоферрин (ЛФ), се-

креторный иммуноглобулин А (sIgA) и лизоцим. В связи с чем, актуальной задачей является исследование взаимосвязи показателей спермограммы у здоровых мужчин и пациентов с ХБП с уровнем антимикробных факторов спермоплазмы.

Целью работы явилась оценка характера корреляционных связей между параметрами спермограммы и содержанием антимикробных факторов в семенной плазме мужчин с хроническим бактериальным простатитом и условно здоровых лиц.

Материалы и методы

Образцы спермы 72 мужчин, посещающих клинику по лечению ХБП в ГАУЗ «Оренбургская областная клиническая больница № 1», г. Оренбург, Россия, были собраны в период исследования с августа 2018 года по июль 2019 года. Образцы были собраны в стерильные контейнеры путем мастурбации после минимального периода воздержания в 3–5 дней. Ни один из пациентов ранее не принимал антибиотики. Пациенты с инфекциями, передаваемыми половым путем, были исключены из исследования.

Параметры спермы, такие как внешний вид, объем, рН, вязкость, разжижение, количество, подвижность сперматозоидов, морфология, наличие других клеток, таких как эпителиальные или круглые клетки, агглютинация сперматозоидов и др., регистрировались в соответствии с рекомендациями ВОЗ [7]. Пациенты были разделены на две группы – условно здоровые мужчины ($n = 30$) и пациенты с ХБП ($n = 42$). Возраст обследованных лиц варьировал от 20 до 45 лет.

Получение семенной плазмы осуществлялось при двухэтапном центрифугировании эякулята (1000–3000 об/мин) в течение 30 мин. Оценка уровня лактоферрина (ЛФ) и секреторного иммуноглобулина А (sIgA) в семенной плазме проводили ИФА («Вектор-Бест», г. Новосибирск), лизоцима – турбидиметрическим методом. Учет результатов регистрировали на фотометре Multiskan LabSystems (Финляндия) при длине волны 492 нм.

Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, США). Для оценки характера связи между изучаемыми параметрами использовали метод расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена. При использовании коэффициента ранговой корреляции оценивали тесноту связи между признаками, считая значения коэффициента, равные 0,3 и менее, показателями слабой связи; значения более 0,4, но менее 0,7 – показателями умеренной связи, а значения 0,7 и более – показателями высокой связи.

Результаты и обсуждение

Результаты корреляционного анализа между показателями спермограммы и антимикробными факторами: ЛФ, sIgA и лизоцимом представлены в таблице 1. У условно здоровых пациентов между sIgA и такими показателями, как общее количество сперматозоидов в 1 мл, подвижность сперматозоидов и наличие прогрессивно-подвижных сперматозоидов, было обнаружено наличие умеренной положительной корреляции. Кроме того, умеренная положительная связь выявлялась между общим количеством сперматозоидов, прогрессивно-подвижными сперматозоидами и уровнем лизоцима. Также значимая корреляционная связь выявлялась между уровнем лизоцима и количеством круглых клеток в эякуляте здоровых мужчин ($p < 0,05$).

Умеренно отрицательная корреляционная связь выявлялась между количеством сперматозоидов в 1 мл эякулята, неподвижными сперматозоидами и уровнем sIgA.

Что касается пациентов с ХБП, то, в отличие от условно здоровых лиц, отмечается увеличение количества положительных связей между параметрами спермограммы и ЛФ. В частности, слабая связь обнаруживалась между уровнем ЛФ и общим количеством сперматозоидов, количеством неподвижных сперматозоидов, круглых клеток и клеток сперматогенеза. Умеренная корреляционная зависимость наблюдалась между уровнем ЛФ в спермоплазме и количеством сперматозоидов в 1 мл эякулята ($p < 0,05$). Слабая отрицательная связь отмечалась между количеством подвижных сперматозоидов, непрогрессивно-подвижными сперматозоидами и уровнем ЛФ; между уровнем лизоцима и количеством прогрессивно-подвижных сперматозоидов ($p < 0,05$). Умеренная корреляционная связь наблюдалась между уровнем sIgA и количеством круглых клеток.

Исследование антимикробных факторов белковой природы семенной плазмы показало участие их в важнейших биологических функциях, в том числе в контроле физиологии сперматозоидов, подвижности, морфологии, концентрации и защите от окисления [1]. Очевидно, что изменения в составе и уровне антимикробных факторов семенной плазмы могут свидетельствовать о дисфункции половых путей. Простата является частью общей иммунной системы слизистых, и ее эпителиальные клетки непосредственно участвуют в трансцитозе секреторной формы IgA [5], и его уровень в семенной плазме повышается при простатите, что отражается в нашей работе значимой положительной корреляцией sIgA и количеством эпителиальных клеток в спермоплазме. Увеличение количества положительных корреляционных связей у пациентов с ХБП между уровнем ЛФ и

ТАБЛИЦА 1. КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ПАРАМЕТРАМИ СПЕРМОГРАММЫ И АНТИМИКРОБНЫМИ ФАКТОРАМИ В СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЕ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН И ПАЦИЕНТОВ С ХБП

TABLE 1. CORRELATION COEFFICIENTS BETWEEN SPERMOGRAM PARAMETERS AND ANTIMICROBIAL FACTORS IN THE SEMEN PLASMA OF CONVENTIONALLY HEALTHY MEN AND PATIENTS WITH CBP

Показатели спермограммы Sperm indicators	Условно здоровые лица Conditionally healthy persons			Пациенты с ХБП Patients with CBP		
	Лактоферрин Lactoferrin	slgA slgA	Лизоцим Lysozyme	Лактоферрин Lactoferrin	slgA slgA	Лизоцим Lysozyme
Объем семенной жидкости Semen volume	-0,274	0,103	-0,076	0,235	0,137	-0,228
Количество сперматозоидов в 1 мл Sperm count in 1 ml	-0,273	-0,331*	-0,156	0,427*	-0,104	0,108
Общее количество сперматозоидов Total sperm count	-0,052	0,470*	0,687*	0,337*	0,051	-0,052
Подвижность сперматозоидов Sperm motility	0,123	0,414*	0,077	-0,362*	-0,041	0,046
Прогрессивно-подвижные сперматозоиды (PR) Progressive motility (PR)	0,002	0,570*	0,305*	0,270	0,282	-0,363*
Непрогрессивно-подвижные сперматозоиды (NP) Non-progressive motility (NP)	0,319*	0,283	0,062	-0,344*	-0,264	0,338*
Неподвижные сперматозоиды (IM) Immotility (IM)	-0,087	-0,565*	-0,271	0,362*	0,041	-0,046
Количество круглых клеток Number of round cells	-0,200	0,059	0,530*	0,382*	0,522*	-0,126
Количество лейкоцитов в семенной жидкости Number of leukocytes in semen	0,233	-0,227	0,173	0,263	0,368*	-0,011
Клетки сперматогенеза Spermatogenesis cells	-0,276	0,213	-0,108	0,377*	0,300*	0,032

параметрами спермограммы, по сравнению со здоровыми мужчинами, отражает диагностическую важность этого маркера, поскольку ЛФ секретируется семенными пузырьками и в избытке содержится в семенной плазме человека и на поверхности сперматозоидов. ЛФ участвует в поддержании нормальной структуры и подвижности сперматозоидов, модуляции состава, качества спермы во время созревания и миграции

сперматозоидов через мужские половые пути [3]. Установлено, что повышенное содержание ЛФ при некоторых лейкоцитоспермиях, олигоспермиях и астеноспермиях сопровождается снижением концентрации лейкоцитов, повышением подвижности сперматозоидов, сохранением морфологии сперматозоидов, что свидетельствует об улучшении качества спермы [3]. Важнейшую роль в реализации функций ЛФ выполняет его

рецепторы, экспрессирующиеся в яйчке и прикрепляющиеся к мембране сперматозоидов гликофосфатидилинозитолом во время сперматогенеза [6]. Учитывая универсальные биологические свойства ЛФ и его рецепторов, выявленное в работе увеличение количества положительных корреляционных связей у пациентов с ХБП между уровнем ЛФ и параметрами спермограммы, по сравнению со здоровыми мужчинами, отражает высокую диагностическую ценность данного маркера. Очевидно, что выявление корреляционной связи лизоцима с показателями состава спермы и ЛФ отражает их известный синергид-

ный эффект воздействия на микробиоту данного биотопа и подтверждает свойство лизоцима как маркера наличия флогистических состояний [4].

Выводы

Таким образом, диагностическая ценность параметров спермограммы определяется не только их количественными значениями, но и видом корреляционных связей с уровнем антимикробных факторов, в частности ЛФ и sIgA, и лизоцима.

Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы / References

1. de Lazari F.L., Sontag E.R., Schneider A., Moura A.A.A., Vasconcelos F.R., Nagano C.S., Mattos R.C., Jobim M.I.M., Bustamante-Filho I.C. Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility and morphology in boars. *Andrologia*, 2019, Vol. 51, e13222. doi: 10.1111/and.13222.
2. Hedger M.P. The immunophysiology of male reproduction. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 2015, pp. 805-892.
3. Piomboni P., Gambera L., Serafini F., Campanella G., Morgante G., de Leo V. Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. *Asian J. Androl.* 2008, Vol. 10, no. 2, pp. 201-206.
4. Santoriello D., Andal L.M., Cox R., D'Agati V.D., Markowitz G.S. Lysozyme-induced nephropathy. *Kidney Int. Rep.*, 2017, Vol. 2, pp. 84-88.
5. Silva J.A.F., Biancardi M.F., Stach-Machado D.R., Reis L.O., Sant'Anna O.A., Carvalho H.F. The origin of prostate gland-secreted IgA and IgG. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 16488. doi: 10.1038/s41598-017-16717-3.
6. Wang P., Liu B., Wang Z., Niu X., Su S., Zhang W., Wang X. Characterization of lactoferrin receptor on human spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online*, 2011, Vol. 22, no. 2, pp. 155-161.
7. World Health Organization (WHO). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.

Авторы:

Бекпергенова А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук» — обособленного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Оренбург, Россия

Бондаренко Т.А. — научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук» — обособленного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Оренбург, Россия

Authors:

Bekpergenova A.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Bondarenko T.A., Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Перунова Н.Б. — д.м.н., профессор РАН, заведующая лабораторией инфекционной симбиологии ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук» — обособленного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Оренбург, Россия

Челпаченко О.Е. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук» — обособленного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Оренбург, Россия

Никифоров И.А. — к.г.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук» — обособленного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Оренбург, Россия

Perunova N.B., PhD, MD (Medicine), Professor of RAS, Leading Research Associate, Head, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Chelpachenko O.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Nikiforov I.A., PhD (Geology/Mineralogy), Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Поступила 29.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 29.05.2021
Accepted 17.06.2021

ЛОКАЛЬНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А У ПАЦИЕНТОВ С АДЕНОИДИТОМ, РИНОСИСУСИТОМ И ОБОСТРЕНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ГНОЙНОГО СРЕДНЕГО ОТИТА НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ

Коркмазов М.Ю., Дубинец И.Д., Ленгина М.А., Солодовник А.В.

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

Резюме. Одним из актуальных вопросов современной оториноларингологии является совершенствование терапевтического пособия. В этом контексте статья посвящена изучению стимулирующего влияния физических методов воздействия на концентрации секреторного IgA в назальном секрете, с устьев слуховых труб и носоглотки у пациентов, страдающих аденоидитом, риносинуситом и обострением хронического среднего отита. Повышение клинико-иммунологической эффективности при использовании низкочастотной ультразвуковой кавитации в сочетании с фотохромотерапией в комплексном лечении указанных патологических состояний оценивали в динамике по концентрации уровней секреторного иммуноглобулина А назальном секрете методом иммуноферментного анализа (тест-системы «Вектор-Бест», Россия).

Цель — повышение клинико-иммунологической эффективности лечения пациентов с хроническим аденоидитом, риносинуситом и обострением хронического гнойного среднего отита при использовании в комплексной терапии низкочастотной ультразвуковой кавитации и фотохромотерапии.

В исследовании приняло участие 54 пациента. Из них контрольную группу составили 25 пациентов, получивших общепринятое лечение (топические и системные антибактериальные и противовоспалительные препараты, разгрузочные и элиминационные процедуры, симптоматическую и общеукрепляющую терапию) и основную группу из 29 человек, которым в дополнении к этиотропной терапии применяли низкочастотное ультразвуковое кавитационное орошение полости носа с последующим курсом фотохромотерапии. Оценку эффективности лечения проводили исследованием ба-

Адрес для переписки:

*Коркмазов Мусос Юсуфович
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (932) 010-00-06.
E-mail: Korkmazov74@gmail.com*

Address for correspondence:

*Korkmazov Musos Yu.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (932) 010-00-06.
E-mail: Korkmazov74@gmail.com*

Образец цитирования:

*М.Ю. Коркмазов, И.Д. Дубинец, М.А. Ленгина, А.В. Солодовник «Локальные концентрации секреторного иммуноглобулина А у пациентов с аденоидитом, риносинуситом и обострением хронического гнойного среднего отита на фоне применения в комплексной терапии физических методов воздействия» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 297-304.
doi: 10.46235/1028-7221-999-LCO
© Коркмазов М.Ю. и соавт., 2021*

For citation:

*M. Yu. Korkmazov, I. D. Dubinets, M. A. Lengina, A. B. Solodovnik "Local concentrations of secretory immunoglobulin A in patients with adenoiditis, rhinosinusitis and exacerbation of chronic purulent otitis media when using physiatric methods in complex therapy", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 297-304.
doi: 10.46235/1028-7221-999-LCO
DOI: 10.46235/1028-7221-999-LCO*

рьевого состояния слизистой оболочки полости носа по уровням концентрации секреторного IgA методом иммуноферментного анализа.

Использование низкочастотной ультразвуковой кавитации в сочетании с фотохромотерапией как дополнение к этиотропному лечению у пациентов с аденоидитом, риносинуситом и обострением хронического среднего отита потенцирует повышение концентрации секреторного IgA слизистой оболочки полости носа и устья слуховой трубы в более ранние сроки по сравнению со стандартными методами лечения. Тенденция к увеличению IgA к 14 суткам достигла максимальных цифр и незначительно снизилась через 1 месяц.

Увеличение в ранние сроки концентрации секреторного IgA в назальном секрете и устья слуховой трубы, положительный клинический результат лечения наблюдается при использовании в этиотропной терапии низкочастотной ультразвуковой кавитации в сочетании с фотохромотерапией у пациентов с аденоидитом, риносинуситом и обострением хронического среднего отита. Полученные результаты в определенной мере обосновывают возможность внедрения указанных физических методов воздействия в комплексную этиотропную терапию как неинвазивный и эффективный метод.

Ключевые слова: хронический гнойный аденоидит, риносинусит, средний отит, иммуноглобулины, физиотерапия, низкочастотная ультразвуковая кавитация

LOCAL CONCENTRATIONS OF SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A IN PATIENTS WITH ADENOIDITIS, RHINOSINUSITIS AND EXACERBATION OF CHRONIC PURULENT OTITIS MEDIA WHEN USING PHYSIATRIC METHODS IN COMPLEX THERAPY

Korkmazov M.Yu., Dubinets I.D., Lengina M.A., Solodovnik A.B.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Improvement of therapeutic tools is one of topical issues in modern otorhinolaryngology. The article is devoted to the study of the stimulating effect of physical therapy on the concentrations of secretory IgA in nasal secretions, from the entries of auditory tubes and nasopharynx in the patients suffering from adenoiditis, rhinosinusitis, and exacerbation of chronic otitis media. The increase in clinical and immunological efficiency when using low-frequency ultrasonic cavitation therapy in combination with photochromotherapy in combined treatment of these conditions was evaluated in dynamics by measuring concentrations of secretory immunoglobulin levels in nasal secretions using enzyme immunoassay technique (Vector-Best, Russia). The purpose of this study was to improve clinical and immunological effectiveness of treatment of patients with chronic adenoiditis, sinusitis and exacerbation of chronic purulent otitis media when using low-frequency ultrasound cavitation and photochromotherapy in complex therapy. The study involved 54 patients. The control group consisted of 25 patients who received conventional treatment (topical and systemic antibacterial and anti-inflammatory drugs, unloading and elimination procedures, symptomatic and restorative therapy) and the main group of 29 people who, in addition to etiotropic therapy, received low-frequency ultrasound cavitation irrigation of the nasal cavity followed by a course of photochromotherapy. Evaluation of the effectiveness of treatment was carried out by studying the barrier state of the nasal mucosa by the levels of secretory IgA concentration by the method of enzyme immunoassay. The low-frequency ultrasound cavitation in combination with photochromotherapy as an adjunct to etiotropic treatment in patients with adenoiditis, rhinosinusitis and exacerbation of chronic otitis media promotes an earlier increase in secretory IgA concentration of nasal mucosa and entry of the auditory tube when compared to standard treatment methods. The trend to IgA increase by 14 days reached maximal values and was slightly decreased month later. An early increase in the concentration of secretory IgA in nasal secretions and the entry of auditory tube, and positive clinical results of treatment are observed when low-frequency

ultrasound cavitation is used in etiotropic therapy in combination with photochromotherapy in patients with adenoiditis, rhinosinusitis and exacerbation of chronic otitis media. The results substantiate the opportunity of introducing these physical methods of physical therapy into complex etiotropic therapy, as a non-invasive and effective method.

Keywords: chronic purulent adenoiditis, rhinosinusitis, otitis media, immunoglobulins, physiotherapy, low-frequency ultrasound cavitation

Введение

Одним из наиболее важных и трудноразрешимых вопросов практической оториноларингологии являются хронические гнойно-воспалительные заболевания среднего уха (ХГСО). Описываемые разделения, на хронический эптитимпано-антральный и туботимпанальный гнойные средние отиты, в Международной классификации болезней (МКБ-10), как правило отражают объемы охвата воспалительным процессом мукоперисто барабанной полости и других отделов среднего уха [8, 11]. По распространенности, как показывает мировая статистика, на долю ХГСО приходится около 27% среди всех хронических заболеваний среднего уха и до 2% всех патологических состояний ЛОР органов [11, 15]. Проведенный эпидемиологический анализ по Челябинской области выявил заболеваемость ХГСО в пределах 39,2 случая на 1000 среди взрослого населения, который соответствует средним статистическим данным РФ [3]. Другим важным составляющим, приводящим вялотекущему, затяжному течению с развитием прогрессирующей тугоухости при ХГСО, являются нарушения вентилиционной и дренажной функции слуховой трубы [10, 16]. Как правило, дисфункция слуховых труб (евстахиит, сальпингоотит, туботит и т.д.) развиваются при воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей (ВДП), например при острых риносинуситах, хронических аденоидитах [9, 12, 16].

В последних определениях, описанных в европейских рекомендациях по лечению риносинусита и назальных полипов (EPOS 2020), острый риносинусит (ОРС) относится к заболеваниям полости носа и околоносовых пазух гнойно-воспалительного генеза продолжительностью до 12 недель, а хронический – более 12 недель. Клинически риносинуситы выражаются триадой симптомов: затруднением носового дыхания, сопровождающееся заложенностью носа, цефалгией, ринореей и дизосмией [9]. Являясь этиологически основным триггерным механизмом развития ОРС, респираторная вирусная инфекция, повреждая и угнетая функциональную активность

мерцательного эпителия и бокаловидных клеток слизистых оболочек полости носа и слуховой трубы приводит к снижению мукоцилиарного клиренса, способствует бактериальной контаминации полостей, где ведущее место занимают *Streptococcus pneumoniae*, последующие места занимают *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* и *Moraxella catarrhalis* [6, 9, 12].

Ситуация ухудшается и требует значительных затрат при наличии у пациента в анамнезе патологии лимфоглоточного кольца в виде гипертрофии аденоидов или хронического гнойного аденоидита [13]. Как правило, разрастания гипертрофированной ткани миндалин, нарушая аэродинамику полости носа, приводят не только к носовой обструкции, но и к застойным явлениям всей слизистой оболочки. В дальнейшем застойные процессы, перерастая в стойкий воспалительный отек слизистых оболочек, приводят к закрытию соустьев околоносовых пазух, дисфункции слуховых труб, развиваются острые, переходящие в хронические – риносинуситы, аденоидиты, отиты, евстахииты и т.д. [2, 13]. Как следствие, частые простудные заболевания, гипоксия, возникшая вследствие нарушения дыхания, приводят к значительному снижению качества жизни пациентов, а обостряющиеся хронические синуситы и отиты с развитием стойкой тугоухости к инвалидности наносят значительный социально-экономический ущерб [12]. Основные патофизиологические и патогенетические аспекты развития указанных заболеваний и методы реабилитации пациентов преподаются студентам старших курсов [5].

Не вызывает сомнения, что наряду с экзогенными и эндогенными флогогенными факторами, вызывающими воспалительный процесс, значимую роль занимает дисбаланс секреторного иммуноглобулина А (sIgA), а, следовательно, необходимы дополнительные методы реабилитации. Ранее мы писали о нарушениях концентраций провоспалительных цитокинов при заболеваниях лимфоглоточного кольца и необходимости их стабилизации в короткие сроки, для ликвидации Т-1 иммунного ответа и Т-1 воспаления, в том

числе с применением низкочастотной ультразвуковой (НУЗ) кавитации в сочетании с флотохромотерапией. [6].

В доступных источниках информации ограничены сведения об изменениях концентраций sIgA в назальном секрете, устья слуховых труб и носоглотки, у пациентов с хроническим аденоидитом, риносинуситом и обострением хронического гнойного среднего отита при использовании в комплексной терапии физических методов воздействия.

В то же время роль sIgA особенно важна, поскольку доказана его ключевая роль в адгезии и инвазии патогенов, развитии и хронизации воспаления слизистых оболочек полости носа и носоглотки [1]. Общеизвестно, что реализация протективных функций данного класса иммуноглобулинов обеспечивается механизмами системы MALT. В этом контексте данные об участии антиадгезивных свойств sIgA в назальном секрете, в устьях слуховых труб и носоглотки ограничены и разноречивы. Это в свою очередь приводит к искаженному пониманию патогенетической картины у пациентов с хроническим аденоидитом, риносинуситом и обострением хронического гнойного среднего отита.

Цель – повысить эффективности лечения пациентов с аденоидитом, риносинуситом и обострением хронического гнойного среднего отита на основе изучения изменений концентраций секреторного IgA при использовании в комплексной терапии низкочастотной ультразвуковой кавитации.

Материалы и методы

Работа выполнена на кафедре оториноларингологии Южно-Уральского государственного медицинского университета. В процессе выполнения работы строго соблюдались критерии включения и исключения. Поскольку самой целью было исследовать изменения концентраций sIgA в назальном секрете у пациентов на фоне обострения хронического гнойного среднего отита в сочетании с хроническим аденоидитом и риносинуситом в группу включения вошли пациенты раннего и позднего (от 15 до 23 лет) юношеского возраста. Этим пациентам по разным причинам не проводилась аденотомия, что и повлекло за собой частые простудные заболевания, риносинуситы и отиты. Диагноз верифицировался в соответствии с Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10): J35 – хронические болезни миндалин и аденоидов, H66.1 – хронический туботимпанальный гнойный средний отит и J00-J06 – острые респираторные инфекции верхних дыхательных путей.

Как правило, пациентам с указанными заболеваниями востребована консервативная терапия. Критерии исключения составили пациенты до юношеского возраста и старше 23 лет, пациенты с наличием сопутствующей патологией, аллергическими и системными заболеваниями, которые прямо или косвенно могут влиять на репаративные процессы. Основными жалобами пациентов были: затрудненное носовое дыхание, ринорея, дизосмии, боли в проекции околоносовых пазух, оторрея слизистого или слизисто-гнойного характера, понижение слуха, быстрая утомляемость и т.д.

В исследование было включено 54 пациента. Контрольную группу составили 25 человек, получивших общепринятые методы лечения согласно клинических рекомендаций, утвержденных Минздравом РФ (топические и системные антибактериальные препараты, противовоспалительное и разгрузочное лечение, элиминационные процедуры, симптоматическую и общеукрепляющую терапию). Основную группу составили 29 пациентов, которым в дополнение комплексной терапии использовали низкочастотное ультразвуковое кавитационное (НУЗ) орошение полости носа с последующим курсом фотохромотерапии. Для проведения НУЗ кавитации использовали физические параметры с частотой колебания наконечника до 29 кГц, амплитудой 25 мкм. Мощность и плотность излучения составила 50 мВт, продолжительность процедуры 3 минуты, применяемый раствор 0,9% NaCl. Фотохромотерапию (ФХТ) проводили бесконтактно с использованием синей светодиодной матрицы длиной волны 450 ± 10 нм. Доза излучения составила 3 Дж/см при мощности излучения (Рmax) 16 мВт. Режим непрерывный, количество процедур – 7, продолжительность одной процедуры – 3 минуты.

