

2022

Официальный журнал
Российского Научного Общества Иммунологов

**РОССИЙСКИЙ
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ**



**RUSSIAN JOURNAL
OF IMMUNOLOGY**

Official Journal
of Russian Society of Immunology

Volume 25
Number 2

2022

РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИММУНОЛОГОВ
(РНОИ)

РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

апрель-июнь

2022, том 25

№. 2

Основан в 1996 году

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Села Михаил – профессор, Институт наук Вейцмана, Реховот, Израиль

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

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

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

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

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

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

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

Ответственные секретари:

Ризопулу А.П., д.б.н. (Москва)

Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)

E-mail: rusimmun@gmail.com

Редактор перевода:

Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)

Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

Редакция журнала «Российский иммунологический журнал»

197101, Санкт-Петербург, а/я 130

Электронная версия: www.rusimmun.ru

© Российский иммунологический журнал

Журнал зарегистрирован Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций (свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №77-11525 от 04.01.2002 г.)

Ответственные секретари:

Ризопулу А.П., д.б.н. (Москва)

Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)

E-mail: rusimmun@gmail.com

Редактор перевода:

Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)

Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

Редакция журнала «Российский иммунологический журнал»

197101, Санкт-Петербург, а/я 130

Электронная версия: www.rusimmun.ru

© Российский иммунологический журнал

Журнал зарегистрирован Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций (свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №77-11525 от 04.01.2002 г.)

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

Шварц Герберт – Школа медицины Йонг Лу Лин Национального университета Сингапура

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Сисякина Людмила Петровна – доктор медицинских наук, профессор, директор НИИ клинической иммунологии Ростовского государственного медицинского университета Минздрава России, и профессиональной переподготовки специалистов Ростовского государственного медицинского университета, Ростов-на-Дону, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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

Издательство «Человек»

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

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 17.08.2022 г. Формат 60 х 90 1/8. Печать офсетная.

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

Напечатано в Издательском центре «Титул».

454020, г. Челябинск, ул. Курчатова, 25А-65

Тел.: (351) 230-67-37.

RUSSIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY
(RSI)

RUSSIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY

ROSSIYSKIY IMMUNOLOGICHESKIY ZHURNAL

April-June

2022, volume 25

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. Freidin – 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 Grigorova – 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. Simbirtsev – 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

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

Editorial Council

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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)

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 17.08.2022. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 16. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Printed in Publishing Center «Title».

454020, Chelyabinsk, Kurchatov str., 25A-65

Ten.: (351) 230-67-37.

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

Бердюгина О.В., Гусев Е.Ю.

К ВОПРОСУ О ВЗАИМОСВЯЗИ АНОСМИИ/ДИСГЕВЗИИ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ COVID-19..... 117

Бондаренко Т.А., Иванова Е.В., Бекпергенова А.В., Чайникова И.Н., Челпаченко О.Е., Никифоров И.А., Здвижкова И.А.

СВЯЗЬ ЦИТОКИНОВ И ЧИСЛЕННОСТИ МИКРОСИМБИОНТОВ ПРИ МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА 125

Боргоякова М.Б., Карпенко Л.И., Старостина Е.В., Волосникова Е.А., Задорожный А.М., Орлова Л.А., Ильичев А.А.

КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ДНК-ВАКЦИНУ, КОДИРУЮЩУЮ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН БЕЛКА S ВИРУСА SARS-CoV-2, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА УПАКОВКИ..... 131

Вавилов М.Н., Суслова Т.А., Бурмистрова А.Л.

ЧАСТОТА И ПАРАМЕТРЫ НЕРАВНОВЕСНОГО СЦЕПЛЕНИЯ ДВУХЛОКУСНЫХ ГАПЛОТИПОВ HLA-B*01:01 У РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ..... 139

Гаврилова Е.Д., Демченко Е.Н., Гойман Е.В., Чумасова О.А., Вольский Н.Н., Сизиков А.Э., Козлов В.А.

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ И АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ 147

Гольдина И.А., Гольдин Б.Г., Маркова Е.В.

ЭНДОГЕННЫЙ РЕТРОВИРУС ЧЕЛОВЕКА HERV-E λ 4-1 В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ АФФЕКТИВНОГО РАССТРОЙСТВА 155

Добрынина М.А., Зурочка А.В., Комелькова М.В., Ло Ш.

ИССЛЕДОВАНИЕ НАРУШЕНИЯ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19..... 161

Желтова О.И., Шевела Е.Я., Меледина И.В., Черных Е.Р.

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЛИПОАСПИРАТА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ..... 167

Журавлева Ю.А., Зотова Н.В., Соломатина Л.В.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА И IL-6 КАК МАРКЕРОВ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ 173

Изюрова Н.В., Савочкина А.Ю., Узунова А.Н., Никушкина К.В.

ИНТЕРФЕРОНЫ III ТИПА ПРИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ДЕТЕЙ 181

Каримов И.Ф., Корнеев А.Г., Борисов С.Д., Носырева С.Ю., Ушакова А.А., Панькова А.А., Паньков А.С.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ НЕГО 187

Ковалев М.А., Давыдова Е.В.

ЭКСПРЕССИЯ РЕГУЛЯТОРОВ ХЕМОТАКСИСА В ТКАНЯХ ЭКССУДАТИВНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПРОСТРАНСТВА РЕЙНКЕ..... 195

Коркмазов М.Ю., Дубинец И.Д., Ленгина М.А., Коркмазов А.М., Корнова Н.В., Рябенко Ю.И.

ОТДЕЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ АЛЬТЕРАЦИИ ЛОР-ОРГАНОВ 201

Королевская Л.Б., Сайдакова Е.В., Шмагель К.В.

ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ МИТОХОНДРИЙ CD4⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИИ 207

Костоломова Е.Г., Тимохина Т.Х., Перунова Н.Б., Полянских Е.Д., Сахаров Р.А., Комарова А.В.

ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* 791 НА МОДЕЛИ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO* 213

Крицкий И.С., Зурочка В.А., Ху Д., Сарapulцев А.П.

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА СЕРОПОЗИТИВНЫХ ПАЦИЕНТОВ ПО АНТИТЕЛАМ ПРОТИВ SARS-CoV-2 В ТЕЧЕНИЕ ДВУХ С ПОЛОВИНОЙ ЛЕТ РАЗВИТИЯ ПАНДЕМИИ COVID-19..... 219

Кузьмичева Н.А., Михайлова И.В., Пушкарева Л.А., Филиппова Ю.В., Бондаренко А.И., Синеговец А.А., Смолягин А.И.

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА КК1 НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ У ПАССИВНО КУРИВШИХ БЕРЕМЕННЫХ КРЫС И ИХ ПОТОМСТВА 227

Правила для авторов 235

Авторский указатель 238

Предметный указатель 238

CONTENTS

Short communications

Berdyugina O.V., Gusev E.Yu.

ON THE RELATIONSHIP BETWEEN ANOSMIA/DYSGEUSIA AND NONSPECIFIC IMMUNOPROPHYLAXIS COVID-19 117

Bondarenko T.A., Ivanova E.V., Bekpergenova A.V., Chaynikova I.N., Chelpachenko O.E., Nikiforov I.A., Zdvizhkova I.A.

RELATIONSHIPS BETWEEN CYTOKINES AND THE AMOUNTS OF MICROSymbionTS IN MICROECOLOGICAL DISORDERS OF THE HUMAN INTESTINE..... 125

Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Starostina E.V., Volosnikova E.A., Zadorozhny A.M., Orlova L.A., Ilyichev A.A.

CELLULAR IMMUNE RESPONSE TO DNA VACCINE ENCODING RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF SARS-CoV-2 S PROTEIN: DEPENDENCE ON THE PACKING MODE..... 131

Vavilov M.N., Suslova T.A., Burmistrova A.L.

FREQUENCY AND PARAMETERS OF LINKAGE DISEQUILIBRIUM OF THE TWO-LOCUS *HLA-B~MICA* HAPLOTYPES IN RUSSIANS FROM CHELYABINSK REGION 139

Gavrilova E.D., Demchenko E.N., Goiman E.V., Chumasova O.A., Volsky N.N., Sizikov A.E., Kozlov V.A.