Оценку эффективности лечения проводили исследованием барьерного состояния слизистой оболочки полости носа по уровням концентрации секреторного IgA, методом иммуноферментного анализа. Назальный секрет из устьев слуховых труб и полости носа собирали в утренние часы сорбционным методом, предложенным Navaresh M. (1993) и в течение 30 минут доставляли в лабораторию [14]. Доставленный материал центрифугировали и методом твердофазного ИФА определяли концентрацию sIgA. Использовали «IgA секреторный-ИФА-БЕСТ», «IgA-ИФА-БЕСТ» тест-системы (г. Новосибирск). На иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (Awareness Tech.Inc.) с 492 нм длиной волны, определяли ферментативную реакцию оптичес-

ской плотности конечного продукта. Рассчитывали концентрации sIgA в образцах по анализу, создаваемых калибровочных кривых с известным количеством внесленного стандарта и конечными результатами измерения по значениям оптической плотности в лунках. Результаты выражены в г/л.

От пациентов предварительно было получено добровольное письменное информированное согласие на проведение исследования. Статистический анализ данных проводился программным обеспечением STATISTICA 12.5. Использовались непараметрические критерии Манна–Уитни. Достоверным статистически считались значения $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что у пациентов на 7-е сутки после применения НУЗ кавитации 0,9%-ным раствором NaCl с физическими параметрами 29 кГц, амплитудой 25 мкм и мощностью 50 мВт с последующим использованием ФХТ бесконтактно длиной волны 450 ± 10 нм в непрерывном режиме, количеством процедур – 7, регистрируется повышение количества sIg A в назальном секрете. До начала лечения sIg A в назальном секрете был выявлен у всех обследуемых и составил $0,65 \pm 0,12$ г/л в основной группе и $0,71 \pm 0,01$ г/л в контрольной. В основной группе уже к 7-му дню наблюдалась тенденция к увеличению sIg A, достигшая $0,99 \pm 0,11$ г/л, которая продолжая расти к 14-му дню составила $1,19 \pm 0,12$ г/л, и к концу месяца превосходила показатели здоровых людей ($4,38 \pm 0,12$ г/л), составляя $4,45 \pm 0,14$ г/л с статистически значимыми отличиями с группой сравнения ($p < 0,05$).

Таким образом, восстановление концентраций sIg A у пациентов основной группы до уровней нормальных физиологических показателей наблюдается в среднем на 7-е сутки, т.е. в короткие сроки, и продолжает повышаться, достигая своего максимума к концу первого месяца от начала лечения.

У пациентов контрольной группы пролеченных без использования НУЗ кавитации и ФХТ наблюдалась другая картина с более умеренным содержанием sIgA в назальном секрете. У пациентов этой группы были отмечены концентрации в пределах $0,71 \pm 0,01$ г/л, которые незначительно возросли к 7-му дню лечения $0,31 \pm 0,21$ г/л, к 14-му дню составили $1,05 \pm 0,02$ г/л, и лишь к 30-му дню их концентрация составила $3,18 \pm 0,11$ г/л и не достигла показателей здоровых людей ($4,38 \pm 0,12$).

Наблюдаемое снижение концентрации sIgA, выявленное в 1-й день лечения, несомненно яв-

ляется фактором, приводящим к обсеменению и колонизации слизистых оболочек полости носа, устьев слуховых труб, аденоидных вегетаций и мукопериоста барабанной полости патогенной флорой. Сниженные концентрации данного иммуноглобулина не позволяют выполнять основную задачу – защиту макроорганизма предотвращением инициации воспаления на поверхности слизистых оболочек, где происходит взаимодействие Th- и В-лимфоцитов и других антигенов [13].

Как указывалось выше, консервативное лечение, направленное на ликвидацию этиологических и патогенетических факторов, обострений ХГСО и хронических гнойных аденоидитов применяли как предварительный этап в подготовке пациентов к хирургическому лечению. В дополнении к медикаментозной терапии с определенным успехом используются физические биорезонансные технологии, фонофорез, электрофорез, УВЧ, УФО и т.д. [4].

Как правило, одна и та же микрофлора провоцирует переход острого процесса в хронический, но в дальнейшем она может видоизменяться и быть самой разнообразной. По среднестатистическим данным регионов РФ примерно в 38% случаях встречаются патогенные стафилококки, 58% грамотрицательные бактерии, микробные ассоциации и грибы в 11% [8, 10].

Выводы

Таким образом, в патогенезе у пациентов с аденоидитом, риносинуситом и обострением хронического гнойного среднего отита ведущее место занимает нарушение общей и локальной иммунологической реактивности организма. Так, например, на Т-систему иммунитета экзогенные флаговые факторы воздействуют интенсивнее и раньше. Об этом свидетельствует статистически достоверное снижение абсолютного и относительного количества Т-активных и Т-общих лимфоцитов у пациентов с ХГСО. Кроме того, при хроническом вялотекущем воспалительном процессе лимфоглоточного кольца, верхних дыхательных путей и уха важную роль играет не только уровень сывороточного, но и концентрации на поверхности слизистой оболочки секреторного IgA. Так, в проведенном исследовании отмечается снижение практически у всех пациентов обеих групп концентраций sIgA, что, видимо, в определенной мере связано с применением ранее антибактериальных препаратов. Кроме того, наблюдаемое нарушение неспецифических факторов защиты, сопровождаясь угнетением продукции антител в миндалинах

лимфоцитарного кольца, мукоперисто барабанной полости sIgA, приводит к гипофункции бокаловидных клеток, уменьшает частоту биения ресничек и вызывая нарушение мукоцилиарного клиренса, создает предпосылки к образованию порочного круга. Исходя из этого, становится понятна востребованность физических методов воздействия в дополнение к комплексной терапии. В этом контексте с положительной стороны зарекомендовала себя НУЗ-терапия в сочетании с ФХТ, продемонстрировав значительное улучшение гемодинамики и микроциркуляции крови, активацию неспецифических факторов защиты

и стимуляцию иммунокомпетентных клеток, повышение клеточного метаболизма, регенерации.

В заключение необходимо отметить, что лечение больных с аденоидитом, риносинуситом и обострением хронического гнойного среднего отита представляет собой сложную и трудноразрешимую задачу. При вялотекущем затяжном течении указанных патологических состояний следует проводить в обязательном порядке исследование концентраций sIgA в назальном секрете с целью ранней коррекции дисбаланса, в том числе с использованием НУЗ терапия в сочетании с ФХТ.

Список литературы / References

1. Гизингер О.А. Использование гипертонического раствора морской воды с экстрактом бурых водорослей *Ascophillum nodosum* в терапии острого риносинусита // Российский Вестник перинатологии и педиатрии, 2020. Т. 65, № 2. С. 133-140. [Gizinger O.A. The use of a hypertonic sea water solution with an extract of brown algae *Ascophillum nodosum* in the treatment of acute rhinosinusitis. *Rossiyskiy Vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2020, Vol. 65, no. 2, pp. 133-140. (In Russ.)]
2. Гизингер О.А., Коркмазов А.М., Коркмазов М.Ю. Состояние факторов антимикробной защиты назального секрета у пациентов, оперированных по поводу искривления носовой перегородки в ранний послеоперационный период // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 2. С. 117-119. [Gizinger O.A., Korkmazov A.M., Korkmazov M.Yu. The state of factors of antimicrobial protection of nasal secretions in patients operated on for curvature of the nasal septum in the early postoperative period. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, Iss. 20, no. 2, pp. 117-119. (In Russ.)]
3. Дубинец И.Д., Коркмазов М.Ю., Коркмазов А.М., Смирнов А.А., Горбунов А.В. Сравнительный анализ характера и динамики хирургического лечения пациентов с хроническим средним отитом по данным ЛОР отделения города Челябинска // Вестник оториноларингологии, 2017. Т. 82, № S5. С. 64-65. [Dubinets I.D., Korkmazov M.Yu., Korkmazov A.M., Smirnov A.A., Gorbunov A.V. The comparative analysis of character and dynamics of surgical treatment of patients with chronic average otitis by data the ENT of office of the city of Chelyabinsk. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2017, Vol. 82, no. S5, pp. 64-65. (In Russ.)]
4. Коркмазов М.Ю. Биорезонанс. Основные принципы биорезонансной и электромагнитной терапии // Вестник оториноларингологии, 2008. № 2. С. 59-61. [Korkmazov M.Yu. Bioresonance. Main principles of bioresonance and electromagnetic therapy. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2008, no. 2, pp. 59-61. (In Russ.)]
5. Коркмазов М.Ю., Зырянова К.С., Дубинец И.Д., Корнова Н.В. Оптимизация педагогического процесса на кафедре оториноларингологии // Вестник оториноларингологии, 2014. № 1. С. 82-85. [Korkmazov M.Yu., Zyrianova K.S., Dubinets I.D., Kornova N.V. Optimization of the pedagogical process at the department of otorhinolaryngology. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2014, no. 1, pp. 82-85. (In Russ.)]
6. Коркмазов М.Ю., Коркмазов А.М. Методы коррекции функциональных нарушений фагоцитов и локальных проявлений окислительного стресса в слизистой оболочке полости носа с использованием ультразвуковой кавитации // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 325-328. [Korkmazov M.Yu., Korkmazov A.M. Methods of correction of functional disorders of phagocytes and local manifestations of oxidative stress in the nasal cavity mucosa using ultrasonic cavitation. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12, Iss. 21, no. 3, pp. 325-328. (In Russ.)]
7. Коркмазов М.Ю., Ленгина М.А., Коркмазов А.М. Биохимические показатели характера оксидативного стресса в зависимости от проводимой послеоперационной терапии у пациентов, перенесших внутриносовые хирургические вмешательства // Вестник оториноларингологии, 2016. Т. 81. № S5. С. 33-35. [Korkmazov M.Yu., Langina M.A., Korkmazov A.M. Biochemical indicators of the nature of oxidative stress depending on the performed postoperative therapy in patients who have undergone intra-nasal surgery. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2016, Vol. 81, no. S5, pp. 33-35. (In Russ.)]
8. Коркмазов М.Ю., Крюков А.И., Дубинец И.Д., Тюхайз М.В., Учайев А.А., Маркелов А.В. Классификация структурных изменений костной ткани при хроническом гнойном среднем отите // Вестник оториноларингологии, 2019. Т. 84. № 1. С. 12-17. [Korkmazov M.Yu., Kryukov A.I., Dubinets I.D., Tyukhayz M.V., Uchayev A.A., Markelov A.V. Classification of structural changes of a bone tissue at chronic purulent average otitis. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2019, Vol. 84, no. 1, pp. 12-17. (In Russ.)]

9. Лопатин А.С., Варвянская А.В. Острый и хронический риносинусит: принципы терапии // Медицинский совет, 2014. № 3. С. 24-27. [Lopatin A.S., Varvyanskaya A.V. Acute and chronic rhinosinusitis: principles of therapy. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2014, no. 3, pp. 24-27. (In Russ.)]
10. Миронов А.А. Хронический гнойный средний отит // Вестник оториноларингологии, 2011. № 5. С. 72-76. [Mironov A.A. Chronic purulent otitis media. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2011, no. 5, pp. 72-76. (In Russ.)]
11. Оториноларингология: национальное руководство / под ред. В.Т. Пальчуна. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. С. 571-577. [Otorhinolaryngology: a national guide. Ed. V.T. Palchun]. Moscow: GEOTAR-Media, 2008, pp. 571-577.
12. Шишева А.К., Кorkmazov М.Ю. Социально-экономические аспекты оптимизации госпитальной помощи больным с патологией носа и околоносовых пазух в условиях крупного промышленного города // Вестник Южно-Уральского государственного университета, 2011. № 26 (243). С. 62-66. [Shisheva A.K., Korkmazov M.Yu. Socio-economic aspects hospital help optimization for patient with pathology of nose and paranasal sinuses in the large industrial city conditions. *Vestnik Yuzhno-Uralskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of the South Ural State University*, 2011, no. 26 (243), pp. 62-66. (In Russ.)]
13. Щетинин С.А., Гизингер О.А., Кorkmazov М.Ю. Клинические проявления и дисфункции иммунного статуса у детей с хроническим аденоидитом и методы их коррекции с использованием озонотерапии // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 3-1. С. 255-257. [Shchetinin S.A., Gizinger O.A., Korkmazov M.Yu. Clinical manifestations and dysfunctions of the immune status in children with chronic adenoiditis and methods of their correction using ozone therapy. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 3-1, pp. 255-257. (In Russ.)]
14. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1993, Vol. 694, pp. 72-77.
15. Qureishi A., Lee Y., Belfield K., Birchall J.P., Daniel M. Update on otitis media – prevention and treatment. *Infect. Drug Resist.*, 2014, Vol. 7, pp. 15-24.
16. Takahashi H. The middle ear. The role of ventilation in disease and surgery. Berlin, Springer-Verlag, 2001, pp. 3-91.

Авторы:

Кorkmazov М.Ю. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Дубинец И.Д. – к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Korkmazov M.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Otolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Dubinetz I.D., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Ленгина М.А. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Lengina M.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Солодовник А.В. — аспирантка кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Solodovnik A.V., Postgraduate Student, Department of Otolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 17.06.2021

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ КУРКУМИНОМ И МЕТИОНИНОМ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ РАЗРАБАТЫВАЕМЫХ КАПСУЛ

Хисамова А.А.¹, Гизингер О.А.¹, Корнова Н.В.², Зырянова К.С.²,
Коркмазов А.М.², Белошангин А.С.²

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. Куркумин является основным компонентом растения корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa*), который относится к полифенольным соединениям. В последнее время растет интерес исследователей к изучению новых, недорогих и безопасных веществ, которые могут использоваться для лечения различных заболеваний. Куркумин нашел широкое применение в медицине благодаря своей терапевтической эффективности и безопасности. Использование в терапевтической практике в виде биологически активной добавки, показало, что куркумин обладает антиоксидантными и иммуномодулирующими эффектами. Анализ данных проведенных клинических исследований показал его фармакокинетический, фармакодинамический профиль и потенциальное использование куркумина у людей при терапии различных заболеваний, даже на ранних стадиях лечения. Цель исследования: анализ иммуномодулирующих и микробиологических свойств, при использовании компонентов разрабатываемой лекарственной формы гранулы, содержащей куркумин и метионин. Была сделана гипотеза о том, что он может оказывать регулирующее действие, модулируя микробное богатство, разнообразие и состав микрофлоры кишечника. Выполнен анализ иммуномодулирующей и микробиологической активности компонентов разрабатываемой лекарственной формы капсулы, содержащей куркумин и метионин в условиях *in vitro* и *in vivo*. Определены функционально-метаболические свойства нейтрофилов при добавлении компонентов лекарственной формы – куркумина и метионина. Проведен анализ интенсивности и активности нейтрофилов с использованием НСТ-теста. Проведенный анализ показал, что одновременная инкубация нейтрофилов периферической крови мышей ICR (CD-1) с компонентами лекарственной формы – куркумином и метионином приводит к увеличению спонтанной и индуцированной НСТ-редуцирующей активности, увеличению функционального резерва и фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови мышей. Проведено исследование модулирующих эффектов перорального приема куркумина и метионина, входящих в состав лекарственной формы на микробиоту кишечника мышей ICR (CD-1) и обнаружено, что куркумин совместно с метионином влияет на численность некоторых репрезентативных

Адрес для переписки:

Хисамова Анна Александровна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
117049, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8.
Тел.: 8 (905) 837-47-55.
E-mail: Khisamova.ann@gmail.com

Address for correspondence:

Khisamova Anna A.
Peoples' Friendship University of Russia
117049, Russian Federation, Moscow,
Miklukho-Maclay str., 8.
Phone: 7 (905) 837-47-55.
E-mail: Khisamova.ann@gmail.com

Образец цитирования:

А.А. Хисамова, О.А. Гизингер, Н.В. Корнова,
К.С. Зырянова, А.М. Коркмазов, А.С. Белошангин
«Исследование иммунологической и микробиологической
эффективности терапии куркумином и метионином,
входящих в состав разрабатываемых капсул»
// Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24,
№ 2. С. 305-310. doi: 10.46235/1028-7221-1001-SOI
© Хисамова А.А. и соавт., 2021

For citation:

A.A. Khisamova, O.A. Gizinger, N.V. Kornova,
K.S. Zyryanova, A.M. Korkmazov, A.S. Beloshangin
“Studies of immunological and microbiological efficiency of the therapy
of curcumin and methionine in the developed capsules”,
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 305-310.
doi: 10.46235/1028-7221-1001-SOI
DOI: 10.46235/1028-7221-1001-SOI

семейств кишечных микробных сообществ: всего было 640 общих операционных таксономических единиц между куркумин-метиониновой и контрольной группами, 65 были уникальными в группе куркумин-метионин и 93 в контрольной группе. Учитывая прямую связь между микробиотой кишечника и некоторыми заболеваниями, данные результаты могут помочь интерпретировать терапевтические преимущества куркумина с метионином. Результаты проведенного исследования показали, что разрабатываемая лекарственная форма, которая содержит куркумин и метионин, обладает антиоксидантными и иммуномодулирующими эффектами, что в терапевтической практике может использоваться для терапии заболеваний, связанных с воздействием окислительного стресса на организм.

Ключевые слова: куркумин, метионин, НСТ-тест, кишечная микробиота

STUDIES OF IMMUNOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL EFFICIENCY OF THE THERAPY OF CURCUMIN AND METHIONINE IN THE DEVELOPED CAPSULES

Khisamova A.A.^a, Gizinger O.A.^a, Kornova N.V.^b, Zyryanova K.S.^b, Korkmazov A.M.^b, Beloshangin A.S.^b

^a Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

^b South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Curcumin is a polyphenolic compound, the main component of the *Curcuma longa* rhizome. Recently, there is growing interest to studies of this new, inexpensive and safe substance that may be used to treat various diseases. Curcumin is widely used in medicine due to its therapeutic efficacy and safety. Its usage in therapeutic practice as a dietary supplement has shown that curcumin exhibits antioxidant and immunomodulatory effects. Data from clinical studies have shown its pharmacokinetic, pharmacodynamic profile and potential use of curcumin in humans for treatment of various diseases, even at the early stages of treatment. Purpose of the study: analysis of immunomodulatory and microbiological properties when using the original grained preparation containing curcumin and methionine. It is suggested to have a regulatory effect by modulating microbial richness, diversity and composition of intestinal microflora. Analysis of immunomodulatory and microbiological activity of the components in the developed dosage form of the capsules with curcumin and methionine was carried out *in vitro* and *in vivo*. Functional and metabolic properties of neutrophils were determined with addition of its components, i.e., curcumin and methionine. The analysis of intensity and activity of neutrophils was carried out using the NBT-test. The analysis showed that simultaneous incubation of peripheral blood neutrophils from ICR (CD-1) mice with curcumin and methionine leads to an increase in spontaneous and induced NBT-reducing activity, an increase in the functional reserve and phagocytic activity of peripheral blood neutrophils in mice. A study of the modulating effects of oral intake of curcumin and methionine, which are part of the dosage form, on the intestinal microbiota of ICR (CD-1) mice was carried out. It was found that curcumin, together with methionine, affects the number of some representative families of intestinal microbial communities: in total, there were 640 common operating taxonomic units. between the curcumin-methionine and control groups, 65 were unique in the curcumin-methionine group and 93 in the control group. Given the direct link between gut microbiota and certain diseases, these results may help to interpret therapeutic benefits of curcumin with methionine. The results of the study showed that the developed dosage form, which contains curcumin and methionine, shows antioxidant and immunomodulatory effects, which can be potentially used to treat diseases associated with the effects of oxidative stress on the organism.

Keywords: curcumin, methionine, NBT test, gut microbiota

Введение

Многие компоненты растений обладают фармакологической или биологической активностью, которая может быть использована при

разработке фармацевтических препаратов. Например, полифенолы, которые содержатся в растениях в качестве вторичных метаболитов, являются наиболее распространенными антиоксидантами в рационе человека. В последние годы

большое количество исследований продемонстрировало благотворное влияние на организм человека при включении их в рацион питания [8, 10, 18]. К таким растениям относится куркума длинная (*Curcuma longa*), содержащая активный компонент куркумин, также известная как «индийский шафран» из-за ее ярко-желтого цвета, является пряным растением, принадлежащим к семейству имбирных (*Zingiberaceae*), произрастающим на Индийском субконтиненте и в Юго-Восточной Азии, имеющим более чем двухвековую историю научных исследований [22].

Широкое использование в терапевтической практике в виде биологически активной добавки, доказали, что куркумин обладает антиоксидантными и иммуномодулирующими эффектами. Проведенные клинические исследования определили его фармакокинетический, фармакодинамический профиль и потенциальное использование куркумина у людей при терапии различных заболеваний [16]. Иммуномодулирующие эффекты куркумина опосредованы в результате его взаимодействия с клеточными мишенями, такими как дендритные клетки, макрофаги, а также В- и Т-лимфоциты, и молекулярными мишенями, участвующими в воспалительных процессах, такие как цитокины и различные факторы транскрипции [17].

Ряд исследований показали, что метионин является важным клеточным антиоксидантом, стабилизируют структуру белков, участвует в независимом от последовательности распознавании поверхностей белков и может работать как регуляторный переключатель посредством обратимого окисления и восстановления [7]. Метионин может регулировать метаболические процессы, врожденную иммунную систему и работу пищеварительной системы у млекопитающих. Он также участвует в метаболизме липидов, активации эндогенных антиоксидантных ферментов, для противодействия окислительному стрессу [13].

Ввиду того, что куркумин преимущественно накапливается в желудочно-кишечном тракте после перорального или внутрибрюшинного введения, поэтому можно предположить, что этот полифенол может оказывать регулирующее действие, модулируя микробное богатство, разнообразие и состав микрофлоры кишечника [20].

Исследования подтверждают, что пероральный прием куркумина заметно изменяет соотношение между полезными и вредными бактериями в сообществе кишечной микробиоты в пользу штаммов полезных бактерий, таких как бифидобактерии, лактобациллы и бактерии, продуцирующие бутират, и уменьшить количество патогенных, которые часто связаны с патогенезом заболеваний [12, 15, 21].

Основываясь на данные зарубежной литературы, химические и фармакологические свойства, было принято решение создания комбинированной лекарственной формы, содержащей куркумин и метионин, которая обладает антиоксидантными, иммуномодулирующими и пробиотическими свойствами за счет синергизма активных компонентов, для снижения последствий оксидативного стресса и модуляции работы иммунной системы.

Цель исследования – анализ иммуномодулирующих и микробиологических свойств при использовании компонентов разрабатываемой лекарственной формы гранулы, содержащей куркумин и метионин.

Материалы и методы

Для получения лекарственной формы отщипывали 0,1 г метионина (Sigma, США) и 0,08 г куркумина (Supleco, Германия) и вспомогательные вещества, и изготавливали гранулы, которые затем заключали в капсулы [3, 4]. Для анализа высвобождения активных веществ (метионин) применяли метод спектрофотометрии по реакции с раствором нингидрина [6], и реакции образования розоцианина для куркумина [5].

В исследования были использованы фагоцитирующие клетки (нейтрофильные гранулоциты), выделенные из периферической крови мышей ICR (CD-1) (полученных в виварии РУДН). При выделении нейтрофильных гранулоцитов из периферической крови был использован двойной градиент фиколл-урографин с $= 1,077$ г/см³ и с $= 1,119$ г/см³. Образцы гепаринизированной крови мышей ICR (CD-1) наносили на двойной градиент фиколл-урографина, затем подвергали центрифугированию при 300 об/мин в течении 45 минут, после получения двух колец, верхнее из мононуклеарных клеток удаляли. После удаления кольца, состоящих из мононуклеаров, нижнее кольцо, содержащее нейтрофилы переносили в сухую пробирку с питательной средой Хенкса при 37 °С. Нейтрофилы дважды промывали при помощи центрифугирования при 1500 об/мин 10 минут. Количество нейтрофилов в клеточной суспензии подсчитывали в камере Горяева с применением окрашивания раствором трипанового синего, который растворяли в 3%-ной уксусной кислоте. Для достижения концентрации нейтрофилов $5 \cdot 10^6$ клеточную суспензию разбавляли раствором Хенкса. Из 30 проб нейтрофилов были сформированы 2 группы: 1-я группа – интактные нейтрофильные клетки (15 проб по 100 мкл), 2-я группа – нейтрофилы + компоненты лекарственной формы (куркумин и метионин) (15 проб по 100 мкл) [2].

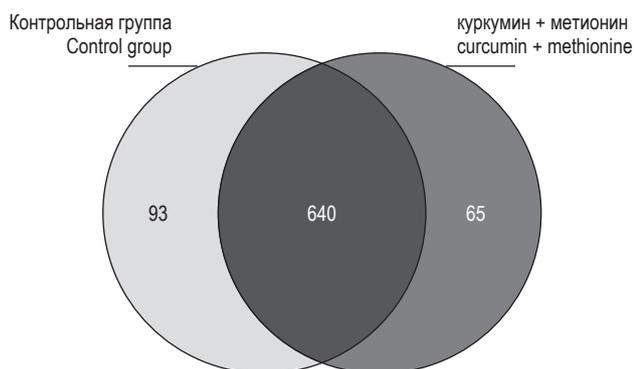


Рисунок 1. Диаграмма Венна общих операционных таксономических единиц в группе, получавшей куркумин + метионин, и в контрольной группе

Figure 1. Venn diagram of the total operating taxonomic units in the curcumin + methionine-treated and control groups

Применяя метод иммерсионной микроскопии, изучали активность фагоцитоза — % клеток, захвативших по крайней мере одну частицу латекса, интенсивность фагоцитоза — число клеток, которые смогли поглотить микросферы латекса (100 подсчитанных клеток). Кислород-зависимый метаболизм нейтрофилов изучался при использовании восстановительной реакции нитросинего тетразолия [1]. Статистический анализ, полученных результатов, проводили с использованием Statistica 8.0. Обработка полученных данных, включала в себя расчет средних арифметических величин и ошибок средних. Статистически значимые отличия считали при $p < 0,05$.