PLASMA EXTRACELLULAR DNA AND NEUTROPHILIC LEUKOCYTE ACTIVITY IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS 147

Goldina I.A., Goldin B.G., Markova E.V.

HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUS HERV-E λ 4-1 IN IMMUNOPATHOGENESIS OF AFFECTIVE DISORDER 155

Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Komelkova M.V., Luo S.

IMPAIRMENT OF NATURAL KILLER POPULATIONS IN THE PATIENTS RECOVERED FROM COVID-19..... 161

Zheltova O.I., Shevela E.Ya., Meledina I.V., Chernykh E.R.

FIRST EXPERIENCE IN USAGE OF LIPOASPIRATE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN COMBINED TREATMENT OF THE PATIENTS WITH LIVER CIRRHOSIS 167

Zhuravleva Yu.A., Zotova N.V., Solomatina L.V.

DIAGNOSTIC EFFICACY OF C-REACTIVE PROTEIN AND IL-6 AS MARKERS OF SYSTEMIC INFLAMMATION..... 173

Iziurova N.V., Savochkina A.Yu., Uzunova A.N., Nikushkina K.V.

TYPE III INTERFERONS IN COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN CHILDREN 181

Karimov I.F., Korneev A.G., Borisov S.D., Nosyreva S.Yu., Ushakova A.A., Pankova A.A., Pankov A.S.

HUMORAL IMMUNITY IN RECONVALESCENTS AND PERSONS VACCINATED AGAINST COVID-19: A COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE MAIN INDICES OF THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE 187

Kovalev M.A., Davydova E.V.

EXPRESSION OF CHEMOTAXIS IN REGULATORS OF TISSUES OF EXUDATIVE LESIONS OF REINKE'S SPACE..... 195

Korkmazov M.Yu., Dubinets I.D., Lengina M.A., Korkmazov A.M., Kornova N.V., Ryabenko Yu.I.

DISTINCT INDEXES OF IMMUNOLOGICAL REACTIVITY IN SURGICAL ALTERATION OF ORL ORGANS..... 201

Korolevskaya L.B., Saidakova E.V., Shmagel K.V.

FLOW CYTOMETRY ASSESSMENT OF MITOCHONDRIAL INDICES IN CD4⁺T CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD..... 207

Kostolomova E.G., Timokhina T.Kh., Perunova N.B., Polyanskikh E.D., Sakharov R.A., Komarova A.V.

IN VITRO EVALUATION OF IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* 791 IN THE CELL MODEL OF INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY..... 213

Kritsky I.S., Zurochka V.A., Hu D., Sarapultsev A.P.

DYNAMICS OF CHANGES IN THE NUMBER OF SARS-CoV-2 SEROPOSITIVE PATIENTS OVER TWO YEARS OF THE COVID-19 PANDEMIC..... 219

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

EFFECT OF THE KK1 PEPTIDE ON IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN PASSIVELY SMOKING PREGNANT RATS AND THEIR OFFSPRING..... 227

Instructions to Authors..... 235

Author index..... 238

Subject index..... 238

К ВОПРОСУ О ВЗАИМОСВЯЗИ АНОСМИИ/ДИСГЕВЗИИ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ COVID-19

Бердюгина О.В., Гусев Е.Ю.

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

Резюме. Вопросы неспецифической иммунопрофилактики случаев заражения новой коронавирусной инфекцией поднимались с момента объявления ВОЗ пандемии COVID-19. В ранее проведенных исследованиях имеются многочисленные упоминания о том, что новая коронавирусная инфекция сопровождается проявлениями anosmia и dysgeusia. Целью данного исследования стало ретроспективное изучение взаимосвязи неспецифической иммунопрофилактики новой коронавирусной инфекции со случаями anosmia/дисгевзии у больных, перенесших COVID-19 на территории Свердловской области в 2020 году.

Изучены клинико-лабораторные данные 84 сотрудников многопрофильного медицинского учреждения, оказывавшего неотложную педиатрическую помощь. Все участники однократно перенесли инфекцию, вызванную SARS-CoV-2. Этиологическая диагностика включала обязательное молекулярно-биологическое исследование биообразцов. Концентрация антител к вирусу определялась с использованием набора реагентов SARS-CoV-2-IgG (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия). Часть обследованных (41 человек; 48,8% от всех) заявили о проведении по личной инициативе (без консультации с врачом) неспецифической иммунопрофилактической терапии COVID-19 в период объявления пандемии коронавирусной инфекции. С этой целью применялись: колекальциферол, риамиловир, IFN α -2b человеческий рекомбинантный, умифеновира гидрохлорида моногидрат, аскорбиновая кислота, ацетат цинка. У 58 человек (69,0% от всех) течение инфекции осложнялось потерей вкусовой чувствительности и обоняния (группа № 1), у 26 человек (31,0%) изменений вкуса и обоняния не было выявлено (группа № 2). Статистическая обработка полученных данных произведена с использованием пакета STATISTICA v. 12.5.192.5 (StatSoft, Inc., США), изучены базовые статистики, выполнен кластерный анализ.

Применение кластерного анализа позволило установить, что между наблюдениями anosmia/дисгевзии и использованием иммунопрофилактических средств связь существует. В частности, применение IFN α -2b человеческого рекомбинантного является протективным в отношении снижения числа случаев развития осложнения инфекции, в частности anosmia/дисгевзии, вызванной новым коронавирусом. Использование данного препарата показало снижение числа осложнений в 8,5 раза ($p = 0,03$). Также у пациентов при превентивном интраназальном использовании интерферона отмечалось: снижение длительности госпитализации на 14,3% ($p = 0,01$), объема поражения тканей легких ($p = 0,03$), более высокие концентрации IgG к SARS-CoV-2 через 2 месяца после перенесенного заболевания ($p = 0,001$).

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 (343) 374-00-70.
E-mail: berolga73@rambler.ru

Address for correspondence:

Berdyugina Olga V.
Research 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: berolga73@rambler.ru

Образец цитирования:

О.В. Бердюгина, Е.Ю. Гусев «К вопросу о взаимосвязи anosmia/дисгевзии и неспецифической иммунопрофилактики COVID-19» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 117-124.
doi: 10.46235/1028-7221-1109-OTR
© Бердюгина О.В., Гусев Е.Ю., 2022

For citation:

O.V. Berdyugina, E.Yu. Gusev "On the relationship between anosmia/dysgeusia and nonspecific immunoprophylaxis COVID-19", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 117-124.
doi: 10.46235/1028-7221-1109-OTR
DOI: 10.46235/1028-7221-1109-OTR

Впервые получены данные о взаимосвязи использования иммунопрофилактических средств с проявлениями anosmia/дисгевзии при COVID-19. Показана протективная роль использования IFN α -2b человеческого рекомбинантного в отношении снижения числа случаев развития осложнения инфекции: anosmia/дисгевзии, степени повреждения легких, а также развития противовирусного гуморального иммунного ответа. Полученные данные могут быть использованы для обоснования клинических рекомендаций по профилактике новых вспышек коронавирусной инфекции. Ограничением полученных результатов может быть необходимость проведения дополнительных исследований на более широкой выборке респондентов.

Ключевые слова: anosmia, COVID-19, колекальциферол, риамиловир, умифеновира гидрохлорида моногидрат, аскорбиновая кислота, цинк, IFN α -2b человеческий рекомбинантный

ON THE RELATIONSHIP BETWEEN ANOSMIA/DYSGEUSIA AND NONSPECIFIC IMMUNOPROPHYLAXIS COVID-19

Berdyugina O.V., Gusev E.Yu.

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

Abstract. The issues of non-specific immunoprophylaxis in the patients with new coronavirus infection have been raised since the WHO announced the COVID-19 pandemic. According to numerous studies, the new coronavirus infection is accompanied by manifestations of anosmia and dysgeusia. The purpose of this study was to perform a retrospective study of the relationships between nonspecific immunoprophylaxis of COVID-19 and conditions of anosmia/dysgeusia in the persons who underwent this infection in Sverdlovsk region over 2020.