Тридцать мышей ICR (CD-1) в возрасте 12 месяцев (полученных в виварии РУДН) рандомным образом разделили на две группы и поместили в условиях, свободных от специфических патогенов. Мышей кормили стандартной пищей 1 раз в сутки. Основная группа ($n = 15$) получала корм и гранулы с куркумином с помощью принудительного кормления пинцетом в дозе 100 мг/кг массы тела 1 раз в сутки в течение 20 суток. Контрольная группа ($n = 15$) получала такой же корм, но без добавления в рацион гранул с куркумином и метионином.

Свежие образцы кала собирали в стерильные пробирки Эппендорфа и немедленно замораживали при -80°C до экстракции ДНК. Экстрагированную ДНК из каждого образца фекалий использовали в качестве матрицы для амплификации областей V3 и V4 бактериального гена рибосомной РНК 16S. Библиотеки секвенирования ампликонов секвенировали на платформе Illumina Miseq для считывания парных концов длиной 300 нм.

Исследования на животных были одобрены комитетом по этике МИ РУДН.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты проведенного исследования показали, что разрабатываемая лекарственная форма, которая содержит куркумин и метионин, обладает антиоксидантными и иммуномодулирующими эффектами, что в терапевтической практике может использоваться для терапии заболеваний, связанных с воздействием окислительного стресса на организм.

Были отмечены изменения показателей кислородзависимого метаболизма нейтрофильных клеток с использованием НСТ-теста и фагоцитарной активности в группе, где нейтрофильные клетки инкубировались с активными компонентами лекарственной формы — куркумином и метионином, $p < 0,05$.

На 30 образцах было выполнено парное секвенирование участков V3 и V4 16S рибосомной ДНК. Всего было получено 667872 используемых считываний (69570 на образец, длина считывания = 220-500 нм) из 30 образцов. В целом 687 операционных таксономических единиц были отображены на уровне сходства 97%. На основании полученных результатов была составлена диаграмма Венна, которая показывает общие таксономические единицы между группой, принимающей куркумин и метионин, и контрольной группой (рис. 1). Всего было 640 общих операционных таксономических единиц между куркумин-метиониновой и контрольной группами, 65 были уникальными в группе куркумин-метионин и 93 — в контрольной группе.

Куркумин — натуральное вещество группы полифенолов, которое содержится в растении куркума длинная (*Curcuma longa*), обладает многими фармакологическими свойствами.

Совместное инкубирование нейтрофилов периферической крови мышей с активными компонентами лекарственной формы куркумином и метионином оказывает увеличение спонтанной и индуцированной НСТ-регулирующей активности, повышению функционального резерва и фагоцитарную активность данных клеток. Доказано, что в комплексе куркумин и метионин способны обеспечивать двукратное повышение антиоксидантного резерва фагоцитов.

Принимая во внимание тот факт, что куркумин начинает всасываться в кишечнике и создавать высокую концентрацию куркумина в желудочно-кишечном тракте после перорального приема, он может оказывать регулирующее действие на микрофлору кишечника. Поэтому было решено провести сравнительный анализ микробиоты кишечника мышей ($n = 15$), кото-

рые принимали гранулы, содержащие куркумин + метионин, и контрольной группы (n = 15) путем секвенирования областей V3 и V4 бактериальных генов рибосомной РНК S16. Несмотря на отсутствие значительных отличий, пероральный прием куркумина с метионином имел тенденцию к снижению микробного богатства и разнообразия, что было описано в результатах исследования, в котором описано модулирующее действие куркумина на микробиоту кишечника на крысиной модели неалкогольной болезни печени [11].

Выводы

Исходя из результатов многих проведенных исследований и заключений, которые подтверждают патогенез между микробиотой кишечника и многими заболеваниями в последние годы, особенно значительные изменения численности определенных видов бактерий при этих заболеваниях [9, 14, 19], куркумин и метионин обладают регулирующими эффектами на микробиоту кишечника.

Список литературы / References

1. Виксман М.Е., Маянский А.Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: Методические рекомендации. Казань, 1979. 14 с. [Viksman M.E., Mayansky A.N. Method for assessing the functional activity of human neutrophils by the reaction of nitroblue tetrazolium reduction: Methodical recommendations]. Kazan, 1979. 14 p.
2. Гизингер О.А., Долгушин И.И., Летьева О.И. Исследование дегрануляционных возможностей нейтрофилов при их облучении лазером низкой плотности *in vitro* // Вестник уральской медицинской академической науки, 2010. Т. 4, № 32. С. 23-26. [Gizinger O.A., Dolgushin I.I., Letyeva O.I. *In vitro* study of the degranulation capabilities of neutrophils when they are irradiated with a low-density laser. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2010, Vol. 4, no. 32, pp. 23-26. (In Russ.)]
3. Гизингер О.А., Хисамова А.А. Биофармацевтические исследования при разработке лекарственной формы с метионином и экстрактом куркумы длинной (*Curcuma longa*) // Разработка и регистрация лекарственных средств, 2021, Т. 10, № 2. С. 24-30. [Gizinger O.A., Khisamova A.A. Biopharmaceutical trials of a dosage form, which contain methionine and turmeric extract (*Curcuma longa*). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development and Registration*, 2021, Vol. 10, no. 2, pp. 24-30. (In Russ.)]
4. Гизингер О.А., Симонян Е.В., Хисамова А.А. Способ получения лекарственного средства с метионином и экстрактом куркумы в виде гранул с кишечнорастворимым покрытием системного действия. RU 2 684 111 C1 от 07.02.2018. [Gizinger O.A., Simonyan E.V., Khisamova A.A. Method of obtaining a medicinal product with methionine and turmeric extract in the form of granules with an enteric coating of systemic action. RU 2 684 111 C1 07.02.2018.
5. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. Вып. 1. Общие методы анализа. М.: Медицина, 1987. 336 с. [State Pharmacopoeia of the USSR. 11th ed. Issue 1. General methods of analysis]. Moscow: Meditsina, 1987. 336 p.
6. Симонян А.В., Саламатов А.А., Покровская Ю.С., Аванесян А.А. Использование нингидриновой реакции для количественного определения α -аминокислот в различных объектах: методические рекомендации. Волгоград, 2007. 106 с. [Simonyan A.V., Salamatov A.A., Pokrovskaya Yu.S., Avanesyan A.A. The use of ninhydrin reaction for quantitative determination of α -amino acids in various objects: Methodical recommendations]. Volgograd, 2007. 106 p.
7. Aledo J.C. Methionine in proteins: The Cinderella of the proteinogenic amino acids. *Protein Sci.*, 2019, Vol. 28, no. 10, pp. 1785-1796.
8. Annuzzi G., Bozzetto L., Costabile G., Giacco R., Mangione A., Anniballi G., Vitale M., Vetrani C., Cipriano P., Della Corte G., Pasanisi F., Riccardi G., Rivellese A.A. Diets naturally rich in polyphenols improve fasting and postprandial dyslipidemia and reduce oxidative stress: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2014, Vol. 99, pp. 463-471.
9. Arora T., Bäckhed F. The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. *J. Intern. Med.*, 2016, Vol. 280, pp. 339-349.
10. Estrela J.M., Mena S., Obrador E., Benlloch M., Castellano G., Salvador R., Dellinger R.W. Polyphenolic phytochemicals in cancer prevention and therapy: bioavailability versus bioefficacy. *J. Med. Chem.*, 2017, Vol. 60, pp. 9413-9436.
11. Feng W., Wang H., Zhang P., Gao C., Tao J., Ge Z., Zhu D., Bi Y. Modulation of gut microbiota contributes to curcumin-mediated attenuation of hepatic steatosis in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 2017, Vol. 1861, pp. 1801-1812.
12. le Chatelier E., Nielsen T., Qin J., Prifti E., Hildebrand F., Falony G., Almeida M., Arumugam M., Batto J.M., Kennedy S., et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 2013, Vol. 500, pp. 541-546.
13. Martínez Y., Li X., Liu G., Bin P., Yan W., Más D., Valdiviá M., Hu C.A., Ren W., Yin Y. The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids*, 2017, Vol. 49, no. 12, pp. 2091-2098.

14. Massier L., Blüher M., Kovacs P., Chakaroun R.M. Impaired intestinal barrier and tissue bacteria: pathomechanisms for metabolic diseases. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2021, Vol. 9, no. 12, 616506. doi: 10.3389/fendo.2021.616506.
15. McFadden R.M., Larmonier C.B., Shehab K.W., Midura-Kiela M., Ramalingam R., Harrison C.A., Besselsen D.G., Chase J.H., Caporaso J.G., Jobin C., et al. The role of curcumin in modulating colonic microbiota during colitis and colon cancer prevention. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2015, Vol. 21, pp. 2483-2494.
16. Mohammed A., Islam M.S. Spice-derived bioactive ingredients: potential agents or food adjuvant in the management of diabetes mellitus. *Front. Pharmacol.*, 2018, Vol. 22, no. 9, 893. doi: 10.3389/fphar.2018.00893.
17. Momtazi-Borojeni A.A., Haftcheshmeh S.M., Esmaili S.-A., Johnston T.P., Abdollahi E., Sahebkar A. Curcumin: A natural modulator of immune cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.*, 2018, Vol. 17, pp. 125-135.
18. Nilius B., Appendino G. Spices: the savory and beneficial science of pungency. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 2013, Vol. 64, pp. 1-76.
19. Oniszczyk A., Oniszczyk T., Gancarz M., Szymańska J. Role of gut microbiota, probiotics and prebiotics in the cardiovascular diseases. *Molecules*, 2021, Vol. 26, no. 4, 1172. doi: 10.3390/molecules26041172.
20. Shen L., Ji H.F. Intestinal microbiota and metabolic diseases: pharmacological implications. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2016, Vol. 37, pp. 169-171.
21. Shen L., Liu L., Ji H.F. Regulative effects of curcumin spice administration on gut microbiota and its pharmacological implications. *Food Nutr. Res.*, 2017, Vol. 61, 1361780. doi: 10.1080/16546628.2017.1361780.
22. Vogel H.A., Pelletier J. Curcumin-biological and medicinal properties. *J. Pharm.*, 1815, Vol. 2, 50. doi: 10.3390/molecules24162930.

Авторы:

Хисамова А.А. — соискатель кафедры микробиологии и вирусологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Гизингер О.А. — д.б.н., профессор кафедры микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Корнова Н.В. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Зырянова К.С. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Коркмазов А.М. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Белощангин А.С. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Khisamova A.A., Doctoral Student, Department of Microbiology and Virology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Gizinger O.A., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Microbiology and Virology, Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Kornova N.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Zyryanova K.S., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Korkmazov A.M., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Beloshangin A.S., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

ОСОБЕННОСТИ ПОТРЕБЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ СУБПОПУЛЯЦИЯМИ CD4⁺T-ЛИМФОЦИТОВ У ВИЧ- ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ, ПОЛУЧАЮЩИХ АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ

Королевская Л.Б., Сайдакова Е.В., Власова В.В., Шмагель К.В.

*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. Интенсивность метаболизма глюкозы – универсального субстрата биосинтетических процессов в CD4⁺T-лимфоцитах – повышена при ВИЧ-инфекции. Вместе с тем вопрос об особенностях потребления глюкозы отдельными субпопуляциями гетерогенного пула CD4⁺T-клеток остается нерешенным. Целью настоящей работы была оценка потребления глюкозы покоеющимися и делящимися наивными CD4⁺T-лимфоцитами и CD4⁺T-клетками памяти у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих антиретровирусную терапию. Обследовано 47 человек, 26 из которых были инфицированы ВИЧ и принимали антиретровирусные препараты. Были определены: численность CD4⁺T-лимфоцитов, размеры субпопуляций наивных T-лимфоцитов (CD4⁺CD45R0⁻) и T-клеток памяти (CD4⁺CD45R0⁺), доли покоеющихся (CD71⁻) и делящихся (CD71⁺) элементов каждой субпопуляции, интенсивность потребления флуоресцентного аналога глюкозы (2-NBDG) различными CD4⁺T-лимфоцитами. В результате исследований было показано, что вне зависимости от ВИЧ-статуса CD4⁺T-клетки являются активными потребителями глюкозы, а митотически активные лимфоциты по сравнению с покоеющимися клетками поглощают больше биосинтетического субстрата. У ВИЧ-инфицированных больных по сравнению со здоровыми лицами прослеживалась тенденция к увеличению захвата глюкозы. Клетки памяти по сравнению с наивными лимфоцитами потребляют больше субстрата, что не зависит от ВИЧ-статуса. При этом наивные CD4⁺T-лимфоциты ВИЧ-зараженных лиц захватывают больше глюкозы, чем соответствующая субпопуляция клеток неинфицированных доноров. Делящиеся наивные CD4⁺T-лимфоциты ВИЧ-позитивных субъектов являются более активными потребителями глюкозы, чем аналогичные клетки здоровых людей. Различий между группами по интенсивности потребления субстрата делящимися CD4⁺T-лимфоцитами памяти обнаружено не было. Таким образом, CD4⁺T-клетки ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих терапию, захватывают больше глюкозы, чем соответствующие клетки здоровых людей, что, по-видимому, опосредовано активностью неделящихся наивных лимфоцитов. Полученные данные свидетельствуют о

Адрес для переписки:

*Королевская Лариса Борисовна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-83-34.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: bioqueen@mail.ru*

Address for correspondence:

*Korolevskaya Larisa B.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural
Branch, Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.
Phone: 7 (342) 280-83-34.
Fax: 7 (342) 280-92-11.
E-mail: bioqueen@mail.ru*

Образец цитирования:

*Л.Б. Королевская, Е.В. Сайдакова, В.В. Власова, К.В. Шмагель «Особенности потребления глюкозы субпопуляциями CD4⁺T-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих антиретровирусную терапию» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 311-316.
doi: 10.46235/1028-7221-1006-GUP*

© Королевская Л.Б. и соавт., 2021

For citation:

*L.B. Korolevskaya, E.V. Saidakova, V.V. Vlasova, K.V. Shmagel
“Glucose uptake by CD4⁺T cell subsets in HIV-infected
patients receiving highly active antiretroviral therapy
(HAART)”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 311-316.
doi: 10.46235/1028-7221-1006-GUP
DOI: 10.46235/1028-7221-1006-GUP*

лабильности метаболических характеристик покоящихся Т-лимфоцитов и их способности менять свою активность в зависимости от доступности субстратов.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, антиретровирусная терапия, субпопуляции Т-лимфоцитов, CD4⁺Т-клетки, деление, глюкоза

GLUCOSE UPTAKE BY CD4⁺T CELL SUBSETS IN HIV-INFECTED PATIENTS RECEIVING HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY (HAART)

Korolevskaya L.B., Saidakova E.V., Vlasova V.V., Shmagel K.V.

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

Abstract. Metabolism of glucose, a universal biosynthetic substrate in CD4⁺T lymphocytes, is increased in HIV-infection. However, the issue of heterogeneity in glucose consumption by the CD4⁺T cell subsets remains unresolved. The aim of this work was to assess glucose uptake by resting and cycling naive and memory CD4⁺T cells in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. We examined 47 subjects, 26 of whom were infected with HIV and were administered antiretroviral drugs. The following indices were determined: the number of CD4⁺T lymphocytes, size of naive (CD4⁺CD45R0⁻) and memory (CD4⁺CD45R0⁺) T cell subsets, frequencies of resting (CD71⁻) and cycling (CD71⁺) cell forms in each subset, the glucose fluorescent analog (2-NBDG) uptake by various CD4⁺T cell subsets. It was shown that, regardless of HIV status, the CD4⁺T cells are active glucose consumers. Cycling lymphocytes, compared with resting cells, uptake more biosynthetic substrate. We have revealed a trend for increased glucose uptake in HIV-infected patients when compared with healthy individuals. Memory cells, in comparison with naive lymphocytes, consume the substrate more actively, independent on HIV status. At the same time, naive CD4⁺T lymphocytes of HIV-infected individuals capture more glucose than the corresponding cell subset in non-infected donors. Cycling naive CD4⁺T lymphocytes of HIV-positive subjects are more active consumers of glucose than the analogues in healthy subjects. No differences were found between HIV-positive and HIV-negative groups for intensity of substrate consumption by the cycling memory CD4⁺T cells. Thus, in treated HIV-infected patients, CD4⁺T cells seem to uptake more glucose than similar cell subpopulations in healthy people, which, apparently, is mediated by the activity of resting naive lymphocytes. The data obtained indicate that metabolic characteristics in resting T-cells are instable and may change depending on the substrate availability.

Keywords: human immunodeficiency virus 1, highly active antiretroviral therapy (HAART), T-Cell Subsets, CD4-positive lymphocytes, cell division cycle, D-glucose

Работа выполнена в рамках государственного задания «Механизмы регуляции иммунной системы», номер гос. регистрации темы АААА-А19-119112290007-7.

Введение

Глюкоза является универсальным субстратом биоэнергетических и биосинтетических процессов в CD4⁺T-лимфоцитах. При ВИЧ-инфекции возрастает уровень метаболизма глюкозы в этих клетках: по сравнению с CD4⁺T-лимфоцитами здоровых людей клетки ВИЧ-инфицированных больных характеризуются повышенной экспрессией основного транспортера глюкозы Glut-1, усиленным захватом глюкозы, увеличенным внутриклеточным содержанием глюкозо-6-фосфата и повышенной секрецией L-лактата во внеклеточную среду [4]. Данный феномен отмечает-

ся и у лиц, принимающих антиретровирусную терапию (АРТ), и у пациентов, не получающих лечения. Кроме того, у ВИЧ-позитивных субъектов, приверженных АРТ, соотношение показателей, отражающих метаболический путь продукции энергии в CD4⁺T-клетках, смещено в сторону гликолиза [3]. Так как популяция CD4⁺T-лимфоцитов гетерогенна и клетки используют разные метаболические программы [6], вопрос о том, какие субпопуляции определяют гликолитический профиль CD4⁺T-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции, является актуальным.

Целью настоящей работы была оценка потребления глюкозы покоящимися и делящимися наивными CD4⁺T-лимфоцитами и CD4⁺T-клетками памяти у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих АРТ.

Материалы и методы

План работы был одобрен этическим комитетом № IRB00008964, каждый участник исследования подписал информированное согласие. Было обследовано 47 человек, 26 из которых были инфицированы ВИЧ и принимали АРТ более двух лет. Забор крови проводили в вакуумные пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту. Уровень вирусной нагрузки ВИЧ определяли набором Versant HIV-1 RNA 3,0 assay b на анализаторе Versant 440 (Siemens, Германия). Численность CD4⁺Т-лимфоцитов в периферической крови оценивали с использованием коммерческого набора Immunocytometry Systems (BDIS) Simultest™ (Becton Dickinson, США) на проточном цитофлюориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Мононуклеарные клетки получали центрифугированием в градиенте плотности Диаколла (1,077 г/мл; Диаэм, Россия). Идентификацию субпопуляционного состава жизнеспособных Т-лимфоцитов проводили на проточном цитофлюориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США) с использованием витального красителя Zombi UV Fixable Viability Kit и моноклональных антител: анти-CD3-PE-Dazzle594, анти-CD4-PE-Fire780 (BioLegend, США), анти-CD45R0-APC-eFluor780 и анти-CD71-AF700 (Invitrogen, США). Среди субпопуляций наивных Т-лимфоцитов (CD4⁺CD45R0⁻) и Т-клеток памяти (CD4⁺CD45R0⁺) определяли делящиеся и покоящиеся элементы, к которым относили, соответственно, CD71-позитивные и CD71-негативные клетки. Оценка потребления глюкозы проводили методом проточной цитометрии с применением ее флуоресцентно-меченого аналога 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose; ThermoFisher Scientific, США). Мононуклеарные клетки в течение 15 мин инкубировали в среде, содержащей 2-NBDG в конечной концентрации 80 мкМ. По окончании времени инкубации пробы дважды отмывали центрифугированием в растворе фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS; Gibco, США), содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США). Осадок ресуспендировали в растворе DPBS для последующего измерения. Полученные данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов (25-75 перцентиль). Достоверность различий между группами устанавливали на основе U-критерия Манна–Уитни.

В работе было использовано оборудование ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

Результаты и обсуждение

Субъекты обследованных групп не отличались по возрасту и полу. Уровень вирусной нагрузки

в крови ВИЧ-инфицированных пациентов составил < 50 копий/мл (предел чувствительности тест-системы), что свидетельствовало об эффективности назначенной схемы АРТ. Абсолютное число CD4⁺Т-лимфоцитов у ВИЧ-позитивных лиц было значительно ниже, чем у здоровых доноров: 448,0 (396,0-615,8) мкл⁻¹ и 652,0 (568,5-834,5) мкл⁻¹ соответственно (p < 0,001). Численность наивных CD4⁺Т-лимфоцитов у здоровых людей составила 313,9 (255,1-454,8) мкл⁻¹; у зараженных ВИЧ больных – 238,9 (139,4-319,8) мкл⁻¹. Различия между группами были статистически значимыми (p < 0,05). Аналогичные данные были установлены и среди CD4⁺Т-клеток памяти: их абсолютное количество у ВИЧ-инфицированных и неинфицированных субъектов составило 281,7 (231,7-310,6) мкл⁻¹ и 336,9 (282,0-429,5) мкл⁻¹ соответственно (p < 0,01).

У всех обследованных лиц инкубирование мононуклеарных клеток в среде, содержащей флуоресцентный аналог глюкозы, приводило к его захвату CD4⁺Т-лимфоцитами. Было обнаружено, что у ВИЧ-инфицированных пациентов средняя интенсивность флуоресценции аналога глюкозы в общем пуле CD4⁺Т-клеток была сопоставима с таковой у неинфицированных лиц: 27139 (23436-36162) и 25314 (20768–29374) соответственно (p > 0,05). Аналогичные данные были получены при анализе покоящихся (CD71⁻) элементов среди CD4⁺Т-клеток: у ВИЧ-позитивных больных и здоровых доноров средняя яркость свечения клеток, содержащих 2-NBDG, составила, соответственно, 25918 (21963-34632) и 23356 (2016-27469). Оценка потребления глюкозы делящимися (CD71⁺) Т-лимфоцитами показала, что в обеих исследованных группах эти клетки потребляли существенно больше субстрата, чем субпопуляции Т-лимфоцитов, находящихся в состоянии покоя (p < 0,001). У больных прослеживалась тенденция к увеличению захвата субстрата: средняя интенсивность флуоресценции 2-NBDG-позитивных клеток у ВИЧ-зараженных субъектов и здоровых лиц составила, соответственно, 40158 (33939-48513) и 36431 (31513-46770). Вместе с тем статистически значимых различий между группами не было установлено (p > 0,05).

Оценка CD4⁺Т-лимфоцитов разной степени зрелости показала, что интенсивность захвата флуоресцентного аналога глюкозы клетками памяти значительно выше, чем наивными лимфоцитами (рис. 1, p < 0,001). Это оказалось справедливым как для ВИЧ-инфицированных, так и здоровых субъектов. Вместе с тем наивные CD4⁺Т-клетки ВИЧ-зараженных лиц потребляли больше субстрата, чем соответствующая популяция лимфоцитов неинфицированных доноров (p < 0,05).

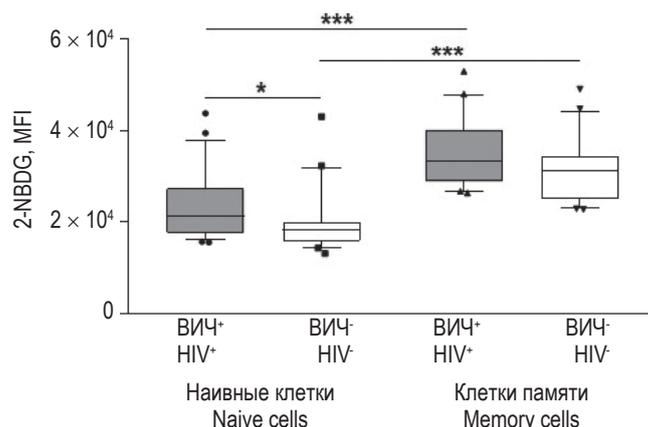


Рисунок 1. Захват глюкозы наивными CD4⁺Т-лимфоцитами и клетками памяти у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих антиретровирусную терапию

Примечание. Интенсивность свечения аналога глюкозы (2-NBDG) в субпопуляциях наивных Т-лимфоцитов (CD4⁺CD45R0⁻) и клеток памяти (CD4⁺CD45R0⁺) у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих лечение (ВИЧ⁺), и здоровых людей (ВИЧ⁻). Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), межквартильные интервалы (прямоугольники) и 10-90% размахи (вертикальные отрезки). * – p < 0,05; *** – p < 0,001 (статистические расчеты выполнены по методу Манна–Уитни). 2-NBDG: 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose; MFI: Mean Fluorescence Intensity (средняя яркость флюоресценции).

Figure 1. Glucose uptake by naive and memory CD4⁺T-cells in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy

Note. Glucose analogue (2-NBDG) fluorescence intensity in naive (CD4⁺CD45R0⁻) and memory (CD4⁺CD45R0⁺) T-cells in HIV-infected patients receiving treatment (HIV⁺) and healthy subjects (HIV⁻). Medians (horizontal lines within rectangles), interquartile ranges (rectangles), and 10-90% ranges (vertical segments) are shown. * , p < 0,05; *** , p < 0,001 (statistical calculations were performed using the Mann–Whitney method). 2-NBDG: 2- (N- (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) Amino)-2-Deoxyglucose; MFI: Mean Fluorescence Intensity.

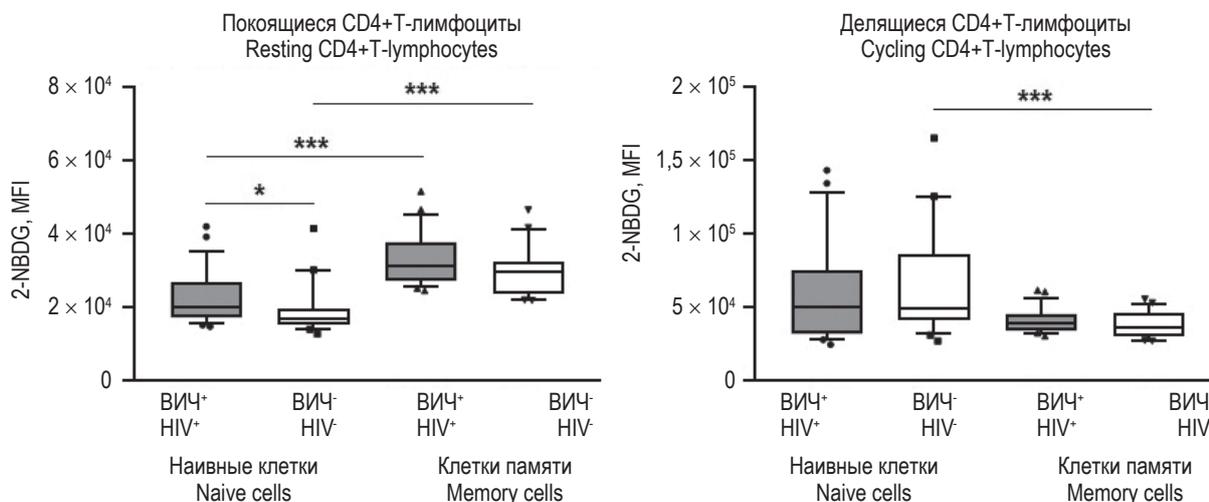


Рисунок 2. Поглощение глюкозы покоеющимися и делящимися наивными CD4⁺Т-лимфоцитами и клетками памяти у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих антиретровирусную терапию

Примечание. Интенсивность свечения аналога глюкозы (2-NBDG) среди наивных Т-лимфоцитов (CD4⁺CD45R0⁻) и клеток памяти (CD4⁺CD45R0⁺), находящихся в состоянии покоя (CD71⁻) или вступивших в деление (CD71⁺). Группы сравнения: ВИЧ-инфицированные пациенты, получающие лечение (ВИЧ⁺), и здоровые доноры (ВИЧ⁻). Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), межквартильные интервалы (прямоугольники) и 10-90% размахи (вертикальные отрезки). * – p < 0,05; *** – p < 0,001 (статистические расчеты выполнены по методу Манна–Уитни). 2-NBDG: 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose; MFI: Mean Fluorescence Intensity (средняя яркость флюоресценции).

Figure 2. Glucose uptake by resting and cycling naive and memory CD4⁺T-cells in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy

Note. Glucose analogue (2-NBDG) fluorescence intensity in naive (CD4⁺CD45R0⁻) and memory (CD4⁺CD45R0⁺) T-cells that are resting (CD71⁻) or cycling (CD71⁺). Comparison groups: HIV-infected patients receiving treatment (HIV⁺) and healthy subjects (HIV⁻). Medians (horizontal lines within rectangles), interquartile ranges (rectangles), and 10-90% ranges (vertical segments) are shown. * , p < 0,05; *** , p < 0,001 (statistical calculations were performed using the Mann–Whitney method). 2-NBDG: 2- (N- (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) Amino)-2-Deoxyglucose; MFI: Mean Fluorescence Intensity

В соответствии с особенностями клеточного метаболизма, выявленными у ВИЧ-зараженных пациентов, покоящиеся наивные CD4⁺Т-лимфоциты больных поглощали больше глюкозы, чем аналогичные клетки здоровых лиц (рис. 2, $p < 0,05$). Напротив, в покоящихся CD4⁺Т-клетках памяти отличий между группами ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных лиц по количеству захваченного лимфоцитами 2-NBDG установлено не было. Примечательно, что если среди покоящихся CD4⁺Т-клеток наивные лимфоциты поглощали меньше глюкозы, чем клетки памяти ($p < 0,001$), то среди делящихся CD4⁺Т-лимфоцитов наблюдалась обратная картина: у всех обследованных лиц клетки памяти захватывали меньше глюкозы, чем лимфоциты менее дифференцированной субпопуляции. При этом мы не выявили статистически значимых отличий между группами ВИЧ-инфицированных и неинфицированных людей ($p > 0,05$) по интенсивности свечения 2-NBDG ни в одной из субпопуляций делящихся CD4⁺Т-клеток.

Выводы

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить следующее. При помещении мононуклеарных клеток в равные условия CD4⁺Т-лимфоциты ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих АРТ, захватывают больше глюкозы, чем соответствующие клетки здоровых людей. При этом основные различия в

поглощении субстрата установлены в субпопуляции покоящихся наивных CD4⁺Т-лимфоцитов. Считается, что в покое Т-клетки потребляют глюкозу и другие нутриенты с низкой скоростью, поставляя энергию только для жизнеобеспечения [2]. При этом в покоящихся наивных Т-лимфоцитах поглощение глюкозы зависит от внешних сигналов, одним из которых является интерлейкин-7 [7]. Как правило, уровень данного цитокина в организме относительно постоянный, и его доступность определяется численностью клеток [1]. Известно, что ВИЧ-инфекция не сопровождается недостаточностью интерлейкина-7 [5]: в условиях выраженной лимфопении отсутствует конкуренция клеток за данный цитокин, и, следовательно, на каждый Т-лимфоцит приходится его «избыточное» количество. Сигнал, индуцированный связыванием интерлейкина-7 со своим рецептором, способен усиливать трафик транспортера Glut-1 на поверхность Т-клеток, что сопровождается увеличением захвата глюкозы [7]. Можно предположить, что высокая доступность интерлейкина-7 у ВИЧ-позитивных больных, получающих АРТ, может быть причиной обнаруженного нами повышенного уровня поглощения глюкозы покоящимися наивными CD4⁺Т-лимфоцитами. По-видимому, даже неделящиеся Т-лимфоциты обладают лабильными метаболическими характеристиками и могут менять свою активность в зависимости от доступности субстратов.

Список литературы / References

1. Fry T.J., Connick E., Falloon J., Lederman M.M., Liewehr D.J., Spritzler J. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 10, pp. 2983-2990.
2. Jones R.G., Thompson C.B. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity*, 2007, Vol. 27, no. 2, pp. 173-178.
3. Korencak M., Byrne M., Richter E., Schultz B.T., Juszczak P., Ake J.A. Effect of HIV infection and antiretroviral therapy on immune cellular functions. *JCI Insight*, 2019, Vol. 4, no. 12, e126675. doi: 10.1172/jci.insight.126675.
4. Masson J.J.R., Murphy A.J., Lee M.K.S., Ostrowski M., Crowe S.M., Palmer C.S. Assessment of metabolic and mitochondrial dynamics in CD4⁺ and CD8⁺ T cells in virologically suppressed HIV-positive individuals on combination antiretroviral therapy. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 8, e0183931. doi: 10.1371/journal.pone.0183931.
5. Napolitano L.A., Grant R.M., Deeks S.G., Schmidt D., de Rosa S.C., Herzenberg L.A. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat. Med.*, 2001, Vol. 7, no. 1, pp. 73-79.
6. Sun H., Li X. Metabolic reprogramming in resting and activated immune cells. *Metabolomics (Los Angel)*, 2017, Vol. 7, no. 1, 188. doi: 10.4172/2153-0769.1000188.
7. Wofford J.A., Wieman H.L., Jacobs S.R., Zhao Y., Rathmell J.C. IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood*, 2008, Vol. 111, no. 4, pp. 2101-2111.

Авторы:

Королевская Л.Б. — к.м.н., 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:

Korolevskaya L.B., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Сайдакова Е.В. — к.б.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

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 К.В. — д.м.н., заведующий лабораторией 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

Saidakova E.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

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

Shmagel K.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 17.06.2021

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМИ МЕТОДИКАМИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПЕПТИДСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА И ПОЛИОКСИДОНИЯ

Саркисян Н.Г.¹, Чумаков Н.С.², Хлыстова К.А.², Дроздова Л.И.³, Юффа Е.П.⁴

¹ ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет», г. Екатеринбург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет», г. Тюмень, Россия

Резюме. В данной статье был проведен сравнительный анализ двух экспериментальных методик лечения хронического пародонтита, с применением топической композиции «глицерогидрогель кремния – пептид» и местными инъекциями препарата «Полиоксидоний». Целью настоящего исследования являлось сравнение эффективности действия двух экспериментальных методик лечения хронического пародонтита.

На базе ФГБУН ИИФ УрО РАН г. Екатеринбург производилось воссоздание модели хронического воспаления тканей пародонта на крысах линии Вистар, после чего были проведены две экспериментальные методики лечения, путем аппликации композиции, содержащей в своем составе кремнийорганический глицерогидрогель и синтетический пептид, а также путем инъекции препарата «Полиоксидоний» непосредственно в очаг воспаления. В последующем была проведена сравнительная оценка эффективности данных методик, в том числе и с контрольными группами, лечение которых проводилось путем топического применения кремнийорганического глицерогидрогеля в одной группе, и топического применения геля «Метрогил Дента» в другой группе. По окончании лечения производилась оценка и сравнение клинических и гистологических данных.

По результатам данного анализа выяснено, что все препараты оказывают хорошее действие на процессы регенерации тканей и уменьшения интенсивности воспалительного процесса. Также было выяснено, что композиция «кремнийорганический глицерогидрогель – пептид» оказывает более быстрый эффект за счет особенностей содержащихся в нем компонентов. Гидрогель, обладающий транскутанной активностью и участвующий в роли проводника способствует более быстрому проникновению пептида в ткани, а пептид, обладающий выраженным противомикробным и регенерирующим действием, позволяет более комплексно воздействовать на различные звенья патогенеза хро-

Адрес для переписки:

Саркисян Нарине Гришаевна
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3.
Тел.: 8 (902) 875-53-99.
E-mail: narine_25@mail.ru

Address for correspondence:

Sarkisyan Narine G.
Ural State Medical University
620028, Russian Federation, Yekaterinburg, Repin str., 3.
Phone: 7 (902) 875-53-99.
E-mail: narine_25@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Г. Саркисян, Н.С. Чумаков, К.А. Хлыстова, Л.И. Дроздова, Е.П. Юффа «Сравнительный анализ эффективности лечения хронического пародонтита экспериментальными методиками с применением пептидсодержащего препарата и полиоксидония» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 317-322. doi: 10.46235/1028-7221-1010-CAO
© Саркисян Н.Г. и соавт., 2021

For citation:

N.G. Sarkisyan, N.S. Chumakov, K.A. Khlystova, L.I. Drozdova, E.P. Yuffa "Comparative analysis of treatment efficiency in chronic periodontitis using experimental therapies with peptide-containing preparation and polyoxidonium", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 317-322. doi: 10.46235/1028-7221-1010-CAO
DOI: 10.46235/1028-7221-1010-CAO

нического пародонтита. По сравнению с группами глицерогидрогель кремния и «Полиоксидоний» сроки клинического улучшения в группе глицерогидрогель-пептид увеличились на 57%, а с группой «Метрогил Дента» показатели улучшились примерно на 15%.

По результатам гистологического исследования было подтверждено, что нормализация структуры тканей, а также уменьшение воспалительной реакции происходили во всех группах. Особый интерес заслуживает тот факт, что сроки регенерации в группе глицерогидрогель-пептид оказались меньше (от 16 до 20 дней), чем в других группах (от 20 дней), что позволяет сказать о более эффективном действии данной композиции, по сравнению с другими препаратами. За счет наличия в составе композиции глицерогидрогель-пептид антимикробных пептидов, оказывается влияние как на патогенетическое, так и на этиологическое звено заболевания, что играет большую роль в комплексном подходе к лечению хронического пародонтита.

Ключевые слова: глицерогидрогель кремния, антимикробные пептиды, хронический пародонтит, Полиоксидоний, Метрогил Дента, иммунология

COMPARATIVE ANALYSIS OF TREATMENT EFFICIENCY IN CHRONIC PERIODONTITIS USING EXPERIMENTAL THERAPIES WITH PEPTIDE-CONTAINING PREPARATION AND POLYOXIDONIUM

Sarkisyan N.G.^a, Chumakov N.S.^b, Khlystova K.A.^b, Drozdova L.I.^c,
Yuffa E.P.^d

^a Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Yekaterinburg, Russian Federation

^c Ural Agricultural University, Yekaterinburg, Russian Federation

^d Tumen State Medical University, Tumen, Russian Federation

Abstract. In this article, a comparative analysis of two experimental methods for treatment of chronic parodontitis was carried out, using a locally applied composition of silicon glycerohydrogel – peptide, and local injections of “Polyoxidonium” drug. The aim of this study was to compare efficiency of the two experimental methods for treatment of chronic periodontitis. Materials and methods: Using the facilities at the Institute of Immunology and Physiology (Yekaterinburg), a model of chronic inflammation of periodontal tissues was developed in Wistar rats, further treated by two experimental methods, i.e., (1) applying a composition containing organosilicon glycerohydrogel and a synthetic peptide, or (2) injections of “Polyoxidonium” drug directly into the foci of inflammation. Subsequently, a comparative evaluation of their efficiency was performed, including comparisons with control groups. The latters were treated by topical use of organosilicon glycerohydrogel (Group 1), and the local application of “Metrogyl Denta” gel (Group 2). Upon completion of the treatment, clinical and histological data were evaluated and compared. As based on the data obtained, we have found that all these drugs exerted favorable effect on the tissue regeneration, and led to reduced intensity of inflammatory processes. We have revealed also that the organosilicon glycerohydrogel – peptide composition provided a faster effect, due to the special characteristics of its components. The hydrogel, which has transcutaneous activity and plays a role of conductor substance, promotes faster penetration of the peptide into the tissues, thus allowing the peptide substance for more pronounced, complex antimicrobial and regenerative effect upon various pathogenetic components of chronic periodontitis. If compared with the groups treated by glycerohydrogel silicon and “Polyoxidonium”, the terms of clinical improvement in the glycerohydrogel-peptide group were found to be increased by 57%, and appropriate indexes in the group treated with “Metrogyl Denta” improved by about 15%. The results of histological examination have confirmed normalization of the local tissue structure, as well as decreased inflammatory response observed for all the groups. Of particular interest, regeneration terms in the glycerohydrogel-peptide group were shorter (16 to 20 days) than in other groups (from 20 days), thus suggesting a more pronounced effect of this composition when compared to other treatments. Due to the presence of antimicrobial peptides in formulation of the glycerohydrogel-peptide composition, both

pathogenetic and etiological links of the disease are affected, thus being important for development of integral approach to the treatment of chronic periodontitis.

Keywords: silicone glycerohydrogel, antimicrobial peptides, chronic periodontitis, Polyoxidonium, Metrogyl Denta, immunology

Введение

Высокая распространенность пародонтита свидетельствует о сложности лечения данного заболевания, а также отсутствии простых комплексных мер. Многоформность его этиологии, сложность патогенеза, бесконтрольное применение антибактериальных препаратов, а также отсутствие должного комплексного подхода в лечении данного заболевания диктует нам необходимость поиска новых универсальных способов терапии, которые оказывали бы воздействие как на этиологические факторы, так и на различные звенья патогенеза. Пародонтит — это воспалительное заболевание комплекса тканей, включающих в себя периодонт, костную ткань и слизистую оболочку зубочелюстного сегмента, приводящее к потере зубов [10]. Современная научная концепция развития пародонтита гласит, что развитие локализованного воспаления в тканях пародонта является результатом формирования клеточного и гуморального ответа непосредственно в слизистой оболочке полости рта [3]. Кроме того, вследствие активизации патогенной микрофлоры при отсутствии должного лечения на начальных этапах, заболевание склоняется к хронизации и невосприимчивости к лечению [2, 12]. Следовательно, нарушение неспецифической защиты и иммунного ответа обуславливает необходимость локального применения иммуномодулирующих препаратов, которые наряду с активизацией иммунного ответа на уровне слизистой оболочки, способны влиять на этиологический фактор заболевания, в рамках топической терапии.

На сегодняшний день наиболее интересными препаратами данной группы являются «Полиоксидоний» и композиция кремнийорганический глицероидрогель — пептид. Среди них, композиция с антимикробными пептидами (АМП) представляется наиболее перспективной [1, 11], так как в отличие от «Полиоксидония», способны влиять не только на активизацию иммунного ответа, но и оказывать непосредственное влияние на этиологию пародонтита — микроорганизмы. А в сочетании с кремнийорганическим глицероидрогелем, который обладает транскутанной активностью, данная композиция обладает большим потенциалом в лечении [6].

Таким образом, целью исследования стала сравнительная оценка новых методов лечения

хронического пародонтита, с классической схемой лечения гелем «Метрогил Дента».

Материалы и методы

На базе ФГБУН ИИФ УрО РАН г. Екатеринбург было проведено исследование на 4 группах лабораторных крыс линии «Wistar». Исследование включало в себя воссоздание модели хронического пародонтита путем введения в пародонтальное пространство иглы длиной 12 мм. И последующим ее извлечением на 26-й день (патент РФ № 2545923) [9]. Все болезненные процедуры были выполнены в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным.

В первой и второй группах лечение проводилось путем аппликации в зону воспалительного очага композиций глицероидрогель-пептид и кремнийорганический гидрогель соответственно, а также последующую клиническую оценку эффективности лечения [8].

В третьей группе лечение проводилось путем инъекций препарата «Полиоксидоний» в десну. В четвертой — путем аппликации геля «Метрогил Дента» в область воспалительного очага [4].

Данные по контрольным группам, где не проводилось лечение, описаны в предшествующих исследованиях, и были использованы для сравнения [5, 7].

Результаты и обсуждение

В качестве сравнительного анализа исследований проводилась оценка изменений клинических показателей, а также анализ гистологической картины.

Для сравнения клинических показателей во внимание были приняты следующие симптомы: гиперемия и отечность десны, выделение гноя из пародонтального пространства, изменение веса (рис. 1, 2).

Также был проведен сравнительный гистологический анализ, для оценки характера морфологических изменений.

По результатам гистологического исследования отмечен тот факт, что в группе кремнийорганический глицероидрогель гистологическая картина имела динамическое улучшение (плазмодитарная инфильтрация постепенно уменьшалась, а процессы репарации тканей имели тенденцию к более медленному восстановлению нормальной структуры). В данной группе про-

Группа Group	Средний вес (г) Average weight (g)	Вес до (г) Weight before (g)	Средний во время (г) Average during (g)	Weight after (g)
Глицерогидрогель / Glycerohydrogel	460	460	352	454
Глицерогидрогель-пептид / Glycerohydrogel-peptide	480	480	379	472
«Полиоксидоний» / Polyoxidonium	310	310	200	305
«Метрогил Дента» / Metrogil Denta	320	320	210	312

Рисунок 1. Вес исследуемых животных (в граммах)

Примечание. * – статистически значимые различия между показателями ($p < 0,5$).

Figure 1. Weight of test animals (in grams)

Note. *, statistically significant differences between indicators ($p < 0.5$).

Группа «Силативит» Silativit Group	1-й день 1 st day	3-й день 3 rd day	5-й день 5 th day	7-й день 7 th day	10-й день 10 th day
Гиперемия Hyperemia	+	+	+	-	-
Отек / Edema	+	+	+	-	-
Кровоточивость Bleeding	+	+	+	-	-

Группа «Силативит-пептид» Silativit-peptide Group	1-й день 1 st day	3-й день 3 rd day	5-й день 5 th day	7-й день 7 th day	10-й день 10 th day
Гиперемия Hyperemia	+	+	-	-	-
Отек / Edema	+	+	-	-	-
Кровоточивость Bleeding	+	+	-	-	-

Группа «Полиоксидоний» Polyoxidonium Group	1-й день 1 st day	3-й день 3 rd day	5-й день 5 th day	7-й день 7 th day	10-й день 10 th day
Гиперемия Hyperemia	+	+	+	-	-
Отек / Edema	+	+	+	-	-
Кровоточивость Bleeding	+	+	+	-	-

Группа «Метрогил Дента» Metrogil Denta Group	1-й день 1 st day	3-й день 3 rd day	5-й день 5 th day	7-й день 7 th day	10-й день 10 th day
Гиперемия Hyperemia	+	+	-	-	-
Отек / Edema	+	+	-	-	-
Кровоточивость Bleeding	+	+	-	-	-

Рисунок 2. Табличное отображение изменения выраженности основных клинических симптомов у исследуемых животных

Figure 2. Tabular display of changes in the severity of the main clinical symptoms in the studied animals

цесс регенерации занимал от 21 до 30 дней. В то время как в группе глицерогидрогель-пептид наблюдалось более саккадическое улучшение (на 3-15-е сутки после лечения наблюдалась обширная плазмоцитарная инфильтрация, а на 16-20-е сутки гистологическая картина резко изменилась в сторону улучшения).

В гистологических препаратах группы «Полиоксидоний», изменения носили схожий характер, однако время восстановления нормальной структуры ткани было несколько больше, от 21 дня.

В группе «Метрогил Дента» отмечалась динамическая перестройка структуры ткани, а также стихание воспалительной реакции. Изменение гистологической картины в данной группе схоже с группой «кремнийорганический глицерогидрогель».

Композиция глицерогидрогель-пептид показала более хороший терапевтический эффект, чем группы кремнийорганический глицерогидрогель, «Полиоксидоний» и «Метрогил дента», так как изменение клинической и гистологической картины происходило более интенсивно. Экспансивное изменение структуры тканей и ги-

стологических признаков воспаления позволяет нам сказать, что композиция глицерогидрогель-пептид оказывает влияние на несколько патогенетических звеньев заболевания, в частности на клеточные и гуморальные звенья иммунитета.

Кроме того, характер изменения клинической картины после лечения композицией глицерогидрогель-пептид дают нам возможность предположить, что временные рамки клинического улучшения являются показателем хорошей противомикробной активности композиции. Ускорение сроков заживления и иное клиническое течение воспалительного процесса при применении композиции глицерогидрогель-пептид, в сравнении с другими группами, показало эффективность топической терапии хронического пародонтита у исследуемых животных с использованием АМП.

Выводы

1. Гистологическое исследование подтвердило нормализацию структуры тканей во всех группах. Однако сроки регенерации в группе

глицерогидрогель-пептид оказались меньше (от 16 до 20 дней), чем в других группах (от 20 дней).

2. За счет наличия в составе композиции глицерогидрогель-пептид антимикробных пептидов, оказывается влияние как на патогенетическое, так и на этиологическое звено заболевания.

Благодарности

Авторы выражают глубокую признательность директору ФГБУН ИИФ УрО РАН г. Екатеринбург, д.ф.-м.н. Соловьевой О.Э. за предоставление возможности проведения исследования на базе учреждения.