We have studied clinical and laboratory data of 84 employees at the general medical institution providing emergency pediatric care. All participants suffered a single infection caused by SARS-CoV-2. Etiological diagnostics included mandatory virological PCR testing of biological samples. The concentration of antibodies to the virus was determined using a set of reagents for SARS-CoV-2-IgG detection (JSC Vector-Best, Novosibirsk, Russia). A sufficient part of this group (n = 41; 48.8% of total sample) reported self-administration of non-specific immunoprophylactic therapy of COVID-19 (without consulting a doctor) since the beginning of coronavirus pandemics. To this purpose, cholecalciferol, riamilovir, human recombinant IFN α -2b, umifenovir hydrochloride monohydrate, ascorbic acid, zinc acetate were used. In 58 cases (69% of total), clinical course of infection was complicated by loss of taste and sense of smell (group No. 1), in 26 people (31.0%), no changes in taste and sense of smell were detected (group No. 2). Statistical evaluation of the data was performed using STATISTICA v.12.5.192.5 package (StatSoft, Inc., USA). Along with basic statistics, cluster analysis was performed.

The use of cluster analysis allowed us to establish that there is a connection between the incidence of anosmia/dysgeusia and usage of distinct immunoprophylactic agents. In particular, the use of human recombinant IFN α -2b is protective in terms of reducing the number complications in COVID-19, especially, anosmia/dysgeusia caused by the new coronavirus. The use of this drug was associated with 8.5-fold decrease in the number of complications by (p = 0.03). Moreover, invasive intranasal usage of interferon, was associated with decreased hospitalization terms by 14.3% (p = 0.01); lower volume of lung tissue damage (p = 0.03), higher concentrations of IgG to SARS-CoV-2 at 2 months after reconvalescence (p = 0.001).

For the first time, data were presented on the relationship between usage of immunoprophylactic agents and manifestations of anosmia/dysgeusia in COVID-19. The protective role of human recombinant IFN α -2b has been shown in terms of reduced incidence of the disease complications, e.g., anosmia/dysgeusia, degree of lung damage, as well as development of an antiviral humoral immune response. The data obtained could be used to substantiate clinical recommendations for prevention of new outbreaks of coronavirus infection. The limitation of the obtained results is small number of cases, thus requiring additional studies in a wider sample of respondents.

Keywords: anosmia, COVID-19, cholecalciferol, riamilovir, umifenovir, ascorbic acid, zinc, IFN α -2b human recombinant

Работа выполнена по теме из Плана НИР «ИИФ» УрО РАН, № гос. регистрации 122020900136-4, руководитель — академик РАН, д.м.н., профессор А.В. Черешнев.

Введение

Вопросы неспецифической иммунопрофилактики случаев заражения новой коронавирусной инфекцией поднимались с момента объявления Всемирной организацией здравоохранения в марте 2020 года пандемии COVID-19 [3, 6, 11, 13]. Наряду с использованием средств индивидуальной защиты и в отсутствие на момент начала распространения инфекции вакцин, можно было полагать, что применение препаратов, содержащих противовирусные белки, витамины, микроэлементы позволит снизить риск заражения или обеспечит более легкое течение инфекционного заболевания.

В ранее проведенных исследованиях имеются многочисленные упоминания о том, что новая коронавирусная инфекция сопровождается проявлениями anosмии и дисгевзии [15]. Иногда данные симптомы являются единственным клиническим признаком заболевания [16]. Есть свидетельства того, что anosмия при коронавирусной инфекции связана с воспалением [12], в эксперименте показано, что процесс локализуется в зоне обонятельного эпителия [7]. Зафиксированы клинические случаи, где чувствительность в течение значительного времени не восстанавливается [4]. Следствием вышеописанных фактов является необходимость поиска факторов, позволяющих снизить риск появления anosмии/дисгевзии в последующие вспышки активности инфекции [17]. К настоящему моменту сведений, отражающих взаимосвязь между использованием неспецифических иммунопрофилактических препаратов в целях предотвращения инфицирования SARS-CoV-2 и проявлениями anosмии/дисгевзии, в литературе не имеется. Более того, появление таких данных в ближайшем будущем будет затруднительным ввиду того, что значительная часть населения планеты уже перенесла новую коронавирусную инфекцию, вызванную одним из штаммов возбудителя заболевания, с другой стороны, существует значительный пул вакцинированного населения, т. е. тех, кто использовал средства специфической иммунопрофилактики.

Целью данного исследования стало ретроспективное изучение взаимосвязи неспецифической иммунопрофилактики новой коронавирусной инфекции со случаями anosмии/дисгевзии у больных, перенесших COVID-19 на территории Свердловской области в 2020 году.

Материалы и методы

В период с 07 октября по 29 декабря 2020 года изучены клинико-лабораторные данные 84 сотрудников многопрофильного медицинского учреждения, оказывавшего неотложную педиатрическую помощь жителям города Екатеринбурга. Все участники исследования работали в период пандемии новой коронавирусной инфекции, т. е. имели непосредственный контакт с первично необследованным контингентом пациентов. Индивидуальные средства защиты (медицинские маски), а также профилактическая обработка рук дезинфицирующими жидкостями использовались респондентами на работе и в бытовых условиях постоянно.

Представленная исследовательская работа не ущемляла права обследованных сотрудников лечебного учреждения, не подвергала опасности их жизнь и здоровье, осуществлялась с предварительного добровольного информированного согласия на использование полученных данных из медицинской документации и анкет, заполненных участниками исследования собственноручно. Исследования выполнены согласно положениям Приказа Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 года «Об утверждении Правил клинической практики в Российской Федерации», международных документов, основой которых является «Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации» и ее последующие редакции, и документов Организации Объединенных Наций, касающихся прав пациента. Выполненная работа одобрена локальным этическим комитетом медицинского учреждения, экспертное заключение о возможности открытого опубликования полученных данных перед отправкой публикации в открытую печать утверждено членами экспертной комиссии ФГБУН ИИФ УрО РАН.

Все обследованные участники на момент экспертизы однократно перенесли новую коронавирусную инфекцию, первые случаи которой были зарегистрированы 08.12.2019 в Китайской народной республике, город Ухань, возбудитель — вирус SARS-CoV-2. Этиологическая диагностика заболевания пациентов включала обязательное молекулярно-биологическое тестирование соскоба эпителия слизистой оболочки носоглотки и ротоглотки, согласно порядку выполнения молекулярно-биологических исследований, основанному на нормативных документах Министерства здравоохранения Российской Федерации (временные методические рекомендации). Выделение рибонуклеиновой кислоты (РНК) вируса SARS-CoV-2, проведение реакции обратной транскрипции, а также осуществление полимеразной цепной реакции в реальном времени

производили не позднее 7 суток с момента клинико-инструментальной диагностики новой коронавирусной инфекции для верификации диагноза. РНК возбудителя заболевания обнаружена во всех случаях инфицирования вирусом.

Выполнение данной работы также включало анкетирование сотрудников на бумажных носителях для получения сведений общего характера (медицинский статус, наличие средств индивидуальной защиты, использование иммунопрофилактических препаратов и другое), преморбидного состояния (наличия инфекционных, аутоиммунных, аллергических, сердечно-сосудистых и других заболеваний, зависимостей), характера течения новой коронавирусной инфекции (выявленные изменения, синдромы, использованные в лечении лекарственные препараты), постморбидные изменения (обострение хронических и появление новых заболеваний), всего более 70 вопросов, а также получение сведений об уровне антител к вирусу SARS-CoV-2 класса G. Концентрация антител к вирусу определялась с использованием набора реагентов SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-Бест (D-5505, PV № РЗН 2021/14458, АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Часть обследованных (41 человек; 48,8% от всех) заявили о проведении по личной инициативе (без консультации с врачом) неспецифической иммунопрофилактической терапии COVID-19 в период объявления пандемии коронавирусной инфекции. С этой целью применялись следующие средства. Использование колекальциферола осуществляли путем приема раствора, содержащего действующее вещество в дозе 625-1250 МЕ в сутки перорально. Риамилловир с профилактической целью принимали внутрь по 250 мг трижды в день. Иммунопрофилактика с использованием IFN α -2b человеческого рекомбинантного выполнялась путем закапывания в каждый носовой ход по 3000 МЕ действующего вещества дважды в день. Прием умифеновира гидрохлорида моногидрата с профилактической целью осуществлялся 2 раза в неделю по 100 мг перорально. Использование витамина С производили путем приема внутрь раствора, содержащего 250 мг аскорбиновой кислоты в 200 мл кипяченой охлажденной воды дважды в сутки. Ацетат цинка с профилактической целью применялся в дозировке 75-100 мг/сутки [8]. Иммунопрофилактические средства применялись длительностью не менее трех недель и использовались до момента диагностирования заболевания COVID-19. Изучены случаи только изолированного применения иммунопрофилактических препаратов без предварительной вакцинации.