Список литературы / References

1. Мусин Х.Г. Антимикробные пептиды – потенциальная замена традиционным антибиотикам // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 3. С. 295-308. [Musin Kh.G. Antimicrobial peptides are potentially noticeable to traditional antibiotics. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 3, pp. 295-308. (In Russ.)]
2. Нацвлишвили Т.Т., Цимбалистов А.В., Шторина Г.Б., Кадурин Т.И. Клинико-рентгенологические параллели генерализованных форм агрессивного и хронического пародонтита // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, 2011. № 4. С. 97-100. [Natsvlivshvili T.T., Tsimbalistov A.V., Shtorina G.B., Kadurina T.I. Clinical and radiological parallels of generalized forms of aggressive and chronic parodontitis *Vestnik Severo-Zapadnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta im. I.I. Mechnikova = Bulletin of the I. Mechnikov North-West State Medical University*, 2011, no. 4, pp. 97-100. (In Russ.)]
3. Саркисян Н.Г. Использование иммуномодуляторов в медикаментозном лечении заболеваний пародонта // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 720-722. [Sarkisyan N.G. The use of immunomodulators in the drug treatment of parodontal diseases. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014. Vol. 8 (17), no. 3, pp. 720-722. (In Russ.)]
4. Саркисян Н.Г., Дроздова Л.И., Умарова Д.С., Соловьева Д.А., Хлыстова К.А. Оценка эффективности полиоксидония в медикаментозном лечении модели хронического пародонтита (экспериментальное исследование) // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 1, pp. 91-96. [Sarkisyan N.G., Drozdova L.I., Umarova D.S., Solovieva D.A., Khlystova K.A. Evaluation of the effectiveness of polyoxidonium in drug treatment of a chronic parodontitis model (experimental study). *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2020, Vol. 23, no. 1, pp. 91-96. (In Russ.)]
5. Саркисян Н.Г., Овсепян Н.А., Тузанкина И.А., Долгих М.А., Соколова К.В. Применение терапевтической композиции топического применения, содержащей препараты Ацеграм и силативит гель, на модели хронического пародонтита у крыс // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 3. С. 448-450. [Sarkisyan N.G., Ovsepyan N.A., Tuzankina I.A., Dolgikh M.A., Sokolova K.V. Application of a topical therapeutic composition containing Acegram and silativit gel on a model of chronic parodontitis in rats. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 3, pp. 448-450. (In Russ.)]
6. Саркисян Н.Г., Ронь Г.И., Тузанкина И.А., Хонина Т.Г., Ларионов Л.П., Симбирцев А.С., Дроздова Л.И., Тимченко А.С. Морфологическая оценка эффективности использования фармакологических композиций на основе кремнийорганического глицерогидрогеля // Иммунология, 2017. Т. 38, № 2. С. 91-96. [Sarkisyan N.G., Ron G.I., Tuzankina I.A., Khonina T.G., Larionov L.P., Simbirtsev A.S., Drozdova L.I., Timchenko A.S. Morphological assessment of the effectiveness of the use of pharmacological compositions based on organosilicon glycerohydrogel. *Immunologiya = Immunologiya*, 2017, Vol. 38, no. 2, pp. 91-96. (In Russ.)]
7. Саркисян Н.Г., Тимченко А.С., Ларионов Л.П., Тузанкина И.А. Способ получения модели хронического пародонтита у крыс // Уральский медицинский журнал, 2014. № 3. С. 54-56. [Sarkisyan N.G., Timchenko A.S., Larionov L.P., Tuzankina I.A. Method for obtaining a model of chronic parodontitis in rats. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2014, no. 3, pp. 54-56. (In Russ.)]
8. Саркисян Н.Г., Чумаков Н.С., Гренадерова М.А. Экспериментальная оценка эффективности пептид-содержащего препарата в лечении хронического пародонтита // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 3. С. 1258-1262. [Sarkisyan N.G., Chumakov N.S., Grenaderova M.A. Experimental evaluation of the effectiveness of a peptide-containing drug in the treatment of chronic parodontitis. ISSN 1028-7221 *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 3, pp. 1258-1262. (In Russ.)]
9. Саркисян Н.Г., Чупахин О.Н., Симбирцев А.С. Хонина Т.Г. и др. Патент на изобретение № 2470640 РФ. Средство для лечения воспалительных заболеваний полости рта и способ лечения воспалительных заболеваний полости рта / Опубл. 27.12.2012. // Бюл. 2012. № 36. 16 с. [Sarkisyan N.G., Chupakhin O.N., Simbirtsev A.S., Khonina T.G., et al. Patent for invention No. 2470640 RF. Means for the treatment of inflammatory diseases of the oral cavity and a method for the treatment of inflammatory diseases of the oral cavity / Publ. 12/27/2012. Bulletin, 2012, No. 36. 16 p.
10. Скрипникова Т.П., Хавалкина Л.М., Хавалкина А.А. Рефрактерное течение пародонтита. Особенности его клиники // Украинський стоматологічний альманах. 2012. № 2. С. 50-52. [Skripnikova T.P.,

Khavalkina L.M., Khavalkina A.A. Refractory parodontitis. Features of his clinic. *Ukrainskiy stomatologichniy almanakh = Ukrainian Dental Almanac*, 2012, no. 2, pp. 50-52. (In Russ.)]

11. Carmona-Ribeiro A.M., de Melo Carrasco L.D. Novel formulations for antimicrobial peptides. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, Vol. 15, no. 10, pp. 18040-18083.

12. Levine M., LaPolla S., Owen W.L., Socransky S.S. Antibody-based diagnostic for 'refractory' periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 2002, Vol. 29, no. 10, pp. 935-943.

Авторы:

Саркисян Н.Г. — д.м.н., доцент кафедры терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Чумаков Н.С. — аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Хлыстова К.А. — аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Дроздова Л.И. — д.в.н., профессор кафедры морфологии, экспертизы и хирургии ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет», г. Екатеринбург, Россия

Юффа Е.П. — к.м.н., доцент кафедры респираторной медицины с курсом рентгенологии и стоматологии института НИИ ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет», г. Тюмень, Россия

Authors:

Sarkisyan N.G., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Therapeutic Dentistry and Propedeutics of Dental Diseases, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

Chumakov N.S., Postgraduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Yekaterinburg, Russian Federation

Khlystova K.A., Postgraduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Yekaterinburg, Russian Federation

Drozdova L.I., PhD, MD (Veterinary Sciences), Professor, Department of Morphology, Expertise and Surgery, Ural Agricultural University, Yekaterinburg, Russian Federation

Yuffa E.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Respiratory Medicine with course of Radiology and Dentistry, Institute of Research and Development, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Поступила 20.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 20.05.2021
Accepted 17.06.2021

ВЛИЯНИЕ ТОПИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ МУКОЗАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКОЙ СТОМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Латюшина Л.С., Малышева Л.Ю., Пиотрович А.В., Бережная Е.С.

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

Резюме. В настоящее время в общей структуре хирургической заболеваемости челюстно-лицевой области воспалительные процессы и травмы занимают лидирующие позиции, также широко распространенным методом лечения в стоматологии является восстановление целостности зубных рядов с опорой на внутрикостные дентальные имплантаты. Цель работы – провести комплексный анализ системы цитокинов (IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-8, IL-10, TNF α , IFN γ) отделяемого верхнечелюстной пазухи и смешанной слюны у пациентов со стоматологической патологией хирургического профиля (хроническим одонтогенным верхнечелюстным синуситом, осложненным переломом нижней челюсти, а также при проведении одномоментной дентальной имплантации) и оценить влияние топической иммунотерапии на изучаемые параметры. В рамках двухэтапного исследования комплексно обследованы 218 человек, разделенные на группы в зависимости от вида патологии и метода лечения. Пациентам с хроническим одонтогенным синуситом (J 32.0, n = 44) на фоне базового лечения проводилась топическая иммунотерапия циклофероном (меглумина акридонатацетат), больным с переломом нижней челюсти (S 02.6, n = 70) и при установке дентального имплантата (K 08.1, n = 70) – беталейкином (рекомбинантный IL-1 β). Обследование пациентов со стоматологической патологией хирургического профиля на первом этапе работы и проведенный анализ локального уровня цитокинов выявил у всех включенных в исследование пациентов иммунологические предикторы низкой эффективности остро воспалительного ответа, связанные с дисбалансом системы про- и противовоспалительных цитокинов, прежде всего: у пациентов с хроническим одонтогенным синуситом – снижение IL-1 β при высоких значениях IL-1 α содержимого верхнечелюстного синуса; у больных с осложненными переломами нижней челюсти – выраженное динамическое снижение IL-1 β при стабильно низких значениях TNF α смешанной слюны; у обследуемых, которым проводилось имплантологическое лечение – особенностями динамики слюнного уровня IL-1 β , IL-8 и IL-1 α . Второй этап исследования, связанный с локальным применением циклоферона и беталейкина и анализом полученных данных, позволил выявить различное влияние препаратов на изучаемые параметры и обнаружить интегральный эффект топической иммунотерапии, заключающийся в нивелировании обнаруженного ранее диссонанса системы цитокинов, за счет нормализации их концентрации. Таким образом, полученные результаты могут свидетельствовать, что у пациентов с хирургическими стоматологическими

Адрес для переписки:

*Латюшина Лариса Сергеевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (904) 816-67-73.
E-mail: Latyushinal@mail.ru*

Address for correspondence:

*Latyushina Larisa S.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (904) 816-67-73.
E-mail: Latyushinal@mail.ru*

Образец цитирования:

*Л.С. Латюшина, Л.Ю. Малышева, А.В. Пиотрович,
Е.С. Бережная «Влияние топической иммунотерапии
на показатели мукозального иммунитета пациентов
с хирургической стоматологической патологией»
// Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24,
№ 2. С. 323-330. doi: 10.46235/1028-7221-1024-EOL
© Латюшина Л.С. и соавт., 2021*

For citation:

*L.S. Latyushina, L.Yu. Malysheva, A.V. Piotrovich,
E.S. Berezhnaya "Effect of local immunotherapy on the
indexes of mucosal immunity in patients with surgical dental
pathology", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 323-330.
doi: 10.46235/1028-7221-1024-EOL
DOI: 10.46235/1028-7221-1024-EOL*

заболеваниями, которым применялась топическая иммунотерапия, формировался более высокий адаптивный потенциал локального звена мукозального иммунитета.

Ключевые слова: цитокины, синусит, имплантация, перелом челюсти, беталейкин, циклоферон

EFFECT OF LOCAL IMMUNOTHERAPY ON THE INDEXES OF MUCOSAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH SURGICAL DENTAL PATHOLOGY

Latyushina L.S., Malysheva L.Yu., Piotrovich A.V., Berezhnaya E.S.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Currently, inflammatory processes and injuries of maxillofacial region, occupy leading positions in the overall structure of surgical morbidity. Restoration of dentition integrity is based on intraosseous dental implants, being a widespread method of treatment in dentistry. The aim of the present work was to perform a comprehensive analysis of cytokine contents (IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-8, IL-10, TNF α , IFN γ) in maxillary sinus discharges and mixed oral fluid in the patients with surgical dental pathology (chronic odontogenic maxillary sinusitis, complicated by mandibular fracture, as well as during simultaneous dental implantation) and to assess the effect of locally applied immunotherapy on the parameters studied. As a part of the two-stage study, 218 people were comprehensively examined, divided into groups depending on the type of disorder and methods of treatment. The patients with chronic odontogenic sinusitis (J 32.0, n = 44) were treated with topical immunotherapy with Cycloferon (meglumine acridonacetate), patients with a mandibular fracture (S 02.6, n = 70) and with a dental implant (K 08.1, n = 70) received Betaleucine (recombinant IL-1 β). At the first stage of the study, examination of all the patients with surgical dental pathology showed immunological predictors of low-efficient acute inflammatory response associated with imbalance of the pro- and anti-inflammatory cytokine system. These predictors were primarily found in the patients with chronic odontogenic sinusitis, i.e., a decrease in IL-1 β at high IL-1ra values in the maxillary sinus secretions. In the patients with complicated mandibular fractures, there was a pronounced dynamic decrease in IL-1 β with consistently low values of TNF α in mixed saliva. There were distinct dynamic features of IL-1 β , IL-8, and IL-1ra levels in oral fluid of the subjects undergoing implantological procedures. The second stage of the study, associated with the local use of Cycloferon and Betaleucine, and analysis of the data revealed different effects of the drugs on the studied parameters, presuming an integral effect of topical immunotherapy, i.e., some leveling of the previously detected imbalance of the cytokine system, due to normalization of their concentrations. Hence, the results obtained may indicate that the patients with surgical dental diseases treated with local immunotherapy had a higher adaptive potential of the local mucosal immunity.

Keywords: cytokines, sinusitis, implantation, jaw fracture, betaleukin, cycloferon

Введение

Поиск новых методов лечения воспалительных заболеваний и травм челюстно-лицевой области является одной из важных проблем хирургической стоматологии, при этом частота встречаемости данной патологии достигает 60-80% от общего числа пациентов в структуре хирургической заболеваемости лица и шеи [1]. Одно из наиболее распространенных воспалительных заболеваний – хронический одонтогенный верхнечелюстной синусит (J 32.0), одним из клинических симптомов которого является наличие oro-антрального свищевого хода и, соответ-

ственно, инфицирование пазухи микрофлорой полости рта, что оказывает влияние на параметры локального иммунитета и является одной из составляющих причин неблагоприятного исхода комплексного лечения данной патологии [1, 2, 6].

Перелом нижней челюсти (S 02.6) является одной из наиболее часто встречающихся травм костей лицевого скелета [1]. Воспалительные осложнения данной патологии, а именно нагноение костной раны, поднадкостничные абсцессы, могут инициировать развитие травматического остеомиелита, удельный вес которого среди всех травм ЧЛЮ составляет до 30-40% [1, 4]. Известно, что от состояния локального иммунитета зависит

развитие деструктивных процессов костной ткани и его распространенность [4, 7].

Несмотря на значительную долю воспалительных процессов и травм в структуре хирургических стоматологических пациентов, в настоящее время восстановление целостности зубных рядов (К 08.1) путем протезирования с опорой на внутрикостные дентальные имплантаты является широко распространенным методом. Частота возникновения инфекционно-воспалительных осложнений после хирургического этапа имплантации в раннем периоде составляет в среднем 0,5-13,3% от числа установленных имплантатов и проявляется в послеоперационном периоде в форме раннего периимплантита (острого очагового остеомиелита), считающегося основной причиной дезинтеграции имплантата [5, 8]. Известно, что операция по установке дентального имплантата и проводимые вместе с ней иные хирургические вмешательства могут приводить к избыточной воспалительной реакции, прогрессия которой зависит, в том числе, и от локального баланса цитокинов [5, 8].

Соответственно, целый ряд хирургической стоматологической патологии характеризуется изменениями иммунологических параметров, способных повлиять на течение и исход заболевания. Одним из показателей местной иммунологической реактивности является локальный цитокиновый профиль отделяемого верхнечелюстной пазухи и смешанной слюны, состоящей из секрета слюнных желез и ряда компонентов ротовой жидкости [3] – релевантно отражающих состояние мукозального иммунитета. Обращает на себя внимание факт, что в настоящий период времени, в комплексную терапию синуситов, переломов нижней челюсти и при установке внутрикостных дентальных имплантатов внедряют различные схемы иммуностропной терапии, в том числе и топической, направленной на коррекцию иммунологических нарушений [4, 5].

Цель работы – провести комплексный анализ системы цитокинов (IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-8, IL-10, TNF α , IFN γ) отделяемого верхнечелюстной пазухи и смешанной слюны у пациентов со стоматологической патологией хирургического профиля (хроническим одонтогенным верхнечелюстным синуситом, осложненным переломом нижней челюсти, а также при проведении внутрикостной дентальной имплантации) и оценить влияние топической иммунотерапии на изучаемые показатели.

Материалы и методы

Настоящее исследование проводилось на кафедре хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии и в научно-исследова-

тельском институте иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России. В рамках проспективного обследования (первый этап) и рандомизированного, простого, «слепого», краткосрочного исследования по оценке применения местной иммунотерапии (вторым этапом) комплексно обследованы с использованием лабораторных и иммунологических методов 218 человек: 44 пациента с установленным диагнозом J 32.0, с континуальным течением (на втором этапе были выделены: 1-я группа сравнения (1ГС, n = 23), с традиционным комплексом лечебных мероприятий; 1-я основная группа (1ОГ, n = 21), пациентам которой проводилась локальная иммунотерапия низкомолекулярным индуктором интерферона – Циклофероном® (меглумина акридоацетат, регистрационный номер № 001049/01-2002, НТФФ «Полисан», СПб; Патент № 2460528 Рос. Федерация), контрольная группа (1КГ) – n = 14; 70 больных с осложненной воспалением травмой нижней челюсти (S 02.6), на этапе рандомизированного исследования разделенные на группы, в зависимости от вида местной терапии: 2-я группа сравнения (2ГС, n = 35) – которым применялось только общепринятое лечение, включающее ортопедические методы иммобилизации, и 2-я основная группа (2ОГ, n = 35), в которой, помимо базовой терапии, применяли гель с рекомбинантным IL-1 β (Патент № 2599509 Рос. Федерация), контрольная группа (2КГ) – n = 10; 70 обследуемых, получивших имплантологическое лечение (установка дентального имплантата с закрытым синус-лифтингом), из общего числа которых на втором этапе выделили 3-ю группу сравнения (3ГС, n = 35), в которой были установлены имплантаты по общепринятой методике без применения иммунопрепаратов и 3-я основная группа (3ОГ, n = 35), пациентам которой на фоне оперативного вмешательства проводилась топическая терапия раствором и гелем рекомбинантного IL-1 β (Беталейкин® – производитель ФГУП «ГНИИ Особо чистых биопрепаратов», СПб, Россия, регистрационное удостоверение № Р N000222/01 от 20.12.2007, Колетекс-Бета® – производитель ООО «Колетекс», Москва, Россия, ТУ 9393-018-58223785-2011; Патент № 2600867 Рос. Федерация), контрольная группа (3КГ) – n = 10. Включенные по общим критериям в исследование пациенты соответствовали по полу, возрасту, локализации и степени тяжести патологического процесса. В группы контроля (n = 34) вошли клинически здоровые лица, сопоставимые по гендерному и возрастному признакам с пациентами.

Концентрацию цитокинов смешанной слюны и содержимого верхнечелюстной пазухи опреде-

ляли методом ИФА, результаты расчета выражали в пкг/мл, забор материала проводили на 2-е, 6-е, 12-е, 24-е сутки. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакетов программ SPSS Statistics 17,0, используя критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке полученных на первых этапах работы данных у пациентов со стоматологической патологией хирургического профиля был выявлен ряд статистически значимых различий с показателями здоровых лиц – у больных с воспалительными процессами в пазухе и с переломом нижней челюсти исходно и в процессе традиционных схем лечения, а у пациентов, получавших

имплантологическое лечение – в послеоперационном периоде. В процессе лечения было выявлено влияние топического иммуноотерапии на изучаемые параметры мукозального иммунитета.

У пациентов 1-й группы исходно наблюдалось превышение контрольных значений IL-1ra, IL-2 (0,1 (0,08-0,129); 1КГ – 0 (0-0,04), $p \leq 0,05$) и IL-8 (273 (231,3-456,32); 1КГ – 188,55 (61,3-192,11), $p \leq 0,05$) при снижении уровней IL-1 β , TNF α и IFN γ в содержимом верхнечелюстного синуса, с сохранением выявленных изменений в послеоперационном периоде (табл. 1). Топическая терапия циклофероном пациентам с хроническим одонтогенным гайморитом оказывала следующее влияние на изучаемые параметры: наблюдалось снижение уровня IL-1ra, с нормализацией к 12-м суткам; к 6-м суткам терапии определялась

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ СОДЕРЖИМОГО ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНОГО СИНУСА У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОДОНТОГЕННЫМ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНЫМ СИНУСИТОМ

TABLE 1. INDICATORS OF CYTOKINE CONCENTRATION IN THE MAXILLARY SINUS CONTENTS IN PATIENTS WITH CHRONIC ODONTOGENIC MAXILLARY SINUSITIS

Цитокины (пкг/мл) Cytokines (pkg/ml)	Сроки (сутки) Deadlines (day)	1-я группа сравнения 1 st comparison group	1-я основная группа 1 st main group	1-я контрольная группа 1 st control group
IL-1 β	1-2-е 1 st -2 nd	35,6 (23,7-54,6)*	45,1 (34,2-58,3)	46,55 (35,35-68,40)
	6-е 6 th	45,6 (25,800-64,625)	51,6 (39,850-69,341)	
	12-е 12 th	50,8 (44,225-68,675)	51,7 (46,3-69,8)**	
IL-1ra	1-2-е 1 st -2 nd	912 (788,7-1217,9)*	897,13 (768,73-1156,80)*	481,04 (423,1-631,4)
	6-е 6 th	853,9 (728,75-970,50)*	513,9 (428,5-650,9)**	
	12-е 12 th	778 (643,00-790,25)*	479 (423,0-620,1)**	
TNF α	1-2-е 1 st -2 nd	6,5 (4,30-8,29)*	7,85 (6,5-10,2)*	18,4 (15,9-30,2)
	6-е 6 th	8,76 (6,28-9,80)*	17,69 (15,8-19,9)**	
	12-е 12 th	9 (8,50-11,68)*	15,1 (10,5-18,83)* **	
IFN γ	1-2-е 1 st -2 nd	0,019 (0,002-0,050)*	0,019 (0,008-0,110)*	0,2 (0,03-0,29)
	6-е 6 th	0,004 (0,0030-0,0008)*	0,194 (0,03-0,28)**	
	12-е 12 th	0,009 (0,003-0,010)*	0,12 (0,073-0,150)* **	

Примечание. * – статистически значимые различия между группами пациентов с группой контроля ($p \leq 0,05$); ** – статистически значимые различия между группами пациентов ($p \leq 0,05$).

Note. *, statistically significant differences between groups of patients with a control group ($p \leq 0.05$); **, statistically significant differences between groups of patients ($p \leq 0.05$).

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ СМЕШАННОЙ СЛЮНЫ У ПАЦИЕНТОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ВНУТРИКОСТНОЙ ДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

TABLE 2. INDICATORS OF THE CONCENTRATION OF CYTOKINES OF MIXED SALIVA IN PATIENTS DURING INTRAOSSEOUS DENTAL IMPLANTATION

Цитокины (пкг/мл) Cytokines (pkg/ml)	Сроки (сутки) Deadlines (day)	3-я группа сравнения 3 rd comparison group	3-я основная группа 3 rd main group	3-я контрольная группа 3 rd control group
IL-1 β	1-2-е 1 st -2 nd	44,3 (26,1-59,1)	37,7 (14,1-60,3)	32,3 (15,3-58,9)
	6-е 6 th	279,1 (266,5-312,5)*	612,5 (571,2-636,2)* **	
	12-е 12 th	167,0 (144,5-200,7)*	281,1 (208,2-501,9)* **	
	24-е 24 th	220,6 (117,9-255,5)*	74,8 (36,1-85,4)* **	
IL-1ra	1-2-е 1 st -2 nd	669 (160-958)	533 (286-1128)	579 (430-1025)
	6-е 6 th	2016 (1486-2879)*	3563 (2601-3834)* **	
	12-е 12 th	2015 (1169-3021)*	1692 (1283-2195)*	
	24-е 24 th	2601 (1216-3605)*	881 (425-1202)**	
IL-8	1-2-е 1 st -2 nd	298,1 (226,2-365,7)	292,5 (226,2-383,7)	304,2 (261,3-423,1)
	6-е 6 th	1301,5 (963,2-1335,1)*	1532,2 (1160,5-2320,7)*	
	12-е 12 th	527,1 (448,2-1012,5)*	799,7 (624,0-839,8)* **	
	24-е 24 th	1044,6 (661,0-1518,8)*	441,1 (387,3-476,9)* **	
IL-10	1-2-е 1 st -2 nd	21,7 (14,7-31,6)	24,1 (17,0-32,2)	24,1 (13,5-34,5)
	6-е 6 th	86,1 (58,8-130,2)*	53,7 (50,9-72,7)* **	
	12-е 12 th	36,1 (31,1-46,9)*	44,1 (36,7-52,0)* **	
	24-е 24 th	30,5 (19,4-35,6)*	33,3 (31,1-42,4)	

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

нормализация значения IL-1 β и IL-8 (1ОГ 200,1 (186,3-215,0)); 1ГС 246,58 (225-398,12), $p \leq 0,05$ с 1ОГ и 1КГ); к 6-му дню лечения выявлялось значительное превышение контрольных значений в показателях содержания TNF α и IFN γ и к 12-м суткам регистрировалось их снижение (табл. 1).

При анализе полученных результатов пациентов с осложненным переломом нижней челюсти исходно было выявлено: высокий сливаторный уровень IL-1 β , IL-8 (528,7 (283,4-528,7), $p = 0,03$ с 2КГ: 386,166 (287,83-538,872)) и IL-10; сниже-

ние TNF α . В динамике традиционной схемы лечения регистрировалось: значительное падение концентрации IL-1 β ниже нормальных значений (2-е сутки: 400 (190,2-515,9); 12-е сутки: 97,3 (60,5-183,9); 2КГ: 177,3 (100,1-299,5), $p = 0,05$); нормализация IL-8; сохранение исходных параметров значений IL-10 (2-е сутки: 10,6 (7,4-17,4); 12-е сутки 7,4 (4,8-11,1), $p = 0,02$ с 2КГ 6,0 (4,4-12,6)) и TNF α (2-е сутки: 5,1 (4,3-9,3); 12-е сутки 5,4 (3,5-7,8), $p = 0,004$ с 2КГ). Под влиянием локального воздействия рекомбинантным IL-1 β

динамические показатели в основной группе продемонстрировали: нормализацию уровней IL-1 β (2ОГ: 154,9 (52,8-218,3), $p = 0,05$ с 2ГС) и TNF α ; снижение до контрольных значений концентрации IL-10 ($p = 0,02$ с 2ГС).

При изучении показателей концентрации провоспалительных цитокинов слюны у пациентов 3ГС были выявлены статистически значимые отличия с контролем, связанные с повышением концентрации на 6-е сутки: IL-1 β – в 8,7 раза; IL-1R – в 3,4 раза; IL-8 – в 4,2 раза, IL-2 – в 2,5 раза; IFN γ – в 1,6 раза, далее регистрировалось умеренное их снижение, однако к 24-му дню показатели провоспалительных цитокинов сохранялись выше контрольных значений: IL-1 β – в 6,8 раза; IL-1ra – в 4,4 раза; IL-8 – в 3,4 раза. Уровень IL-10 на 6-е сутки в 3,5 раза превышал контрольные значения, но к 24-м суткам наблюдения снижались. Локально применяемый беталейкин® оказал следующее влияние на сливаторный цитокиновый профиль: на 6-е сутки был выявлен более значимый рост концентрации основного медиатора воспаления, его ингибитора и хемокина IL-8 ($p = 0,000$ с 3ГС), с последующей нормализацией уровней IL-1 β и IL-1ra к 24-м суткам и снижением IL-8; зарегистрировалось снижение до контроля концентрации IL-2; наблюдалось динамическое сохранение высоких значений противовоспалительного IL-10 ($p = 0,04$ с КГ) (табл. 2).

Анализ полученных данных позволил определить, что на первом этапе исследования в ходе изучения локального цитокинового профиля у пациентов с различной стоматологической патологией хирургического профиля были определены иммунологические признаки недостаточно эффективной воспалительной реакции у всех обследуемых.

Снижение содержания основного медиатора воспаления у пациентов с хроническим одонтогенным синуситом при высоких концентрациях его ингибитора ряд авторов расценивают как признак неэффективности острого воспалительного ответа и предиктор хронизации последнего с развитием затяжного течения местных репаративных процессов [2, 6]. Локальная терапия индуктором интерферона приводила к нормализации изучаемых показателей, что в сопоставлении с клиническими данными может свидетельствовать о более благоприятном послеоперационном течении, связанным, прежде всего, с активацией адекватной воспалительной реакции и регенерацией послеоперационной раны [2, 6]. Зарегистрированный рост концентрации интерферонов содержимого пазухи в ранние сроки применения иммунопрепарата, вероятнее всего, был связан с

его максимальным влиянием на данные параметры цитокинового профиля.

У пациентов с осложненными переломами нижней челюсти при исследовании был выявлен рост уровня флоготических медиаторов, связанный, прежде всего, с реакцией на острую травму и развившееся воспалительное осложнение. Однако зарегистрированное в динамике падение концентрации IL-1 β и низкий уровень TNF α указывали на изменение воспалительного ответа в сторону хронизации и, как следствие, снижения репаративных возможностей тканей [7]. Применяемая топическая цитокинотерапия оказывала влияние на сливаторный цитокиновый профиль путем восстановления измененных параметров – способствовала нивелированию напряжения и созданию более высокого адаптивного потенциала системы мукозального иммунитета.

У пациентов, которым проводилось имплантологическое лечение, был выявлен дисбаланс про- и противовоспалительной системы цитокинов смешанной слюны, и на это указывают, прежде всего, особенности динамики уровня IL-1 β и IL-1ra – значительное повышение их концентрации на протяжении всего послеоперационного периода [5, 8], а также рост уровня IL-8 к 24-м суткам наблюдения, вероятно, связанный с повторной контаминацией. Местная цитокинотерапия рекомбинантным IL-1 β оказывая влияние на уровень цитокинов, приводила к нормализации локальной иммунологической составляющей.

Выводы

Подводя итоги работы, можно резюмировать, что у пациентов со стоматологической патологией хирургического профиля (хронический одонтогенный верхнечелюстной синусит, перелом нижней челюсти, осложненный гнойно-воспалительными процессом) и при проведении дентальной имплантации на основании анализа локального уровня цитокинов выявлены иммунологические предикторы низкой эффективности острого воспалительного ответа, связанные с нарушенным их соотношением в про- и противовоспалительной системе. Обнаружен общий интегральный эффект топической иммунотерапии при вышеуказанных стоматологических заболеваниях, заключающийся в нивелировании дисбаланса системы про- и противовоспалительных цитокинов, путем нормализации их концентрации и, соответственно, в предупреждении хронизации воспалительной послеоперационной реакции.

Список литературы / References

1. Абрамян С.В., Аржанцев А.П., Арутюнов А.С. и др.; под ред. академика РАН А.А. Кулакова. Челюстно-лицевая хирургия: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 691 с. [Abramyan S.V., Arzhantsev A.P., Arutyunov A.S. and others; under the editorship of Academician A.A. Kulakov. Oral and Maxillofacial Surgery: National manual]. Moscow: GEOTAR-Media, 2019. 691 p.
2. Арефьева Н.А., Азнабаева Л.Ф. Исследование местного иммунитета слизистых оболочек верхних дыхательных путей. В кн.: Оториноларингология: национальное руководство / под ред. В.Т. Пальчуна. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. С. 43-55. [Arefieva N.A., Aznabaeva L.F. Study of local immunity of the mucous membranes of the upper respiratory tract. In: Otorhinolaryngology: National manual. Ed. V.T. Palchun]. Moscow: GEOTAR-Media, 2008, pp. 43-55.
3. Козлов И.Г. Микробиота, мукозальный иммунитет и антибиотики: тонкости взаимодействия // РМЖ, 2018. Т. 26, № 8-1. С. 19-27. [Kozlov I.G. Microbiota, mucosal immunity and antibiotics: subtleties of interaction. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2018, Vol. 26, no. 8-1, pp. 19-27. (In Russ.)]
4. Латышова Л.С., Бережная Е.С., Долгушин И.И. Влияние иммунотерапии рекомбинантным ИЛ-1β на клинико-иммунологические показатели пациентов с осложненными переломами нижней челюсти // Проблемы стоматологии, 2017. Т. 13, № 2. С. 49-53. [Latyushina L.S., Berezhnaya E.S., Dolgushin I.I. The effect of immunotherapy with recombinant IL-1β on the clinical and immunological parameters of patients with complicated mandibular fractures. *Problemy stomatologii = Dentistry Problems*, 2017, Vol. 13, no. 2, pp. 49-53. (In Russ.)]
5. Латышова Л.С., Пиотрович А.В., Малышева Л.Ю., Артюхович Т.В., Кузьмина Е.В. Иммунологические особенности развития ранней формы периимплантита и влияние топической иммунотерапии на саливаторный уровень цитокинов при проведении дентальной имплантации // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 3. С. 1211-1216. [Latyushina L.S., Piotrovich A.V., Malysheva L.Yu. Artyukhevich T.V., Kuzmina E.V. Immunological features of the development of an early form of peri-implantitis and the effect of topical immunotherapy on the salivatory level of cytokines during dental implantation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 3, pp. 1211-1216. (In Russ.)]
6. Малышева Л.Ю., Латышова Л.С., Долгушин И.И. Особенности показателей мукозального иммунитета у пациентов с хроническим одонтогенным верхнечелюстным синуситом в зависимости от длительности заболевания // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 226-227. [Malysheva L.Yu., Latyushina L.S., Dolgushin I.I. Features of indicators of mucosal immunity in patients with chronic odontogenic maxillary sinusitis, depending on the duration of the disease. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 226-227. (In Russ.)]
7. Попова Е.В., Тарасов М.Н., Чагина Е.А., Толмачев В.Е. Анализ цитокинового статуса при травматических повреждениях нижней челюсти и их осложнениях // Цитокины и воспаление, 2017. Т. 16, № 3. С. 55-57. [Popova E.V., Tarasov M.N., Chagina E.A., Tolmachev V.E. Analysis of the cytokine status in traumatic injuries of the mandible and their complications. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2017, Vol. 16, no. 3, pp. 55-57. (In Russ.)]
8. Походенько-Чудакова И.О., Карасюк Ю.В. Прогнозирование осложнений дентальной имплантации по физическим показателям биологических сред организма человека на современном этапе // Вятский медицинский вестник, 2018. Т. 57, № 1. С. 76-82. [Pokhodenko-Chudakova I.O., Karasyuk Yu.V. Prediction of complications of dental implantation by physical indicators of biological environments of the human body at the present stage. *Vyatskiy meditsinskiy vestnik = Vyatka Medical Bulletin*, 2018, Vol. 57, no. 1, pp. 76-82. (In Russ.)]

Авторы:

Латышова Л.С. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Малышева Л.Ю. — к.м.н., доцент кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Latyushina L.S., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Malysheva L. Yu., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Пiotрович А.В. — к.м.н., доцент кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Piotrovich A.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Бережная Е.С. — ассистент кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Berezhnaya E.S., Assistant Professor, Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 20.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 20.05.2021
Accepted 17.06.2021

ИММУНОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ С РАЗЛИЧНЫМ МИКРОЭЛЕМЕНТНЫМ СОСТАВОМ

Иванова Е.В., Воронкова И.П., Бондаренко Т.А., Таренкова И.В.

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Оренбург, Россия

Резюме. Возрастающее использование лекарственного растительного сырья связано с тем, что препараты из него выгодно отличаются от синтетических низкой токсичностью, отсутствием побочных эффектов и привыкания. В последние десятилетия большое внимание уделяется изучению иммуностропного и антиоксидантного эффекта лекарственных растений, а также анализу их микроэлементного состава, так как действие основных биологически активных веществ часто проявляется в комплексе с природным минеральным составом растения. Целью работы явилась оценка иммуностропного эффекта водных извлечений официального лекарственного сырья и анализ их микроэлементного состава. Объектами исследования служили водные извлечения (1:10) промышленных образцов 11 видов сырья (листья смородины черной (*Ribes nigrum L.*), трава тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium L.*), корни солодки (*Glycyrrhiza uralensis Fisch.*), цветки бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium (L.) Moench*), зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum*), листья земляники лесной (*Fragaria vesca L.*), плоды черемухи обыкновенной (*Padus avium Mill.*), боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea Mill.*), цветки пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare L.*), корень цикория обыкновенного (*Cichorium intybus Fisch.*) и трава овса посевного (*Avena sativa L.*), поступающие в аптечную сеть г. Оренбурга. Оценка иммуностропного эффекта сырья проводили на модели клеток адаптивного иммунитета по способности их влиять на продукцию цитокинов IL-1 β , TNF α и IL-10. Уровень цитокинов (IL-1 β , TNF α и IL-10) исследовался с помощью ИФА («Цитокин», Санкт-Петербург). Элементный состав образцов сырья определяли масспектрометрией с индуктивно связанной плазмой на приборе ELAN-DRC-e (PerkinElmer SCIEX, США). Анализ иммуностропной активности водных извлечений из официальных лекарственных растений показал, что для большинства растительного сырья характерен супрессивный эффект как в отношении провоспалительных медиаторов (TNF α , IL-1 β), так и основного противовоспалительного цитокина IL-10. Напротив, для водных извлечений тысячелистника, овса и цикория было характерно избирательное иммуномодулирующее действие, направленное на подавление только воспалительных медиаторов. Установлена тенденция к значительному накоплению таких биологически важных микроэлементов, как Zn, Mn, Fe и Cu в составе лекарственных растений, что может обуславливать их биологическую активность и позволяет их рассматривать как перспективные компоненты на этапе разработки препаратов, обладающих как иммуностропным эффектом, так и являющихся источником микроэлементов.

Ключевые слова: цитокины, периферические мононуклеарные лимфоциты, цинк, железо, медь, марганец

Адрес для переписки:

Иванова Елена Валерьевна
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
460000, Россия, г. Оренбург, Парковый пр., 7.
Тел.: 8 (919) 862-50-97.
E-mail: walerewna13@gmail.com

Address for correspondence:

Ivanova Elena V.
Orenburg State Medical University
460000, Russian Federation, Orenburg, Park ave., 7.
Phone: 7 (919) 862-50-97.
E-mail: walerewna13@gmail.com

Образец цитирования:

Е.В. Иванова, И.П. Воронкова, Т.А. Бондаренко, И.В. Таренкова «Имуностропный эффект лекарственных растений с различным микроэлементным составом» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 331-336.
doi: 10.46235/1028-7221-994-IEO

© Иванова Е.В. и соавт., 2021

For citation:

E.V. Ivanova, I.P. Voronkova, A.I. Bondarenko, I.V. Tarenkova "Immunotropic effect of medicinal plants with different microelemental composition", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 331-336.
doi: 10.46235/1028-7221-994-IEO

DOI: 10.46235/1028-7221-994-IEO

IMMUNOTROPIC EFFECT OF MEDICINAL PLANTS WITH DIFFERENT MICROELEMENTAL COMPOSITION

Ivanova E.V., Voronkova I.P., Bondarenko A.I., Tarenkova I.V.

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Abstract. Increasing use of raw materials from medicinal plant is due to the fact that the natural compounds may be preferred to synthetic ones by, generally, low toxicity, absence of side effects and addiction. Over recent decades, much attention has been paid to the study of immunotropic and antioxidant effect of medicinal plants, as well as to analysis of their trace element composition, since the action of the main biologically active substances is often manifested in combination with the natural mineral composition of the plant. The aim of the present work was to assess immunotropic effect of aqueous extracts of officinal medicinal raw materials and to analyze their trace element composition. The objects of the study were water extracts (1:10) from industrial samples of 11 types of raw materials (black currant leaves (*Ribes nigrum* L.), yarrow herb (*Achillea millefolium* L.), licorice roots (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.), Flowers of the sand immortelle (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench), St. John's wort (*Nureicum perforatum*), wild strawberry leaves (*Fragaria vesca* L.), wild bird cherry (*Padus avium* Mill.), blood-red hawthorn (*Crataegus sanguinea* Mill.) (Tanacetum flowers) vulgare L.), common chicory root (*Cichorium intybus* Fisch.) and oat grass (*Avena sativa* L.) supplied to the network of pharmacies in Orenburg. Immunotropic effects of raw plant materials were evaluated in a model of adaptive immunity cells, by their ability to induce production of cytokines: IL-1 β , TNF α and IL-10. The level of cytokines (IL-1 β , TNF α , and IL-10) were assessed using ELISA (Cytokin, St. Petersburg, Russia). Elemental composition of raw material samples was determined by mass spectrometry with inductively coupled plasma using the ELAN-DRC-e device (PerkinElmer SCIEX, USA). Analysis of immunotropic activity of aqueous extracts from officinal medicinal plants showed that the majority of plant raw materials are characterized by a suppressive effect both upon pro-inflammatory mediators (TNF α , IL-1 β), and the main anti-inflammatory cytokine (IL-10). In contrast, aqueous extracts of yarrow, oats and chicory were characterized by a selective immunomodulatory effect aimed at suppressing only inflammatory mediators. A tendency has been established for a significant accumulation of such biologically important trace elements as Zn, Mn, Fe and Cu in medicinal plants, which can determine their biological activity, and allows them to be considered as promising components at the stage of developing drugs that both exert immunotropic effect, and are a source of microelements.

Keywords: cytokines, peripheral mononuclear lymphocytes, zinc, iron, copper, manganese

Введение

Возрастающее использование лекарственного растительного сырья связано с тем, что препараты из него выгодно отличаются от синтетических низкой токсичностью, отсутствием побочных эффектов и привыкания [4]. В последние десятилетия большое внимание уделяется изучению иммуностропного и антиоксидантного эффекта лекарственных растений, а также анализу их микроэлементного состава, так как действие основных биологически активных веществ часто проявляется в комплексе с природным минеральным составом растения. Микроэлементы (МЭ) играют важную роль в организме человека: будучи связанными с гормонами, витаминами, аминокислотами, ферментами, они определяют нормальное течение физиологических процессов [7, 8, 9]. В отличие от различных органических соединений МЭ в организме не синтезируются, они поступают в организм с пищей или в составе лекарственных средств.

В растениях микроэлементы участвуют в синтезе многих соединений первичного (витамины, липиды, углеводы, ферменты, белки) и вторичного метаболизма (эфирные масла, горечи, сердечные гликозиды, сапонины, алкалоиды, кумарины, флавоноиды и т.д.), что обусловлено в значительной мере их коферментными функциями [6]. Данные биологически активные соединения растительного происхождения обладают выраженными иммуностропными и антиоксидантными свойствами [5].

Несмотря на то, что химический состав ряда лекарственных растений достаточно изучен, тем не менее более углубленная дифференциация иммуностропного эффекта лекарственных растений требует внимательного отношения со стороны исследователей. Поскольку в составе одного и того же растения могут содержаться биологически активные вещества как с иммуностимулирующим и иммуномодулирующим эффектом, так и иммуноингибирующим действием [3]. Учитывая, что цитокины регулируют широкий спектр

процессов, протекающих в организме человека, важным является изучение механизмов регулирующего влияния растительных препаратов на клетки-эффекторы адаптивного иммунитета, позволяющие установить «мишень» — направленное их применение при ряде патологических состояний организма человека [1].

В связи с этим поиск соединений с противовоспалительной и иммунорегуляторной активностью или установление такого вида биологической активности у официальных лекарственных растений является актуальным для медицины.

Целью работы явилась оценка иммуностропного эффекта водных извлечений официального лекарственного сырья и анализ их микроэлементного состава.

Материалы и методы

Объектами исследования служили водные извлечения (1:10) промышленных образцов 11 видов сырья (листья смородины черной (*Ribes nigrum* L.), трава тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.), корни солодки (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.), цветки бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench), зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum*), листья земляники лесной (*Fragaria vesca* L.), плоды черемухи обыкновенной (*Padus avium* Mill.), боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Mill.) цветки пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), корень цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* Fisch.) и трава овса посевного (*Avena sativa* L.), поступающие в аптечную сеть г. Оренбурга.

Водные извлечения из лекарственного растительного сырья готовили в соответствии с методикой ГФ XI, вып. 1, стр 147. Элементный состав (Zn, Mn, Fe и Cu) упомянутых образцов официального сырья определяли масспектрометрией с индуктивно связанной плазмой на приборе ELAN-DRC-e (PerkinElmer SCIEX, США) согласно методике [2]. В нормативно-технической документации, регламентирующей качество лекарственного растительного сырья, отсутствуют показатели предельно-допустимых концентраций химических элементов и их соединений, которые могут накапливать растения, за исключением Pb, Cd, As, Hg, радионуклидов ^{137}Cs и ^{90}Sr и пестицидов. Нами были использованы значения предельно допустимых концентраций (ПДК), принятые для биологически активных добавок к пище на растительной основе.

Определение противовоспалительной активности водных извлечений лекарственных растений проводили на модели периферических мононуклеарных клеток здоровых доноров. Лейкоциты выделяли в стерильных условиях из гепаринизированной крови здоровых доноров методом градиентного центрифугирования (400 g)

в фиколл-верографине (Pharmacia, Швеция) плотностью 1,077г/см³. Продукцию цитокинов изучали в культуре мононуклеаров, сокультивируемой с водными извлечениями лекарственных растений (опыт) и без них (контроль) после 24-часовой инкубации клеток (2×10^6) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в полной культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10%-ной инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США) и 80 мкг/мл гентамицина. Через сутки собирали супернатанты и замораживали (-200 °С) для дальнейшего определения в них уровня цитокинов. Продукция цитокинов (IL-1β, TNFα и IL-10) исследовалась с помощью ИФА («Цитокин», Санкт-Петербург). Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, США) с оценкой различий между величинами по критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Одним из механизмов иммуностропного действия лекарственных растений является влияние на секрецию про- или противовоспалительных цитокинов [1, 3]. В настоящем исследовании изучали влияние водных извлечений ЛР на продукцию IL-1β, TNFα и IL-10 — цитокинов, опосредующих формирование Th1 (IL-1β) и Th2 (TNFα, IL-10) иммунного ответа.

Оказалось, что выработку периферическими мононуклеарными клетками провоспалительных цитокинов (IL-1β, TNFα) подавляют все исследуемые извлечения, а на продукцию противовоспалительного цитокина IL-10 достоверного влияния не оказывали только водные извлечения тысячелистника, овса и цикория. Уровень продукции IL-1β в условиях влияния извлечением из сырья тысячелистника, зверобоя и бессмертника составил $2,93 \pm 0,13$ пкг/мл, $2,28 \pm 0,1$ пкг/мл и $4,62 \pm 0,05$ пкг/мл (соответственно), что достоверно ниже контроля лимфоцитов — $83,9 \pm 0,5$ пкг/мл ($p < 0,05$). Выраженное снижение IL-1β в культуральной среде также отмечалось при влиянии цикория ($13,47 \pm 0,5$ пкг/мл) и пижмы ($20,42 \pm 1,3$ пкг/мл).

На продукцию TNFα значительно оказывали влияние извлечения из сырья черной смородины, корня цикория и солодки — $5,2$ - $5,5$ пкг/мл, а также пижмы — $6,2 \pm 0,3$ пкг/мл и бессмертника — $8,1 \pm 0,5$ пкг/мл. Уровень продукции TNFα в присутствии водных извлечений других лекарственных растений варьировал от $11,2 \pm 0,5$ пкг/мл до $18,9 \pm 0,5$ пкг/мл. Различие с контролем было достоверно, содержание TNFα в культуральной среде лимфоцитов без ЛР составляло $30,0 \pm 2,1$ пкг/мл ($p < 0,05$).

Продукция IL-10 лимфоцитами при соинкубировании с водными извлечениями черная

смородина ($1,5 \pm 0,05$ пкг/мл), бессмертник ($5,9 \pm 0,3$ пкг/мл), земляника ($2,1 \pm 0,05$ пкг/мл), корень солодки ($1,8 \pm 0,05$ пкг/мл), пижма ($2,8 \pm 0,05$ пкг/мл) и боярышник ($5,6 \pm 0,5$ пкг/мл) была достоверно ниже контроля – $18,5 \pm 0,05$ пкг/мл ($p < 0,05$). Снижение секреции основного противовоспалительного цитокина IL-10 периферическими мононуклеарными клетками в присутствии данных извлечений может быть неблагоприятным эффектом лекарственных растений на этапе регуляции специфических иммунных реакций и ограничения развития воспаления [10].

Далее для оценки противовоспалительного потенциала различных видов лекарственных растений было рассчитано среднее арифметическое значение соотношения противовоспалительного цитокина IL-10, являющегося ингибитором воспаления и цитокинового каскада, к маркерным цитокинам Th1 (IL-1 β) и Th2 (TNF α) иммунного ответа.

Наиболее высокие значения показателя соотношения IL-1 β /IL-10, характеризующего вероятность супрессии раннего провоспалительного цитокина системного действия, выявлены под влиянием водных извлечений зверобоя ($12,4 \pm 0,5$ усл. ед.) и тысячелистника ($24,6 \pm 1,2$ усл. ед.). Для бессмертника и цикория данный показа-

тель составил $6,15 \pm 0,05$ усл. ед. и $5,26 \pm 0,05$ усл. ед. соответственно. Среди остальных видов исследуемых лекарственных растений показатель соотношения IL-1 β /IL-10 находился в пределах значений 0,35-1,95 усл. ед.

При сравнении показателя соотношений оппозитных цитокинов TNF α /IL-10 периферических мононуклеарных клеток, секретируемых под влиянием водных извлечений, были установлены выраженные значения для цикория ($4,87 \pm 0,05$ усл. ед.), бессмертника ($1,6 \pm 0,01$ усл. ед.), черной смородины ($1,5 \pm 0,01$ усл. ед.) и зверобоя ($1,47 \pm 0,01$ усл. ед.). Для большинства лекарственных растений показатель соотношения TNF α /IL-10 варьировал в пределах 0,16-0,95 усл. ед.