У 58 человек среди общего количества обследованных (69,0% от всех) течение новой коронавирусной инфекции осложнялось потерей вкусовой чувствительности (дисгевзия) и обоняния (аносмия). Не было обнаружено ни одного случая изолированной аносмии или дисгевзии. Данные пациенты составили группу исследования № 1. У другой части людей, 26 человек (31,0% от всех), изменений вкуса и обоняния не было выявлено, они были объединены в группу изучения № 2.

В группе № 1 было 19 (32,8%) врачей, 27 (46,6%) человек со средним и 3 (5,2%) – с младшим медицинским образованием, а также 9 (15,5%) человек иного персонала лечебного учреждения; группу № 2 составили 6 (23,1%) врачей, 17 (65,4%) медицинских сестер и 3 (11,5%) сотрудника вспомогательного персонала больницы. В первой группе было 8 (13,8%) мужчин во второй – 4 (15,3%). Медиана и межквартильный размах возраста группы № 1 составили 42,5 (32,8-49,3) лет, группы № 2 – 50,0 (43,5-53,5) лет. Метаболический синдром выявлялся в равных количествах у пациентов обеих групп: 10,3% и 11,6% (6 и 3 человека) соответственно в группе № 1 и в группе № 2. Различий в частоте переносимых в годы, предшествующие пандемии, острых респираторных вирусных инфекций, а также наличия хронических и острых сердечно-сосудистых, эндокринных, инфекционных заболеваний, болезней желудочно-кишечного тракта не отмечалось.

Длительность лечения заболевания COVID-19 в обеих группах была сходной, ее медиана составляла 21 сутки с межквартильным размахом от 15 до 29 дней. Временной промежуток от момента окончания терапии заболевания до анкетирования больных в обеих группах был равным и составлял 60 суток.

Статистическая обработка полученных данных произведена с использованием операционной системы Windows 10 (Microsoft Corporation, США): статистический пакет STATISTICA v. 12.5.192.5 (StatSoft, Inc., США); табличный процессор Microsoft Excel пакета офисного приложения Microsoft Office на базе процессора Intel® Pentium® CPU G2010 2.80GHz [2]. Данные представлены в виде количества случаев, процента от общего количества человек в группе, медианы (Me) и межквартильного размаха ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Изученные показатели имели преимущественно категориальный вид данных. Проверку нормальности распределения производили с использованием теста Колмогорова–Смирнова ($p < 0,05$ свидетельствовал о аномальном распределении изученных данных). Различия между группами оценивали с использованием теста Chi-Square. Уровень значимости (P-value) вероятности отказа от принимаемой статистической гипотезы счи-

тали равным 0,05. В оценке полученных данных был также использован кластерный анализ [1].

Результаты и обсуждение

На старте статистической обработки все данные, собранные в результате исследования, были подвергнуты кластерному анализу с целью ранжирования их на группы. Это позволяло выделить когорту связанных между собой критериев для последующего изучения. Центральный фрагмент полученного результата кластерного анализа представлен на рисунке 1.

Установлено, что в центре иерархического дерева среди более чем 100 изученных клинико-лабораторных и инструментальных данных оказались сведения о взаимосвязи случаев anosмии/дисгевзии при инфицировании вирусом SARS-CoV-2 и применения сотрудниками лечебного учреждения, участвовавшими в исследовании, средств для неспецифической иммунопрофилактики. В связи с тем, что обе категории данных оказались расположенными ближе всех к центру кластера, они стали существенными признаками, определившими ранжирование остальных изученных показателей в единую когорту.

Последующему анализу выявленной взаимосвязи между anosмией/дисгевзией и неспецифической иммунопрофилактикой была посвящена данная работа.

На втором этапе исследования была произведена оценка значимости различий между фактическим и теоретическим распределением всех изученных клинико-лабораторных и инструментальных показателей. Применен критерий согласия Пирсона – χ^2 (хи-квадрат). Предварительно убедились в возможности его использования с помощью теста Колмогорова–Смирнова.

Установлено, что в целом количество человек, осуществлявших неспецифическую иммунопрофилактику в группе с anosмией и дисгевзией при COVID-19 было 44,8% и значимо не отличалось от числа таких людей в группе без потери обоняния и вкуса – 57,7% (Колмогоров–Смирнов $d = 0,30$, $p < 0,01$; Chi-Square = 0,40, $p = 0,53$).

Интересными были данные по различию встречаемости случаев anosмии/дисгевзии у больных при использовании конкретных средств для неспецифической иммунопрофилактики COVID-19 в сравнении с теми реципиентами, кто не использовал их. В частности, не было обнаружено значимых различий между двумя группами при использовании: колекальциферола (Vitamin D3) – 42,3% случаев и 13,3% случаев для групп № 1 и № 2 соответственно (Chi-Square = 2,06, $p = 0,15$); риамиловира – 34,6% случаев и 53,3% случаев для групп № 1 и № 2 соответственно (Chi-Square = 0,55, $p = 0,46$); умифеновира

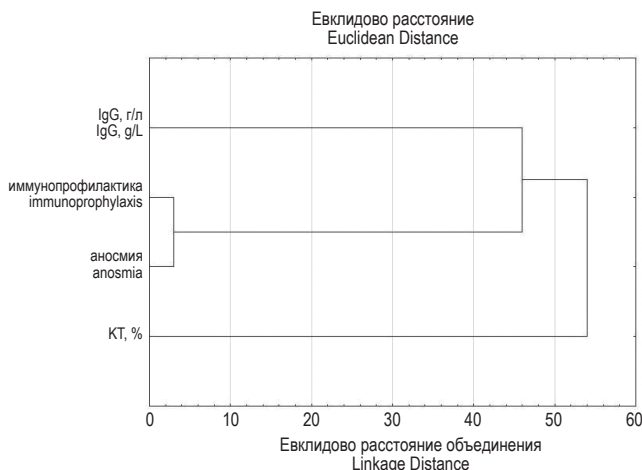


Рисунок 1. Фрагмент результата кластерного анализа клинико-лабораторных и инструментальных данных, полученных у обследованных, перенесших COVID-19

Примечание. Аносмия – случаи anosмии/дисгевзии; иммунопрофилактика – использование неспецифических иммунопрофилактических средств; IgG, г/л – антитела к SARS-CoV-2 класса G; КТ, % – процент поражения тканей легких, установленный методом компьютерной томографии; Евклидово расстояние объединения.

Figure 1. Fragment of the result of cluster analysis of clinical, laboratory and instrumental data obtained from the examined patients who underwent COVID-19

Note. Anosmia, cases of anosmia / dysgeusia; immunoprophylaxis, use of nonspecific immunoprophylactic agents; IgG, g/L, antibodies to SARS-CoV-2 class G; КТ, %, percentage of lung tissue damage determined by computed tomography; linkage distance, Euclidean linkage distance

гидрохлорида моногидрата – 11,5% случаев и 1% случаев для групп № 1 и № 2 соответственно (Chi-Square = 1,67, $p = 0,20$); аскорбиновой кислоты (витамин С) – 3,9% случаев и 1% случаев для групп № 1 и № 2 соответственно (Chi-Square = 0,57, $p = 0,45$); цинка – 3,9% случаев и 1% случаев для групп № 1 и № 2 соответственно (Chi-Square = 0,57, $p = 0,45$).