Результаты определения МЭ представлены в таблице 1 и свидетельствуют о значительных количественных различиях их элементного состава. Во всех исследуемых видах растений была отмечена тенденция к значительному накоплению таких биологически важных микроэлементов, как Zn, Mn, Fe и Cu. Интересно, что содержание Mn варьировало в диапазоне от $8,12 \pm 0,588$ мкг/г до $144,8 \pm 1,998$ мкг/г, т.е. изменялось практически в 18 раз. Марганец не был обнаружен в образцах

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ, М \pm м

TABLE 1. CONTENT OF MICROELEMENTS IN MEDICINAL PLANTS, M \pm m

Вид растения Type of plant	Микроэлементы, мкг/г Trace elements, μ g/g			
	Cu	Zn	Fe	Mn
<i>Crataegus sanguinea Mill.</i>	$3,50 \pm 0,17$	$16,42 \pm 1,48^*$	$17,52 \pm 4,74$	$8,12 \pm 0,58$
<i>Padus avium Mill.</i>	$4,30 \pm 0,34$	$19,08 \pm 1,52^*$	$28,22 \pm 3,85$	$12,92 \pm 0,71$
<i>Hypericum perforatum</i>	$5,46 \pm 0,24$	$17,54 \pm 0,92^*$	$48,04 \pm 9,22$	$64,02 \pm 4,03$
<i>Achillea millefolium L.</i>	$5,92 \pm 0,21$	$20,26 \pm 0,58^*$	$68,84 \pm 7,12$	$18,59 \pm 0,41$
<i>Tanacetum vulgare L.</i>	$8,24 \pm 0,24^*$	$19,38 \pm 0,28^*$	$47,48 \pm 3,54$	$104,60 \pm 0,71$
<i>Avena sativa L.</i>	$2,96 \pm 0,10$	$17,86 \pm 0,86^*$	$33,48 \pm 2,02$	$28,04 \pm 1,38$
<i>Fragaria vesca L.</i>	$4,86 \pm 0,21$	$12,64 \pm 0,35$	$746,6 \pm 10,4$	$37,70 \pm 0,83$
<i>Ribes nigrum L.</i>	$5,76 \pm 0,28$	$27,14 \pm 1,45^*$	$116,62 \pm 8,90$	—
<i>Helichrysum arenarium L.</i>	$11,70 \pm 0,44^*$	$35,14 \pm 0,81^*$	$89,2 \pm 10,7$	—
<i>Glycyrrhiza uralensis Fisch.</i>	$8,48 \pm 0,27^*$	$14,62 \pm 0,47$	$128,92 \pm 5,80$	—
<i>Cichorium intybus Fisch.</i>	$4,64 \pm 0,17$	$8,60 \pm 0,20$	$83,76 \pm 7,48$	—
ПДК, установленные для сухих овощей и фруктов Maximum concentration limits established for dry vegetables and fruits	5,0	10,0	Не установлено Not installed	Не установлено Not installed

Примечание. «—» – не обнаружено; * – при $p \leq 0,05$ в сравнении с ПДК.

Note. “—”, not found; *, at $p \leq 0.05$ in comparison with MCL.

смородины, бессмертника, календулы, корня солодки, цикория.

На Fe и Mn отсутствуют значения ПДК, но самое высокое содержание марганца отмечалось в пижме и зверобое ($144,8 \pm 1,99$ мкг/г, $104,6 \pm 0,71$ мкг/г, $64,02 \pm 4,03$ мкг/г соответственно), наиболее низкое содержание в плодах боярышника и черемухи (не более 8,12–12,92 мкг/г).

Содержание Fe в исследованных лекарственных растениях варьировало от $17,52 \pm 4,74$ до $746,6 \pm 10,4$ мкг/г и наиболее высокий уровень микроэлемента отмечался в землянике, черной смородине и корне солодки. У большинства лекарственных растений накопление Fe составляло $48,04 \pm 9,22$ – $90,18 \pm 7,4$ мкг/мл.

Медь в большинстве исследуемых видов лекарственных растений находится на уровне ПДК или немного ниже. Выше ПДК содержание меди у пижмы обыкновенной и солодки в 1,7 раза, бессмертника – в 2,3 раза. Концентрация цинка выше ПДК во всех растениях за исключением цикория ($8,6 \pm 0,20$ мкг/г). Так, наиболее высокие концентрации цинка были установлены в бессмертнике и черной смородине ($35,14 \pm 0,81$ мкг/г, $27,14 \pm 1,45$ мкг/г соответственно). В среднем содержание цинка в лекарственных растениях составило – $18,53 \pm 0,51$ мкг/г.

В настоящее время установлено, что почти все питательные вещества имеют важное значение в поддержании «оптимального» иммунного ответа. Лекарственное растительное сырье может быть дополнительным источником как биологически активных веществ, так и микроэлементов для восполнения их недостатка в организме человека, особенно при развитии воспалительных заболеваний и вторичных иммунодефицитных состояний.

Известно, что микроэлементы в клетках иммунной системы являются кофакторами ферментов свободнорадикального окисления. Дефицит цинка характеризуется нарушениями роста, полового созревания, а также повышает чувствительность организма к инфекциям. Характерными признаками дефицита цинка является атрофия тимуса, угнетение НК-клеток и снижение уровня предшественников Т- и В-лимфоцитов в центральных органах иммуногенеза, с дальнейшим развитием лимфопении и иммунодефицитных состояний [8].

Дефицит железа способствует снижению колонизационной резистентности организма, повышая восприимчивость организма к бактериальным и вирусным инфекциям. В ряде исследований показана эффективность использования железа в комплексной терапии ОРВИ и острых кишечных инфекций. Марганец является кофактором многих ферментов, в том числе суперок-

сиддисмутазы, участвующей в перекисном окислении липидов в клетках иммунной системы. Медь участвует в процессе кроветворения, влияет на функции иммунокомпетентных клеток [7, 9].

Микроэлементы способствуют продуцированию в растениях биологически активных веществ: витаминов, флавоноидов, танинов и многих других фармакологически активных соединений [3], определяющие иммуотропную и антиоксидантную активность лекарственных растений. Из литературных источников известна способность растений, синтезирующих производные 2-фенилхромана и 2-фенилхромена, концентрировать комплекс МЭ, преимущественно Cu, Mn, Cr, Zn, Co. В экспериментальных и клинических исследованиях установлено, что в составе комплексов микроэлементы, полифенолы обладают выраженным противовоспалительным и иммунорегуляторным действием.

Выводы

Анализ иммуотропной активности водных извлечений из официальных лекарственных растений показал, что для большинства растительного сырья характерен супрессивный эффект как в отношении провоспалительных медиаторов (TNF α , IL-1 β), так и основного противовоспалительного цитокина IL-10. Выявленные особенности в отношении влияния ЛР на способность клеток адаптивного иммунитета секретировать цитокины могут свидетельствовать о наличии в составе данных групп растительного сырья преимущественно биологически активных соединений с иммунодепрессивным эффектом. Напротив, для водных извлечений тысячелистника, овса и цикория было характерно избирательное иммуномодулирующее действие, направленное на подавление только воспалительных медиаторов.

Кроме того, установленная в нашей работе тенденция к значительному накоплению таких биологически важных микроэлементов как Zn, Mn, Fe и Cu в составе официальных лекарственных растений может обуславливать их биологическую активность. Результаты настоящего исследования позволяют заключить, что исследуемые извлечения из лекарственного растительного сырья могут рассматриваться как перспективные компоненты на этапе разработки препаратов, обладающих как иммунорегуляторным и противовоспалительным эффектом, так и являющихся источником микроэлементов. Кроме того, изучение микроэлементного состава лекарственных растений может иметь значение на этапе оценки экологической чистоты лекарственного растительного сырья.

Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы / References

1. 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 // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 139-144. [Mikhailova I.V., Perunova N.B., Ivanova E.V., Chainikova I.N., Kuzmicheva N.A., Filippova Yu.V. Immunoregulatory effects of medicinal plants containing flavonoids in the model of human peripheral blood mononuclear cells. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 139-144. (In Russ.)]
2. Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках методом массспектрометрии с индуктивно-связанной аргонной плазмой: Методические указания (МУК 4.1.1483-03). М.: ФЦГСЭН МЗ РФ, 2003. 36 с. [Determination of the content of chemical elements in diagnosed biosubstrates, preparations and biologically active additives by mass spectrometry with inductively coupled argon plasma: Methodical instructions (МУК 4.1.1483-03)]. Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2003. 36 p.
3. Шур Ю.В., Шур В.Ю., Самотруева М.А. Некоторые механизмы иммуотропного и адаптогенного действия фитопрепаратов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, 2019. Т. 17, № 4. С. 19-29. [Shur Yu.V., Shur V.Yu., Samotrueva M.A. Some mechanisms of immunotropic and adaptogenic action of phytopreparations. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii = Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2019, Vol. 17, no. 4, pp. 19-29. (In Russ.)]
4. Alqethami A., Aldhebani A.Y., Teixidor-Toneu I. Medicinal plants used in Jeddah, Saudi Arabia: A gender perspective. *J. Ethnopharmacol.*, 2020, Vol. 15, no. 257, 112899. doi: 10.1016/j.jep.2020.112899.
5. Mermigka G., Amprazi M., Mentzelopoulou A., Amartolou A., Sarris P.F. Plant and animal innate immunity complexes: fighting different enemies with similar weapons. *Trends. Plant. Sci.*, 2020, Vol. 25, no. 1, pp. 80-91.
6. Muszyńska E., Labudda M. Dual role of metallic trace elements in stress biology—from negative to beneficial impact on plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 13, 3117. doi: 10.3390/ijms20133117.
7. Nakamura T., Naguro I., Ichijo H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. *Biochim. Biophys. Acta Gen Subj.*, 2019, Vol. 1863, no. 9, pp. 1398-1409.
8. Skrajnowska D., Bobrowska-Korczak B. Role of zinc in immune system and anti-cancer defense mechanisms. *Nutrients*, 2019, Vol. 11, no. 10, 2273. doi: 10.3390/nu11102273.
9. Vetchý M.P.J.V.K.K.D. Biological role of copper as an essential trace element in the human organism. *Ceska Slov. Farm.*, 2018, Vol. 67, no. 4, pp. 143-153.
10. Wang X., Wong K., Ouyang W., Rutz S. Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2019, Vol. 11, no. 2, a028548. doi: 10.1101/cshperspect.a028548.

Авторы:

Иванова Е.В. — д.м.н., доцент, доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Воронкова И.П. — к.б.н., доцент, доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

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

Таренкова И.В. — ассистент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Authors:

Ivanova E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Voronkova I.P., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Bondarenko A.I., Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Tarenkova I.V., Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 17.06.2021

ДИНАМИКА ФАКТОРОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ, ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СТРЕПТОДЕРМИЕЙ, МЕТОДЫ КОРРЕКЦИИ

Гизингер О.А.¹, Лакницкая А.О.², Зиганшин О.Р.³

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

² ГБУЗ «Челябинский областной кожно-венерологический диспансер», г. Челябинск, Россия

³ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. Наличие связи между процессами в системе «Перекисное окисление липидов-антиоксидантная защита», изменений в балансе Th1/Th2-иммунного ответа и цитокинов, снижение концентрации интерлейкина 2 (IL-2), уменьшение количества рецепторов к IL-2 на лимфоцитах CD25⁺, нарушение активности ферментов антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы и каталазы, снижение общего антиоксидантного статуса диктуют необходимость применения в терапии хронической стрептодермии методов комплексного воздействия на все составляющие патологического процесса путем восстановления баланса цитокинов, ликвидации оксидативного стресса и хронического воспалительного очага на поверхности кожных покровов. Группу исследования составили 50 пациентов мужского пола с хронической стрептодермией, длительностью более 2 лет. Средний возраст 32,25±4,23 года, для сравнения использованы показатели здоровых добровольцев на основе информированного согласия. Цель исследования – на основании анализа состояния иммунных факторов, прооксидантного и антиоксидантного статуса предложить метод терапии хронической стрептодермии с применением рекомбинантного IL-2 и лазерного излучения низкой интенсивности. В стандартное лечение входила обработка пораженной поверхности 1%-ным водным раствором хлоргексидина биглюконата, 2%-ная мазь с действующим веществом мупироцин, наружно на область высыпаний, 7 дней, действие на поверхность кожных покровов лазером низкой интенсивности 405±10 нм (синий свет), аппарат «Мустанг» (Москва), регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1410 от 06.02.2014 по ТУ 9444-005-720850602008, режим воздействия соответствовал рекомендациям производителя аппарата. Мощность излучения составила 80,0±5,0 мВт, 10 дней и подкожное введение рекомбинантного IL-2 (Ронколейкин®) 500 000 МЕ, разведенного физиологическим раствором с интервалом 24 часа в течение 5 дней. В процессе комплексного лечения с применением рекомбинантного IL-2 и воздействия лазером низкой интенсивности у пациентов с хронической стрептодермией отмечена положительная клиническая динамика, зарегистрированная по данным визуально-аналоговой шкалы, нормализации цитокинового баланса: снижению содержания провоспалительных цитокинов и нормализация антиоксидантного статуса. Таким образом, применение воздействие синего света видимого диапазо-

Адрес для переписки:

Гизингер Оксана Анатольевна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
117049, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8.
Тел.: 8 (919) 319-46-04.
E-mail: OGizinger@gmail.com

Address for correspondence:

Gizinger Oksana A.
Peoples' Friendship University of Russia
117049, Russian Federation, Moscow,
Miklukho-Maclay str., 8.
Phone: 7 (919) 319-46-04.
E-mail: OGizinger@gmail.com

Образец цитирования:

О.А. Гизингер, А.О. Лакницкая, О.Р. Зиганшин
«Динамика факторов антиоксидантной
защиты, цитокинов у пациентов с хронической
стрептодермией, методы коррекции» // Российский
иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 337-342.
doi: 10.46235/1028-7221-984-DOA
© Гизингер О.А. и соавт., 2021

For citation:

O.A. Gizinger, A.O. Laknitskaya, O.R. Ziganshin "Dynamics
of antioxidant protection factors, cytokines in patients with
chronic streptoderma, correction methods", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021,
Vol. 24, no. 2, pp. 337-342.
doi: 10.46235/1028-7221-984-DOA
DOI: 10.46235/1028-7221-984-DOA

на с длиной волны $450,0 \pm 10,0$ нм и подкожно раствор рекомбинантного ИЛ-2 (Ронколейкин®) 500 000 МЕ является обоснованным в комплексной терапии хронической стрептодермии.

Ключевые слова: цитокины, стрептодермия, супероксиддисмутаза, лазерное излучение низкой интенсивности

DYNAMICS OF ANTIOXIDANT PROTECTION FACTORS, CYTOKINES IN PATIENTS WITH CHRONIC STREPTODERMIA, CORRECTION METHODS

Gizinger O.A.^a, Laknitskaya A.O.^b, Ziganshin O.R.^c

^a Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

^b Regional Dermatovenereologic Dispensary, Chelyabinsk, Russian Federation

^c South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Certain relationships exist between different biological systems, i.e., lipid peroxidation/antioxidant defense system; changing balance of Th1/Th2 immune response and cytokines; a decrease of interleukin 2 (IL-2) concentration; lower number of IL-2 receptors on CD25⁺ lymphocytes, impaired activity of protective antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase); decreased general antioxidant status. These connections justify an approach to treatment of chronic streptoderma, using combined effects upon all components of the pathological process, by restoring the cytokine balance, eliminating oxidative stress and chronic inflammatory foci on the skin surface. The study group consisted of 50 male patients with chronic streptoderma, lasting for more than 2 years. Average age of the patients was 32.25 ± 4.23 years; for comparison, the indexes of healthy volunteers were used on the basis of informed consent. The aim of the present study was to propose a method for treating chronic streptoderma using recombinant interleukin-2 and low-intensity laser irradiation justified by assessment of immune profile, pro-oxidant and antioxidant status. Standard therapy included local treatment of the affected surface with 1% aqueous solution of chlorhexidine bigluconate; 2% ointment with mupirocin as an active substance, applied to the area of rashes for 7 days; treatment of the skin surface with a low-intensity laser at the wavelength 40 ± 10 nm (blue light) using a Mustang device (Moscow, registration certificate No. RZN 2014/1410 of 06.02.2014), according to technical conditions TU 9444-005-720850602008. The irradiation exposure mode corresponded to recommendations of the device manufacturer. The radiation power was 80.0 ± 5.0 mW, applied for 10 days, along with subcutaneous administration of recombinant IL-2 (Roncoleukin®) 500,000 IU, diluted with saline at the interval of 24 hours for 5 days. Positive clinical dynamics was noted during complex treatment which involved recombinant IL-2 and low-intensity laser exposure in the patients with chronic streptoderma, according to evaluation by a visual analogue scale, normalization of the cytokine balance (decreased contents of pro-inflammatory cytokines), and normalization of antioxidant status. Thus, the use of blue light exposure at the visible range (wavelength of 450.0 ± 10.0 nm) and subcutaneous injections of recombinant IL-2 (Roncoleukin®, 500,000 IU) is a justified method in complex therapy of chronic streptoderma.

Keywords: cytokines, streptoderma, superoxide dismutase, laser irradiation, low intensity

Введение

Иммунные реакции, нарушение баланса факторов прооксидантной и антиоксидантных систем в ответ на действие *S. pyogenes* приводят к формированию иммунодефицитного состояния, изменению качественного и количественного состава форменных элементов крови, нарушению функционально-метаболического статуса фагоцитов [5]. Клинически, данная ситуация вы-

ражается в рецидивировании и хронизации заболевания. Ежегодно появляются данные о патогенетических особенностях стрептодермии, роли факторов врожденного и адаптивного иммунитета в ее патогенезе, и, соответственно, новые подходы к лечению [2]. Сложность состоит в том, что большинство применяемых методов терапии *S. pyogenes* имеет невысокую эффективность по причине роста антибиотикорезистентности. Вышеперечисленные обстоятельства дают осно-

вания к продолжению поиска новых способов и индивидуальных подходов к лечению стрептодермий т.е. с использованием принципа персонализированной терапии и точечного воздействия на патогенетический очаг. Z.T. Cusumano с соавторами отмечено, помимо прямого воздействия на очаг поражения, при стрептодермии необходимо восстанавливать баланс иммунных механизмов путем восстановления содержания цитокинов и ликвидаций оксидативного стресса [3]. Колонизация *S. pyogenes* не дает возможности реализовать его эксклюзию патогена с участием системы Th1, приводя к нарушению кровоснабжения, отеку, активации условно-патогенной или сапрофитной флоры. Ряд авторов свидетельствует об иммунных нарушениях и иммунологической эффективности ИЛ-2 и его рекомбинантного аналога в комплексной терапии стрептодермий. Предполагается, что степень выраженности иммунных дисфункций коррелирует с дисбалансом факторов перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты, что негативно отражается на скорости процессов репарации кожных покровов, снижая колонизационную резистентность. Учитывая вышеизложенное, мы полагаем, что наряду с базисными методами антимикробной терапии возможно с успехом применять лазерную терапию с длиной волны 405 ± 10 нм, мощность излучения $80,0\pm 5,0$ мВт, учитывая его противоотечное, противозудное, противовоспалительное и иммуномодулирующее действие [4] и рекомбинантный ИЛ-2.

Цель настоящего исследования — на основании анализа состояния иммунных факторов, прооксидантного и антиоксидантного статуса предложить метод терапии хронической стрептодермии с применением рекомбинантного ИЛ-2 и лазерного излучения низкой интенсивности.

Материалы и методы

Настоящее исследование проведено в поликлиническом отделении Челябинского областного клинического кожно-венерологического диспансера (454048, г. Челябинск, ул. Яблочкина, 24). План исследования одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России. В основной когорте были 50 обследуемых пациентов мужского пола, подписавших информированное согласие, с хронической стрептодермией, длительностью более 3 лет, в возрасте $32,25\pm 4,23$ года. 50 пациентов с хронической стрептодермией были рандомизированы на 2 группы в зависимости от метода терапии. В первой группе больным ежедневно производилась

обработка пораженной поверхности 1%-ным водным раствором хлоргексидина биглюконата, бесконтактно действие лазером низкой интенсивности 405 ± 10 нм — 10 дней, раствор рекомбинантного ИЛ-2 (Ронколейкина®) подкожно 500 000 МЕ № 5 с интервалом 24 часа и 2%-ная мазь мупироцин — 7 дней. Пациентам группы 2 проводилась базовая терапия в виде обработки пораженной поверхности 1%-ным водным раствором хлоргексидина биглюконата в течение 7 дней, 2%-ной мазью мупироцин 7 дней. Всем пациентам до начала исследования и на 7-й день терапии проводили бактериологическое исследование с целью выявления *S. pyogenes* и других патогенных и условно-патогенных микроорганизмов на поверхности воспалительного очага их антибиотикочувствительности в микробиологической лаборатории Челябинского областного клинического кожно-венерологического диспансера. Контрольную (третью группу) составили 50 здоровых мужчин в возрасте $34,12\pm 4,98$ лет, подписавшие согласие на участие в исследовании. Всем участникам исследования проведен забор венозной крови натощак, утром для проведения иммунологических и биохимических исследований в специальные пробирки с ЭДТА. Для оценки боли и субъективных ощущений в области высыпаний использовали визуально-аналоговую шкалу (ВАШ), в первые сутки и на 7-е сутки лечения. Воздействие лазером низкой интенсивности проводили в физиотерапевтическом кабинете с соблюдением правил техники безопасности с использованием аппаратного комплекса «Мустанг» (Москва, Россия), регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1410 от 06.02.2014 по ТУ 9444-005-720850602008, режим воздействия соответствовал рекомендациям производителя аппарата. Длина волны 405 ± 10 нм (синий свет), режим работы — непрерывный. Мощность излучения — $80,0\pm 5,0$ мВт, плотность мощности 40 мВт/см² экспозиция $5,0\pm 0,1$ мин.

Определение концентрации ИЛ-2, TNF α , ИЛ-8 в сыворотке крови было проведено с применением соответствующих тест систем на базе клинико-диагностической лаборатории Ситимед (Челябинск, Свердловский проспект, 2). Полученные результаты выражали в пг/мл. Исследование активности супероксиддисмутазы, глутатиона, общего антиоксидантного статуса (ТАС) проведено в ООО «Лаборатория «Гемотест» (сертификат соответствия требованиям ГОСТ Р ИСО 9001-2015, ГОСТ Р ИСО 15189-2015). Статистическая обработка результатов производилась с использованием пакета прикладных сертифицированных

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ БОЛЕВЫХ ОЩУЩЕНИЙ, СУХОСТИ И ЗУДА КОЖНЫХ ПОКРОВОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СТРЕПТОДЕРМИЕЙ

TABLE 1. LEVEL OF PAIN, DRYNESS AND ITCHING OF THE SKIN IN PATIENTS WITH CHRONIC STREPTODERMA

Показатель визуально-аналоговой шкалы Visual analogue scale	Группа 1 Пациенты со стрептодермией (лазерная терапия + rIL-2) Group 1 Patients with streptoderma (laser therapy + rIL-2)		Группа 2 Пациенты со стрептодермией (стандартная терапия) Group 2 Patients with streptoderma (basic therapy)		Группа 3 Пациенты без стрептодермии Group 3 Patients without streptoderma	
	1-й день лечения 1 st day of treatment	7-й день лечения 7 th day of treatment	1-й день лечения 1 st day of treatment	7-й день лечения 7 th day of treatment	1-й день лечения 1 st day of treatment	7-й день лечения 7 th day of treatment
Баллы ВАШ Indicators of a visual analogue scale	6,1±0,9	3,25±0,14	6,60±0,67	5,20±0,21	0	0
p	$p_{1-3} < 0,05, p_{2-3} < 0,05, p_{1-2} \geq 0,05$ (1-й день лечения / 1 st day of treatment) $p_{1-3} < 0,05, p_{2-3} < 0,05, p_{1-2} \geq 0,05$ (7-й день лечения / 7 th day of treatment)					

Примечание. p – достоверность различий показателей между группами пациентов до и после лечения и в сравнении с показателями группы пациентов без признаков стрептодермии (группа 3) на 7-й день терапии, рассчитана по критерию Манна–Уитни, различия считаются достоверными и статистически значимыми при $p < 0,05$.

Note. p, reliability of the differences between the groups of patients before and after treatment and in comparison with the indicators of the group of patients without signs of streptodermia (group 3) on the 7th day of therapy, calculated according to the Mann–Whitney test, the differences are considered significant and statistically significant at $p < 0.05$.

программ Statistica 10.0 с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Оценка пациентами состояния с использованием ВАШ показала, что комплексная терапия с применением лазерного излучения низкой интенсивности и рекомбинантного IL-2 (Ронколейкина®) подкожно 500 000 МЕ № 5 приводила к снижению напряженности клинической картины по таким параметрам, как отек, гиперемия, сухость кожных покровов, зуд, наличие сухих корок на поверхности кожи. Отмечено отсутствие достоверных различий по отсутствию выраженности клинических проявлений у пациентов групп 1 и 3, $p_{1-3} < 0,05, p_{2-3} < 0,05$ (табл. 1).

Эффективность низкоинтенсивной лазеротерапии подтверждается рядом авторов, свидетельствующих о нормализующем и бактериостатическом эффекте лазера низкой интенсивности с длиной волны 405–420 нм [4], в том числе в работе А.Н. Bashkatov, где показано, что действие лазера низкой интенсивности в интервалах длин волн

405–475 нм снижает болевую чувствительность в облучаемой зоне за счет уменьшения импульсной активности нервных окончаний и конформационных изменений белков потенциал-зависимых натриевых ионных каналов нейролеммы кожных афферентов [1]. Выявленная иммунологическая эффективность комплексной терапии стрептодермии с использованием рекомбинантного IL-2 и механизм коррекции иммунологических нарушений при стрептодермии связаны с восстановлением и ликвидацией дефицита IL-2, стимулирующего иммунный гомеостаз в системе Th1/Th2, снижая концентрацию TNF α , IL-8, устраняя ПОЛ ограничивающий эффект, связанный с оксидативным стрессом на поверхности воспалительного очага при хронической стрептодермии. Таким образом, комплексная терапия пиодермии, этиологическим фактором которой является *S. pyogenes* с использованием лазера низкой интенсивности и рекомбинантного IL-2, способствует нормализации содержания супероксидсмутазы, глутатиона, общего антиоксидантного статуса при данной патологии $p_{1-3} < 0,05, p_{2-3} < 0,05$ (табл. 2).