Вместе с тем выявлены достоверные различия в наблюдении фактов отсутствия anosмии/дисгевзии среди тех, кто использовал IFN α -2b человеческий рекомбинантный – 3,9% случаев в сравнении с 33,3% случаев для групп № 1 и № 2 соответственно (Chi-Square = 4,68, $p = 0,031$). У пациентов – перенесших COVID-19 в отсутствие anosмии/дисгевзии – на фоне превентивного использования интерферона помимо отмеченного феномена отмечались: достоверное снижение длительности госпитализации на 14,3%, что составляло примерно 2 суток (Chi-Square = 6,51, $p = 0,011$); достоверное снижение объема поражения тканей легких, выявленное методом компьютерной томографии на 26,0% – медианные значения и межквартильный размах 13,5 (5,0-

25,0) % и 10,0 (5,3-26,0) % для групп № 1 и № 2 соответственно ($\chi^2 = 4,54$, $p = 0,034$); значительно более высокие (в 3,5 раза) концентрации IgG к SARS-CoV-2 после перенесенного заболевания на момент обследования (60 суток) – медианные значения и межквартильный размах 5,4 (4,9-16,0) ВАУ/мл (binding antibody units, единицы связывающих антител) в сравнении с 18,8 (18,1-20,3) ВАУ/мл для групп № 1 и № 2 соответственно ($\chi^2 = 25,19$, $p = 0,001$).

Вышеописанные особенности согласовались с данными кластерного анализа (см. рис. 1), где в центре иерархического дерева оказались данные об объеме поражения тканей легких, установленные методом компьютерной томографии, и концентрации антител к SARS-CoV-2 класса G после перенесенной инфекции.

Никакие другие среди изученных показателей не имели значимых отличий у больных с наличием и отсутствием чувствительности при COVID-19 (группа № 1 и группа № 2). В частности, не было выявлено связи с тяжестью течения заболевания (легкое/среднетяжелое/тяжелое), восстановлением трудоспособности (полное/частичное/сохранилась утомляемость), фактами курения (табака / электронных сигарет), случаями пневмонии в процессе COVID-19, видом лечения (стационарное/амбулаторное), наличием клинических показаний для проведения компьютерной томографии, наличием аллергических реакций в анамнезе и многих других показателей.

В связи с тем, что в группах № 1 и № 2 были обнаружены различия во взаимосвязи профилактического использования IFN α -2b человеческого рекомбинантного с проявлениями anosмии/дисгевзии при заболевании новой коронавирусной инфекцией, дополнительно исследовали есть ли различие между разными клинико-лабораторными показателями среди тех, кто использовал IFN α -2b человеческий рекомбинантный в целях профилактики заражения новой коронавирусной инфекцией и всеми остальными респондентами, т. е. теми, кто ничего не использовал или использовал другие иммунопрофилактические средства.

Показано, что во всех случаях, когда был использован IFN α -2b человеческий рекомбинантный через 60 суток наблюдения все пациенты заявили о полном восстановлении состояния здоровья после перенесенного заболевания, среди тех, кто не использовал интерферон таких оказалось 80,4% (т. е. 4/5 всех случаев). Однако, как можно полагать, это лишь тенденция к различию сравниваемых параметров оценки состояния больного, поскольку достоверность различий для клинических показателей показана не была ($\chi^2 = 0,14$, $p = 0,71$).

Известно, что в ранее опубликованных работах неоднократно сообщалось о том, что COVID-19 сопровождается случаями как изолированной anosмии, так и сочетанной с дисгевзией. В частности, согласно данным ряда авторов, встречаемость нарушения восприятия вкуса и запаха при новой коронавирусной инфекции составляет 47-49% [5, 14]. В настоящем исследовании данные показали несколько более высокие значения распространения осложнения, в частности – 69,0% случаев, несмотря на то, что пациенты с подобным осложнением инфекционного заболевания не отбирались в исследование на основании данного критерия. По-видимому, такие различия можно связать с тем, что представленные в исследовании данные были получены в период первой волны коронавирусной инфекции, штамм возбудителя которой обладал более выраженным нейротропным действием [9].

В связи с тем, что о взаимосвязи между применением неспецифических иммунопрофилактических средств и потерей вкусовой и обонятельной чувствительности больных COVID-19 ранее в научных исследованиях не сообщалось, интересным стало проанализировать выявленные случаи с оценкой возможной этой взаимосвязи. В частности, применение кластерного анализа в изучении полученных данных позволило установить, что между наблюдениями anosмии/дисгевзии и использованием иммунопрофилактических средств связь существует. В частности, применение IFN α -2b человеческого рекомбинантного является протективным в отношении снижения числа случаев развития осложнения инфекции, в частности anosмии/дисгевзии, вызванной новым коронавирусом. Использование данного препарата показало снижение числа этого осложнения в 8,5 раза ($p = 0,03$). Также у пациентов при превентивном интраназальном использовании интерферона отмечалось: снижение длительности госпитализации на 14,3% ($p = 0,01$), объема поражения тканей легких ($p = 0,03$), более высокие концентрации IgG к SARS-CoV-2 через 2 месяца после перенесенного заболевания ($p = 0,001$). Подтверждением выявленной взаимосвязи стал кластерный анализ, в связи с тем, что перечисленные параметры образовали центр однородных элементов иерархического дерева и имели наименьшее расстояние до его ядра.

Некоторыми исследователями ранее упоминалось, что anosмия чаще была у курильщиков табака и пациентов с аллергическими заболеваниями, преимущественно дыхательной системы [10]. Согласно полученным нами данным, действительно anosмия встречалась в 10 раз чаще у курильщиков табака или электронных сигарет, а также вдвое чаще у тех, кто имел аллергические

заболевания, однако достоверных различий установлено не было, по-видимому ввиду ограниченности количества наблюдений.

Между тем, у полученных результатов есть два ограничения. Во-первых, небольшая выборка исследования, на которой получены представленные данные, и, во-вторых, отсутствие контроля при использовании иммунопрофилактических средств. Однако, в связи с тем, что сотрудники лечебного учреждения, в котором оказывалась медицинская помощь в период пандемии коронавируса, являются информированными, квалифицированными специалистами действовали в интересах сохранения собственного здоровья, а также ознакомлены с порядком приема препаратов (дозировки, длительность курса) данных групп фармацевтических средств, можно полагать, что данное ограничение может рассматриваться как условное. Более того, если даже на выборке такого объема были показаны результаты, обладающие статистической значимостью, то заключение выполненного исследования может считаться обоснованным.

Заключение

Впервые получены данные об отрицательной взаимосвязи использования неспецифических к

конкретному вирусу иммунопрофилактических средств с проявлениями anosмии / дисгевзии при COVID-19. Показана протективная роль использования IFN α -2b человеческого рекомбинантного в отношении снижения числа случаев развития легочных и нейрогенных осложнений инфекции. Полученные данные могут быть использованы для обоснования клинических рекомендаций по неспецифической профилактике новых вспышек коронавирусной инфекции. Ограничением полученных результатов может быть необходимость проведения дополнительных исследований на более широкой выборке респондентов и более детальное изучение конкретных иммуномодулирующих препаратов.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность министру здравоохранения Свердловской области к.м.н. А.А. Карлову, заведующей эпидемиологическим отделом ГАУЗ СО «ДГКБ № 9» г. Екатеринбурга Т.А. Катунцевой, директору ФГБУН «ИИФ» УрО РАН д.ф.-м.н., профессору О.Э. Соловьевой за помощь в организации данного исследования.

Список литературы / References

1. Леончик Е.Ю. Кластерный анализ: терминология, методы, задачи. Одесса, 2011. 68 с. [Leonchik E.Yu. Cluster analysis: terminology, methods, tasks]. Odessa, 2011. 68 p.
2. Макарова Н.В. Статистический анализ медико-биологических данных с использованием пакетов статистических программ Statistica, SPSS, NCSS, SYSTAT: методическое пособие. СПб.: Политехника-сервис, 2012. 178 с. [Makarova N.V. Statistical analysis of biomedical data using statistical software packages Statistica, SPSS, NCSS, SYSTAT: a manual. St. Petersburg: Politekhniko-service, 2012. 178 p.
3. Bakadia B.M., He F., Souho T., Lamboni L., Ullah M.W., Boni B.O., Ahmed A.A.Q., Mukole B.M., Yang G. Prevention and treatment of COVID-19: Focus on interferons, chloroquine/hydroxychloroquine, azithromycin, and vaccine. *Biomed. Pharmacother.*, 2021, Vol. 133, 111008. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111008.
4. Burges Watson D.L., Campbell M., Hopkins C., Smith B., Kelly C., Deary V. Altered smell and taste: Anosmia, parosmia and the impact of long Covid-19. *PLoS One*, 2021, Vol. 16, no. 9, e0256998. doi: 10.1371/journal.pone.0256998.
5. Butowt R., von Bartheld C.S. Anosmia in COVID-19: underlying mechanisms and assessment of an olfactory route to brain infection. *Neuroscientist*, 2021, Vol. 27, no. 6, pp. 582-603.
6. Cerullo G., Negro M., Parimbelli M., Pecoraro M., Perna S., Liguori G., Rondanelli M., Cena H., D'Antona G. The long history of vitamin C: from prevention of the common cold to potential aid in the treatment of COVID-19. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 574029. doi: 10.3389/fimmu.2020.574029.
7. de Melo G.D., Lazarini F., Levallois S., Hautefort C., Michel V., Larrous F., Verillaud B., Aparicio C., Wagner S., Gheusi G., Kergoat L., Kornobis E., Donati F., Cokelaer T., Hervochon R., Madec Y., Roze E., Salmon D., Bourhy H., Lecuit M., Lledo P.M. COVID-19-related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. *Sci. Transl. Med.*, 2021, Vol. 13, no. 596, eabf8396. doi: 10.1126/scitranslmed.abf8396.
8. EVMS Critid Care Covid-19 / Paul Marik // Management protocol 04-06-2020. Norfolk, Virginia 2020. 20 p.
9. Freni F., Meduri A., Gazia F., Nicastro V., Galletti C., Aragona P., Galletti C., Galletti B., Galletti F. Symptomatology in head and neck district in coronavirus disease (COVID-19): A possible neuroinvasive action of SARS-CoV-2. *Am. J. Otolaryngol.*, 2020, Vol. 41, no. 5, 102612. doi: 10.1016/j.amjoto.2020.102612.
10. Galluzzi F., Rossi V., Bosetti C., Garavello W. Risk factors for olfactory and gustatory dysfunctions in patients with SARS-CoV-2 Infection. *Neuroepidemiology*, 2021, Vol. 55, no. 2, pp. 154-161.

11. Grant W.B., Lahore H., McDonnell S.L., Baggerly C.A., French C.B., Aliano J.L., Bhattoa H.P. Evidence that vitamin D supplementation could reduce risk of influenza and COVID-19 infections and deaths. *Nutrients*, 2020, Vol. 12, no. 4, 988. doi: 10.3390/nu12040988.
12. Gusev E., Sarapultsev A., Hu D., Chereshnev V. Problems of pathogenesis and pathogenetic therapy of COVID-19 from the perspective of the general theory of pathological systems (general pathological processes). *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 14, 7582. doi: 10.3390/ijms22147582.
13. Iddir M., Brito A., Dinguo G., Fernandez Del Campo S.S., Samouda H., La Frano M.R., Bohn T. Strengthening the immune system and reducing inflammation and oxidative stress through diet and nutrition: Considerations during the COVID-19 crisis. *Nutrients*, 2020, Vol. 12, no. 6, 1562. doi: 10.3390/nu12061562.
14. Klopfenstein T., Kadiane-Oussou N.J., Toko L., Royer P.Y., Lepiller Q., Gendrin V., Zayet S. Features of anosmia in COVID-19. *Med. Mal. Infect.*, 2020, Vol. 50, no. 5, pp. 436-439.
15. Mehraeen E., Behnezhad F., Salehi M.A., Noori T., Harandi H., SeyedAlinaghi S. Olfactory and gustatory dysfunctions due to the coronavirus disease (COVID-19): a review of current evidence. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2021, Vol. 278, no. 2, pp. 307-312.
16. Meng X., Deng Y., Dai Z., Meng Z. COVID-19 and anosmia: A review based on up-to-date knowledge. *Am. J. Otolaryngol.*, 2020, Vol. 41, no. 5, 102581. doi: 10.1016/j.amjoto.2020.102581.
17. Mutiawati E., Fahrani M., Mamada S.S., Fajar J.K., Frediansyah A., Maliga H.A., Ilmawan M., Emran T.B., Ophinni Y., Ichsan I., Musadir N., Rabaan A.A., Dhama K., Syahrul S., Nainu F., Harapan H. Anosmia and dysgeusia in SARS-CoV-2 infection: incidence and effects on COVID-19 severity and mortality, and the possible pathobiology mechanisms – a systematic review and meta-analysis. *F1000Res.*, 2021, Vol. 10, 40. doi: 10.12688/f1000research.28393.1.

Авторы:

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

Гусев Е.Ю. – д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Berdyugina O.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Research Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Gusev E.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Inflammation Immunology, Research Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 13.05.2022
Принята к печати 28.05.2022

Received 13.05.2022
Accepted 28.05.2022

СВЯЗЬ ЦИТОКИНОВ И ЧИСЛЕННОСТИ МИКРОСИМБИОНТОВ ПРИ МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

Бондаренко Т.А., Иванова Е.В., Бекпергенова А.В., Чайникова И.Н.,
Челпаченко О.Е., Никифоров И.А., Здвижкова И.А.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук
ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Резюме. Цитокины и хемокины, кишечные микросимбионты, являясь необходимыми участниками межклеточных коммуникаций в норме, поддерживая гомеостаз слизистой оболочки кишечника, могут быть ключевыми факторами воспаления кишечника и повреждения эпителиального барьера. Данная работа расширяет представления о взаимосвязи микробных сообществ кишечника с локальной цитокиновой сетью хозяина. В работе представлены результаты анализа корреляционных связей таксономического состава кишечных микросимбионтов и уровня про- (TNF α , IFN γ , IL-8) и противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-1ra) в копрофильтратах клинически здоровых людей, обследуемых на дисбиоз. Определение цитокинов в копрофильтратах проводилось ИФА (АО «Вектор-Бест», Россия). Исследование 65 микросимбиотозов кишечника человека осуществлялось классическим бактериологическим методом. Идентификацию облигатно-анаэробных (*Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Cutibacterium acnes*, *Clostridium* spp.) и факультативно-анаэробных бактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiellae* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus faecium*) и *Candida* spp. проводили времяпролетной масс-спектрометрией MALDI TOF MS серии Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Проведенные исследования выявили значимую роль при дисбиозе кишечника ассоциаций энтеробактерий с дрожжевыми грибами и стафилококками. В структуре облигатно-анаэробного звена микробиоты наблюдалась смена консорциумов из нескольких видов бифидобактерий и лактобактерий при эубиозе на моновидовой вариант при дисбиозе. При этом увеличивалось количество ассоциаций, в состав которых входили клостридии. Анализ корреляционных связей показателей цитокинов и численности микробиоты кишечника показал сохранение в условиях дисбиоза установленных при эубиозе значимых связей с увеличением их коэффициента корреляции: *Bifidobacterium* spp., *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. с TNF α . Вместе с тем при дисбиозе менялась направленность связей и определялись новые корреляционные связи: для *Staphylococcus* spp. и IFN γ ; *Staphylococcus* spp. и IL-8; *Enterobacteriaceae* и IL-1ra, IFN γ . Установленные особенности корреляционных связей между показателями микросимбиотоза и количественными изменениями цитокинов позволяют рассматривать таксономический состав микросимбиотоза и профиль цитокинов как фактор, который может влиять на состояние гомеостаза кишечника при эу- и дисбиозе.