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ, ФАКТОРОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ, ОБЩЕГО АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА (TAS) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СТРЕПТОДЕРМИЕЙ

TABLE 2. DYNAMICS OF THE CONCENTRATION OF CYTOKINES, ANTIOXIDANT DEFENSE FACTORS, TOTAL ANTIOXIDANT STATUS (TAS) IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH CHRONIC STREPTODERMA

Концентрации цитокинов, факторов антиоксидантной защиты, общего антиоксидантного статуса (TAS) в сыворотке крови пациентов с хронической стрептодермией Concentration of cytokines, antioxidant defense factors, total antioxidant status (TAS) in the blood serum of patients with chronic streptoderma	Группа 1 Пациенты со стрептодермией (лазерная терапия + rIL-2) Group 1 Patients with streptoderma (laser therapy + rIL-2)		Группа 2 Пациенты со стрептодермией (стандартная терапия) Group 2 Patients with streptoderma (basic therapy)		Группа 3 Пациенты без стрептодермии Group 3 Patients without streptoderma	
	1-й день лечения 1 st day of treatment	7-й день лечения 7 th day of treatment	1-й день лечения 1 st day of treatment	7-й день лечения 7 th day of treatment	1-й день лечения 1 st day of treatment	7-й день лечения 7 th day of treatment
Интерлейкин-2, пг/мл Interleukin 2, pg/ml	1,23±0,76	3,25±0,91	1,25±0,12	1,24±0,09	2,23±0,92	2,45±0,13
Фактор некроза опухоли α, пг/мл TNFα, pg/ml	0,66±0,06	0,88±0,21	0,34±0,19	1,78±0,09	0,76±0,12	0,75±0,16
Интерлейкин-8, пг/мл Interleukin 8, pg/ml	6,56±0,05	1,87±0,21	6,34±0,79	5,78±0,12	1,76±0,10	1,71±0,32
Супероксиддисмутаза, Ед/мл Superoxidedismutase, U/ml	123,05±10,11	263,90±10,43	118,00±10,98	153,90±10,56	255,90±10,23	253,88±10,76
Глутатион, нг/мл Glutathione, ng/ml	24,18±1,45	234,11±10,09	24,17±1,33	595,12±10,67	123,00±10,11	125,11±10,97
Общий антиоксидантный статус, ммоль/л Total antioxidant status (TAS), mmol/l	2,81±0,69	1,84±0,79	2,91±0,72	2,67±0,45	1,98±0,33	1,81±0,23
p	p ₁₋₃ < 0,05, p ₂₋₃ < 0,05, p ₁₋₂ ≥ 0,05 (1-й день лечения / 1 st day of treatment) p ₁₋₃ < 0,05, p ₂₋₃ < 0,05, p ₁₋₂ ≥ 0,05 (7-й день лечения / 7 th day of treatment)					

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Выводы

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить следующее. У пациентов с хронической стрептодермией, длительностью более 2 лет выявлено угнетение спонтанной продукции сывороточного IL-2 на фоне повышенного синтеза TNFα, IL-8, снижение продуктов антиоксидантной защиты: фермента суперок-

сиддисмутазы, глутатионана фоне повышенного общего антиоксидантного статуса (TAS). Нарушения факторов антиоксидантной защиты, их дисбаланс, выявленный по результатам TAS, свидетельствует об оксидативном стрессе на уровне макроорганизма, связанный с активностью факторов патогенности *S. pyogenes* при хронической стрептодермии. Применение комплексной

схемы обследования и лечения пациентов путем локального воздействия на воспалительный очаг лазером низкой интенсивности с длиной волны 405 ± 10 нм, мощностью излучения $80,0 \pm 5,0$ мВт, плотностью мощности 40 мВт/см² приводит к

нормализации клинической картины, снижению активности оценки пациентами состояния по визуально-аналоговой шкале, восстановлению баланса цитокинов, факторов антиоксидантной защиты и общего антиоксидантного статуса.

Список литературы / References

1. Bashkatov A.N., Genina É.A., Kochubey V.I., Tuchin V.V. Optical properties of the subcutaneous adipose tissue in the spectral range 400-2500 nm. *Opt. Spectrosc.*, 2005, Vol. 99, pp. 836-842.
2. Chriba M., Skellett A.M., Levell N.J. Beclometasone inhaler used to treat pyoderma gangrenosum. *Clin. Exp. Dermatol.*, 2010, Vol. 35, no. 3, pp. 337-338.
3. Cusumano Z.T. Citrulline protects *Streptococcus pyogenes* from acid stress using the arginine deiminase pathway and the F1Fo-ATPase. *J. Bacteriol.*, 2015, Vol. 197, no. 7, pp. 1288-1296.
4. Gizinger O.A., Moskvina S.V., Shemetova M.A. The effect of continuous low-intensity laser irradiation of the red spectrum on the changes in the functional activity and speed of NADPH-oxidase response of human peripheral blood neutrophils. *Problems of Resortology, Physiotherapy and Therapeutic Physical Education*, 2016, Vol. 93, no. 5, pp. 28-33. (In Russ.)
5. Wagner D.L., Amini L., Wendering D.J., Burkhardt L.-M., Akyüz L., Reinke P., Volk H.-D., Schmueck-Henneresse M. High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population. *Nat. Med.*, 2019, Vol. 25, no. 2, pp. 242-248.

Авторы:

Гизингер О.А. — д.б.н., профессор кафедры микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Лакницкая А.О. — врач-дерматовенеролог ГБУЗ «Челябинский областной кожно-венерологический диспансер», г. Челябинск, Россия

Зиганшин О.Р. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой дерматовенерологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Gizinger O.A., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Microbiology and Virology, Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

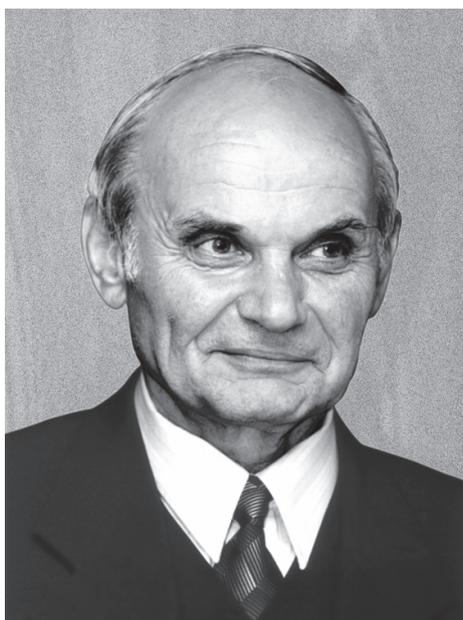
Laknitskaya A.O., Clinical Dermatovenereologist, Regional Dermatovenereologic Dispensary, Chelyabinsk, Russian Federation

Ziganshin O.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Dermatovenereology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 11.05.2021
Принята к печати 16.06.2021

Received 11.05.2021
Accepted 16.06.2021

ПАМЯТИ АНАТОЛИЯ НИКОЛАЕВИЧА ЧЕРЕДЕЕВА К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ



Об этом обычно говорят в конце воспоминания, но здесь хочется сказать в начале: ну конечно же рано он ушел, очень рано, чрезвычайно рано. Ну вот, только-только отметили 60-летие, а он взял и ушел, не попрощавшись. Взял лопату, пошел копать огород и отправился туда, где царствует Вечность. И вот прошло уже, а может быть еще только, 20 лет, а он там, в Вечности, а мы здесь без него уже так много лет.

Наверное, не будет оригинально, если сказать, что он всю жизнь шагал по оригинальности, как по прямой. Говорят: «у каждого есть свои тараканы». Да, имеются. Но далеко не каждый со своими тараканами поступил сначала в один институт с физико-математическим уклоном. Потом, понял, что это не его, бросил и поступил в медицинский институт. В этом уже проявилась его оригинальность в согласии с его тараканами.

Его путь в науке был стандартным, аспирантура, м.н.с., с.н.с. и... А вот здесь уже не очень стандартно. Будучи к.м.н. он становится руководителем отдела иммунологии 2го Московского медицинского института (ныне Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова) и делает из отдела клинико-иммуно-организующий центр для всей страны, который многое определял – те направления в клинической иммунологии, которые развивались в те годы, с 1977 по 2002 гг. В эти годы А.Н. Череев защищает докторскую диссертацию, становится профессором. И здесь еще следует учесть, что отдел иммунологии развивался в теснейших дружеских отношениях с кафедрой иммунологии того же ВУЗа, которой руководил профессор Леонид Васильевич Ковальчук, который был другом, соратником, единомышленником в отношении клинической иммунологии. Вот этот тандем друзей иммунологов, образовав превосходный научно-образовательный комплекс двигали вперед клиническую иммунологию в нашей стране. При этом оба обладали бездной мужского обаяния и именно мужской доброты.

Вот как-то в жизни у нас сегодня что-то не так. Вот жил человек, 60 лет прожил. Мало, даже очень мало. И что? Да таких миллионы, или миллиарды, много очень, в общем-то. Но ведь этот человек написал кандидатскую диссертацию, написал докторскую диссертацию и обе про иммунологию. И таких человек достаточное количество. Хотя нет, по иммунологии, по крайней мере в нашей стране

количество это не очень достаточное. К науке иммунологии в ней (в Стране нашей) отношение, мягко будет сказано, достаточно робкое, какое-то. Так вот, этот человек, Анатолий Николаевич Чередеев, явился организатором Российского научного общества иммунологов (РНОИ), создателем Российского иммунологического журнала (которому в этом году исполняется 25 лет. А ведь это было не просто. И не просто «просто», а очень не просто. Надо было ходить, доказывать, обивать пороги Минздрава РСФСР. И он ходил, доказывал, обивал пороги и добился. Общество было организовано. А ведь тогда еще «блистало» общество иммунологов Советского союза. Ему говорилось: «Зачем? Ведь мы же все иммунологические братья и сестры». Братья братьями, но Россия есть Россия. Кстати, союзного общества не стало, а российское то осталось. Это ли не предвидение? Он совершенно заслуженно стал и первым президентом РНОИ и первым главным редактором Российского иммунологического журнала, который он тащил, что называется, на «своем горбу». Следует напомнить и подчеркнуть: организовал Российское общество иммунологов, организовал Российский иммунологический журнал. Он был до мозга костей Россиянином. Разве этого мало для одного человека? Да нет же, не мало, много! И Честь и Хвала этому Человеку, этому Иммунологу, этому первому Президенту РНОИ!!!

И вечная память ему, Анатолию Николаевичу Чередееву, человеку с большой буквы, иммунологу с неповторимым своим пониманием роли в обществе науки иммунология, 1-му Президенту Российского научного общества иммунологов с его огромным желанием, чтобы основы этой науки стали достоянием каждого врача, врача любой специальности, твердо веря, что без иммунологии современная медицина не может ни существовать, ни успешно развиваться.

Можно быть твердо уверенным, что если бы он не ушел так рано, то все больше и больше становилось врачей с пониманием роли науки иммунологии во врачебной специальности каждого из них. Как жалко, что случилось так, как случилось... И все же, потихонечку, полегонечку, шаг за шагом клиническая иммунология, у истоков которой в нашей стране стоял профессор А.Н. Чередеев, все больше захватывает клинический плацдарм в современной медицине.

Академик В.А. Козлов

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 β 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 β 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. Также 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

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агеева А.А.	181	Зенина А.А.	237	Малашенко В.В.	153	Таренкова И.В.	331
Аклев В.А.	275	Зиганшина М.М.	269	Мальшева Л.Ю.	323	Тройнич Я.Н.	175
Аклев А.В.	275	Зиганшин О.Р.	337	Маркелова Е.В.	237	Тюменцева Н.В.	195
Акунеева Т.В.	229	Зиновьев С.В.	189	Михайлова И.В.	215	Тяпаева Я.В.	221
Арташян О.С.	195	Зурочка А.В.	221	Морозова Н.В.	257	Унгер И.Г.	229
Бакеева А.Е.	209	Зырянова К.С.	305	Никифоров И.А.	291	Федянина Л.Н.	237
Бекпергенова А.В.	291	Иванова Е.В.	331	Никушкина К.В.	181	Филиппова Ю.В.	215
Белошангин А.С.	305	Иванов П.А.	153	Норкин И.К.	153	Филиппова Ю.Ю.	248
Бердюгина О.В.	243	Ищенко Н.В.	283	Оралова Д.А.	161	Хазиахматова О.Г.	153
Бережная Е.С.	322	Кайгородцева Н.В.	209	Осиков М.В.	181, 209	Хайдуков С.В.	269
Блинова Е.А.	275	Карташова О.Л.	257	Палицына О.В.	283	Хисамова А.А.	305
Бондаренко Т.А.	291, 331	Кныш С.В.	237	Пашнина О.А.	257	Хлусов И.А.	153
Бурмистрова А.Л.	251	Кодинцева Е.А.	275	Пашкова Т.М.	257	Хлыстова К.А.	317
Власова В.В.	311	Коркмазов А.М.	305	Перунова Н.Б.	291	Храмцова Ю.С.	195
Воронкова И.П.	331	Коркмазов М.Ю.	297	Пиотрович А.В.	323	Чайникова И.Н.	215
Гаврилова Т.В.	161	Корнова Н.В.	305	Плехова Н.Г.	189	Чарушина Ю.А.	175
Гейн О.Н.	161	Королевская Л.Б.	311	Просекова Е.В.	189	Челпаченко О.Е.	291
Гейн С.В.	203	Костоломова Е.Г.	229	Пушкарева Л.А.	215	Черешнева М.В.	161
Гизингер О.А.	261, 305, 337	Костюшко А.В.	237	Радьков И.В.	189	Чумаков Н.С.	317
Гриценко В.А.	221	Кузьмичева Н.А.	215	Сайдакова Е.В.	311	Шаравьева И.Л.	203
Давыдова Е.В.	209	Лагерева Ю.Г.	283	Саркисян Н.Г.	317	Шмагель К.В.	311
Добрынина М.А.	221	Лакницкая А.О.	337	Симоныч Е.В.	181	Шуныкин Е.О.	153
Дроздова Л.И.	317	Латюшина Л.С.	323	Смолягин А.И.	215	Шуплецова В.В.	153
Дубинец И.Д.	297	Ленгина М.А.	297	Солодовник А.В.	297	Юрова К.А.	153
Забокрицкий Н.А.	167	Литвинова Л.С.	153	Сорокин Ю.А.	261	Юффа Е.П.	317
Заморина С.А.	175	Логинова Н.П.	175	Суховой Ю.Г.	229	Юшков Б.Г.	195

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

АКШ	238	куркумин	306	средний отит	298
аллогенный трансплантат	176	лазерное излучение низкой		стафилококки	258
антенатальный период онтогенеза	275	интенсивности	338	стратегия гейтирования	270
антимикробные пептиды	318	лактоферрин	292	стрептодермия	338
антимикробные факторы	292	лизоцим	292	стресс	162, 203
антиоксиданты	262	лимфоциты	181	субпопуляции Т-лимфоцитов	312
антиретровирусная терапия	312	макрофаги	162, 189	супероксиддисмутаза	338
антителообразование	162	марганец	331	Т-лимфоциты	209, 244
антицитокиновая активность	258	медь	331	термическая травма	181
апоптоз	203	мезенхимальные стромальные/		тестостерон	196
бактерицидная активность	222	стволовые клетки	154	туберкулема	244
беременность	270	мелатонин	181	тучные клетки	196
беременные крысы	215	метаболизм	166	урогенитальные инфекции	258
беталайкин	324	метионин	306	ушиб головного мозга	189
брыжеечные лимфатические узлы	176	Метрогил Дента	318	фагоцитоз	162
взрослые	283	миелопептиды	162	феномен ускоренного старения	250
ВИЧ-инфекция	312	налоксон	203	физиотерапия	298
возраст	283	нейровоспаление	189, 238	хронический бактериальный	
воспаление	230	нейрогормоны	250	простатит	292
гемопоэтические стволовые клетки	154	нестимулированные образцы	283	хронический гнойный аденоидит	298
гепатоциты	168	низкочастотная ультразвуковая		хронический пародонтит	318
гиалуроновая кислота	230	кавитация	298	хроническое облучение	275
гликоделин	176	НСТ-тест	306	циклоферон	324
глициерогидрогель кремния	318	опиоидная система	203	цинк	331
глюкоза	312	остеобласты	154	цитокиноподобные вещества	258
деление	312	очаги минерализации	154	цитокины	162, 209, 250, 262, 275, 283, 324, 331, 338
дермальная пленка	181	паренхиматозные макрофаги	189	цитопротектор	168
дети	283	пассивное курение	215	экспериментальный язвенный колит	209
дифференциальная диагностика	250	перелом челюсти	324	эпилепсусные макрофаги	189
железо	331	периферическая кровь	283	<i>Acinetobacter baumannii</i>	222
заболевания пародонта	230	периферические моноклеточные		В-регуляторные клетки	270
иммунная система	203	лимфоциты	331	В10-клетки	270
иммуноглобулин G	181	повреждение	196	BDNF	238
иммуноглобулин А	292	Полиоксидоний	318	<i>Candida</i>	262
иммуноглобулин М	181	постнатальный период онтогенеза	275	CD3 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺	244
иммуноглобулины	298	пробиотические микроорганизмы	168	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	244
иммунологические показатели	215	проточная цитометрия	270	CD4 ⁺ Т-клетки	312
иммунология	318	расстройства аутистического спектра	250	<i>Escherichia coli</i>	222
иммунопривилегированный орган	196	расстройства шизофренического		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	222
имплантация	324	спектра	250	<i>M. tuberculosis</i>	244
кавитация	262	регенерация	196, 230	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	222
кишечная микробиота	306	риносинусит	298	S100b	238
клетки Лейдига	196	селенка	176	Т-лимфоциты	203
клеточные культуры	168, 230	семенник	196	γδТ-клетки	244
когнитивная дисфункция	238	синтетический пептид ГМ-КСФ–ZP2	222		
корреляция	292	синусит	324		
костная ткань	154	соединительная ткань	196		
костное ремоделирование	154	сосуды	196		
красный костный мозг	176	спермограмма	292		

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ИММУНОПРИВИЛЕГИРОВАННОГО ОРГАНА (СЕМЕННИКА) НА ПОВРЕЖДЕНИЕ» (АВТОРЫ: ХРАМЦОВА Ю.С., ТЮМЕНЦЕВА Н.В., АРТАШЯН О.С., ЮШКОВ Б.Г. [с. 195-202])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "REACTION TO DAMAGE OF CONNECTIVE TISSUE IN IMMUNOPRIVILEGED ORGAN (TESTIS)" (AUTHORS: KHRAMTSOVA YU.S., TYUMENTSEVA N.V., ARTASHYAN O.S., YUSHKOV B.G. [pp. 195-202])

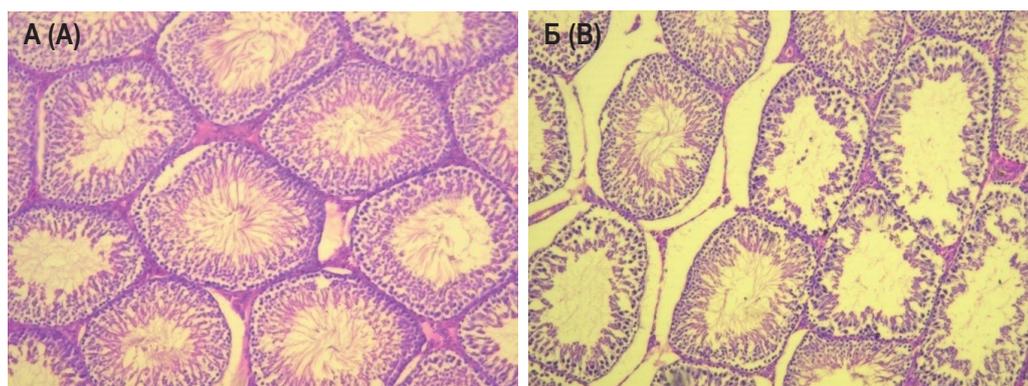


Рисунок 1. Гистологическая структура семенников после тупой травмы, 30-е сутки
 Примечание. А – интактный семенник. Б – поврежденный семенник. Окраска гематоксилином и эозином, ×100.
 Figure 1. Histological structure of testis after damage, 30 days
 Note. A, intact testis. B, damaged testis. Staining with hematoxylin and eosin, ×100.

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ИНДУЦИРОВАНИЕ РЕГЕНЕРАТОРНО-ОСТЕОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК PDLSC IN VITRO» (АВТОРЫ: СУХОВЕЙ Ю.Г., КОСТОЛОМОВА Е.Г., УНГЕР И.Г., АКУНЕЕВА Т.В. [с. 229-236])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "IN VITRO INDUCTION OF REGENERATIVE AND OSTEOGENIC ACTIVITY OF PDLSC CELLS " (AUTHORS: SUKHOVEY YU.G., C, KOSTOLOMOVA E.G., UNGER I.G., AKUNEEVA T.V. [pp. 229-236])

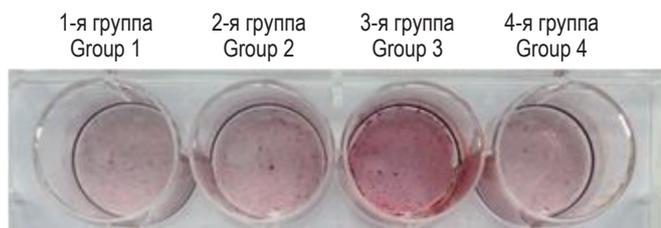


Рисунок 5. Анализ препаратов гиалуроновой кислоты на оказание эффекта стимуляции спонтанной остеогенной дифференцировки
 Figure 5. Assessment of hyaluronic acid products stimulating spontaneous osteogenic differentiation

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОФИЛЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ УДАЛЕНИИ ТУБЕРКУЛЕМЫ ЛЕГКИХ» (АВТОР: БЕРДЮГИНА О.В. [с. 243-248])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "TRANSFORMATION OF THE T LYMPHOCYTE PROFILE IN PERIPHERAL BLOOD UPON RESECTION OF TUBERCULOUS LUNG GRANULOMA " (AUTHOR: BERDYUGINA O.V. [pp. 243-248])

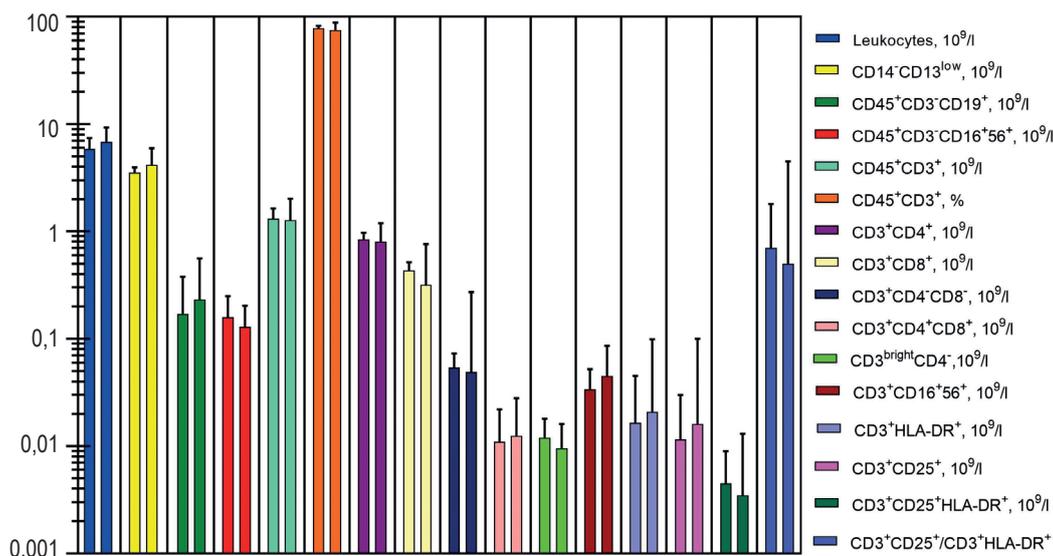


Рисунок 1. Графическое представление результатов исследования популяций клеток до (левый столбец) и после (правый столбец) резекции туберкулемы легких, шкала логарифмическая

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Графическое изображение данных по популяциям слева направо соответствует расположению пояснений сверху вниз.

Figure 1. Graphical representation of the results of the study of cell populations before (left column) and after (right column) resection of tuberculosis granuloma, logarithmic scale

Note. The data is presented as a median (Me) and an interquartile span (Q_{0,25}-Q_{0,75}). The graphical representation of the population data from left to right corresponds to the position of the explanations from top to bottom.

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
ПРЕССА РОССИИ – 15590**

ISSN 1028-7221



9 771234 567898