Ключевые слова: кишечные микросимбионты, цитокины, копрофильтраты, корреляционная связь, дисбиоз

Адрес для переписки:

Иванова Елена Валерьевна
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза
Уральского отделения Российской академии наук
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11.
Тел.: 8 (3532) 77-26-19.
E-mail: walerewna13@gmail.com

Address for correspondence:

Ivanova Elena V.
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal
Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences
460000, Russian Federation, Orenburg, Pionerskaya str., 11.
Phone: 7 (3532) 77-26-19.
E-mail: walerewna13@gmail.com

Образец цитирования:

Т.А. Бондаренко, Е.В. Иванова, А.В. Бекпергенова,
И.Н. Чайникова, О.Е. Челпаченко, И.А. Никифоров,
И.А. Здвижкова «Связь цитокинов и численности
микросимбионтов при микроэкологических нарушениях
кишечника человека» // Российский иммунологический
журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 125-130.
doi: 10.46235/1028-7221-1112-RBC

© Бондаренко Т.А. и соавт., 2022

For citation:

T.A. Bondarenko, E.V. Ivanova, A.V. Bekpergenova,
I.N. Chaynikova, O.E. Chelppachenko, I.A. Nikiforov,
I.A. Zdvizhkova "Relationships between cytokines and the
amounts of microorganisms in microecological disorders of the
human intestine", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 125-130.
doi: 10.46235/1028-7221-1112-RBC

DOI: 10.46235/1028-7221-1112-RBC

RELATIONSHIPS BETWEEN CYTOKINES AND THE AMOUNTS OF MICROSymbionTS IN MICROECOLOGICAL DISORDERS OF THE HUMAN INTESTINE

Bondarenko T.A., Ivanova E.V., Bekpergenova A.V., Chaynikova I.N., Chelpachenko O.E., Nikiforov I.A., Zdvizhkova I.A.

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Abstract. Cytokines and chemokines, as well as gut microsymbionts, are sufficient participants in the intercellular communications, thus supporting homeostasis of gut mucosa. However, these components may be of key significance for intestinal inflammation and damage to epithelial barrier. This work expands the understanding of the relationships between intestinal microbial communities and the local cytokine network of the host. The paper presents the results of the correlation analysis between total microbial number of intestinal microsymbionts and the level of pro- (TNF α , IFN γ , IL-8) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-1ra) in coprofiltrates obtained from clinically healthy people examined for gut dysbiosis. Determination of cytokines in coprofiltrates was carried out by ELISA technique (JSC Vector-Best, Russia). The study of 65 microsymbiocenoses of the human gut was carried out by classical bacteriological methods. Identification of obligate-anaerobic, facultative-anaerobic bacteria and fungi was carried out by time-of-flight mass spectrometry using MALDI TOF-MS Microflex LT series (Bruker Daltonics, Germany). These studies have revealed the leading role of associations between enterobacteria, fungi and representatives of the *Staphylococcus* genus in gut dysbiosis. In general composition of the obligate-anaerobic association, we have observed a change of consortia from several types of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* in eubiotic state to a monoid variant in dysbiosis. At the same time, the number of associations that included *Clostridia* was increased. The analysis of correlations between cytokine indices and the number of gut microbiota showed persistence of significant associations established during eubiosis under dysbiosis conditions, with an increase in their correlation coefficient: *Bifidobacterium* spp., *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. and TNF α . At the same time, in dysbiosis, the direction of the connections changed, and new correlations were determined: for *Staphylococcus* spp. and IFN γ ; *Staphylococcus* spp. and IL-8; *Enterobacteriaceae* and IL-1ra, IFN γ . The established features of correlations between indices of microsymbiocenosis and quantitative changes in cytokines allow us to consider the number, composition of microsymbiocenosis and cytokine profile as factors that may affect the state of gut homeostasis in eu- and dysbiosis.

Keywords: gut microsymbionts, cytokines, coprofiltrates, correlation, dysbiosis

Введение

Кишечник является самым большим барьером для внешней среды иместилищем значительного количества иммунных клеток и микробиоты по сравнению с любым другим биотопом в организме человека. Здоровый микробиом функционирует так же, как и любой другой орган человеческого организма, и представляет собой сложную экосистему, в которой сотни видов сосуществуют друг с другом и с клетками хозяина. Кишечный эпителий отвечает за широкий спектр важнейших функций, включая поддержание целостности барьера, предотвращение проникновения условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) и патогенов, а также модулирование иммунной системы кишечника [5]. Связь между эпителиальными клетками, микробиотой и им-

мунными клетками кишечника имеет решающее значение для поддержания гомеостаза и координации соответствующих реакций в ответ на действие различных факторов и может происходить посредством межклеточного контакта или путем высвобождения регуляторных молекул [3]. Цитокины и хемокины, кишечные микросимбионты, являясь необходимыми участниками межклеточных коммуникаций, поддерживают гомеостаз слизистой оболочки кишечника, но вместе с тем могут быть ключевыми факторами воспаления кишечника и повреждения эпителиального барьера [7, 10]. Особенности взаимодействия кишечных микроорганизмов и цитокиновой сети человека наряду с другими механизмами могут влиять на регуляцию системы «микросимбиоз-хозяин», о чем свидетельствуют исследования об участии цитокинов в совокупности с

микрoэкологическими нарушениями (дисбиоз) в патологии различного генеза (воспалительные заболевания кишечника, метаболические нарушения, аутоиммунные заболевания, онкология и др.) [9]. В ранее проведенных нами исследованиях было показано, что при III степени дисбиоза толстого кишечника человека, сопровождающейся значительными качественно/количественными нарушениями в микросимбиоценозе, в копрофильтрах определялись такие цитокины, как TNF α , IFN γ и IL-10 наряду с многократным ростом антимикробных пептидов (лизозим, лактоферрин) [1]. Вместе с тем представляет интерес определить насколько изменения в уровне про- и противовоспалительных цитокинов при выраженных нарушениях микросимбиоценоза кишечника связаны с формированием видовой структуры микросимбиоценозов.

Целью настоящей работы явилось исследование корреляционных связей локального уровня цитокинов в копрофильтрах и параметров микросимбиоценоза (видовой и количественный состав) при эубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека.

Материалы и методы

Исследование 65 микросимбиоценозов кишечника человека от клинически здоровых людей осуществлялось классическим бактериологическим методом. Идентификацию облигатно-анаэробных (ОАБ) и факультативно-анаэробных бактерий и грибов проводили с помощью времяпролетной масс-спектрометрии MALDI TOF MS серии Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Данное исследование проводилось на штаммах ОАБ (97 культур *Bifidobacterium* spp., 45 изолятов *Bacteroides* spp., 35 культур *Cutibacterium acnes*, 20 изолятов *Clostridium* spp.), факультативно-анаэробных бактерий (88 штаммов представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiellae* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*), 9 культур *Streptococcus* spp., 39 изолятов *Staphylococcus* spp., 15 штаммов *Enterococcus faecium*) и 42 культур *Candida* spp. Численность кишечных микросимбионтов выражали общим микробным числом (ОМЧ) и оценивали по количеству колоний на чашках, выражали в lg КОЕ/г. Копрофильтраты готовили с использованием ингибиторов протеаз: ингибитор соевых бобов, контрикал. Определение про- (TNF α , IFN γ , IL-8) и противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-1ra) в копрофильтрах проводилось методом ИФА с использованием реагентов «Вектор-Бест» (Россия). Результаты проведенных исследований обработаны методами вариационной статистики

с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и STATISTICA 10.0.

Результаты и обсуждение

Изменение структуры микросимбиоценоза в условиях дисбиоза происходило за счет снижения доли бифидобактерий, лактобактерий и энтерококков (в 2 раза и более, $p \leq 0,05$) и увеличения доли представителей семейства *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и дрожжевых грибов ($p \leq 0,05$), которая составляла $51,9 \pm 1,6\%$ среди общего количества изолированных штаммов. При эубиозе обнаружена тенденция к формированию консорциумов из 3-4 видов бифидобактерий (в $75,0 \pm 2,3\%$ случаев) и, напротив, у лиц с дисбиозом кишечника чаще встречался моновидовой вариант ($77,8 \pm 1,0\%$ случаев), ($p \leq 0,05$). Представители рода *Lactobacillus* встречались при эубиозе также в составе консорциумов из 2-3 видов (в $75,0 \pm 1,8\%$ случаев), тогда как при дисбиозе – преимущественно в моновидовом варианте (в $64,0 \pm 2,4\%$ случаев).

При дисбиозе в микросимбиоценозе толстого кишечника монокультуры УПМ встречались редко ($4,0 \pm 0,1\%$), в основном были характерны ассоциации ($96,0 \pm 2,3\%$ случаев) их двух ($23,0 \pm 1,5\%$), трех ($40,0 \pm 2,1\%$) и четырех ($23,0 \pm 1,1\%$) культур, а также установлены консорциумы из пяти представителей УПМ (в $14,0 \pm 0,5\%$). В бактериальных и бактериально-грибковых ассоциациях при дисбиозе преобладали культуры *E. coli* (в $97,0 \pm 3,0\%$ случаев), *C. albicans* (в $70,0 \pm 1,8\%$ случаев), коагулазо-отрицательных стафилококков (*S. epidermalis*, *S. equorum*, *S. saprophyticus*) (в $31,0 \pm 1,5\%$ случаев) и *K. pneumonia* (в $31,0 \pm 1,5\%$ случаев). Тем самым при дисбиозе в структуре микросимбиоценоза увеличивается количество 3- и 4-компонентных ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов и появляются 5-компонентные бактериально-грибковые ассоциации, не характерные для эубиоза. Таким образом, проведенные исследования показали значимую роль ассоциаций энтеробактерий с дрожжевыми грибами и стафилококками в развитии микрoэкологических нарушений толстого кишечника обследуемых лиц. При этом увеличивалось количество ассоциаций, в состав которых входили клостридии.

Исследование корреляционных связей содержания цитокинов в копрофильтрах и численности кишечных микросимбионтов у обследуемых лиц при эубиозе и дисбиозе показало наличие некоторых отличий в характере и силе взаимосвязей между данными показателями. В условиях эубиоза (рис. 1А) были установлены наиболее значимые положительные связи между количеством бифидобактерий, энтерококков, облигат-

но-анаэробных бактерий и уровнем IL-10, IL-1ra: *Bifidobacterium* spp. и IL-10 ($r = 0,80$, $p < 0,001$), *Bifidobacterium* spp. и IL-1ra ($r = 0,71$, $p < 0,001$), *Enterococcus* spp. и IL-10 ($r = 0,61$, $p < 0,001$), ОАБ и IL-10 ($r = 0,60$, $p < 0,001$), а также между уровнем бифидобактерий и IFN γ ($r = 0,69$, $p < 0,001$).

Выявлялись и отрицательные корреляционные связи между уровнем дрожжевых грибов и IL-10 ($r = -0,68$, $p < 0,001$) и IFN γ ($r = -0,61$, $p < 0,001$).

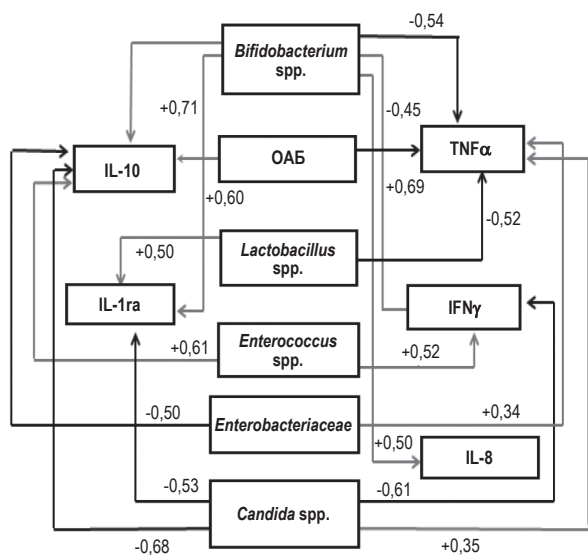
Между остальными показателями связи носили как положительный, так и отрицательный характер, но были менее значимы – *Lactobacillus* spp. и IL-1ra ($r = 0,50$, $p < 0,001$), *Enterococcus* spp. и IFN γ ($r = 0,52$, $p < 0,001$), *Bifidobacterium* spp. и IL-8 ($r = 0,50$, $p < 0,001$), *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. и TNF α ($r = -0,54$, $p < 0,001$; $r = -0,52$, $p < 0,001$, соответственно), *Candida* spp. и IL-1ra, TNF α ($r = -0,53$, $p < 0,001$; $r = 0,35$, $p < 0,05$), *Enterobacteriaceae* и IL-10 ($r = -0,50$, $p < 0,001$), TNF α ($r = 0,35$, $p < 0,05$).

В условиях дисбиоза толстого кишечника анализ корреляционных связей исследуемых показателей (рис. 1Б) показал сохранение установленных при эубиозе значимых связей с

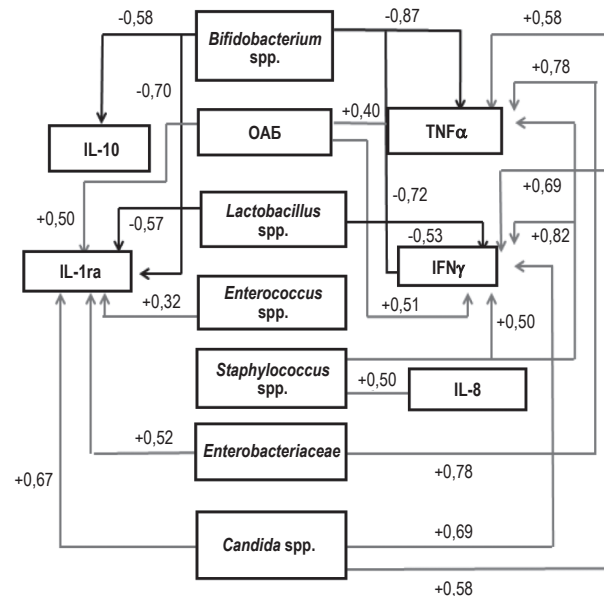
увеличением значений их коэффициента корреляции (*Bifidobacterium* spp. и TNF α ($r = -0,87$, $p < 0,001$), ОАБ и IFN γ ($r = 0,51$, $p < 0,001$ против $r = 0,25$, $p < 0,1$ при эубиозе), *Enterobacteriaceae* и TNF α ($r = 0,78$, $p < 0,001$), *Staphylococcus* и TNF α ($r = 0,50$, $p < 0,001$ против $r = 0,14$, $p < 0,1$ при эубиозе), *Candida* spp. и TNF α ($r = 0,58$, $p < 0,001$)).

Вместе с тем при дисбиозе изменялась направленность связей и определялись новые взаимосвязи. Например, изменялся характер связи у *Bifidobacterium* spp. и IFN γ ($r = -0,72$ при дисбиозе и $r = 0,69$ при эубиозе, $p < 0,001$), IL-10 ($r = -0,58$ при дисбиозе и $r = 0,80$ при эубиозе, $p < 0,001$), IL-1ra ($r = -0,70$ при дисбиозе и $r = 0,71$ при эубиозе, $p < 0,001$), а также у *Lactobacillus* spp. и IFN γ ($r = -0,53$ при дисбиозе и $r = 0,47$ при эубиозе, $p < 0,001$), IL-10 ($r = -0,49$ при дисбиозе и $r = 0,48$ при эубиозе, $p < 0,001$), IL-1ra ($r = -0,57$ при дисбиозе и $r = 0,50$ при эубиозе, $p < 0,001$), у *Candida* spp. и IFN γ ($r = 0,69$ при дисбиозе и $r = -0,61$ при эубиозе, $p < 0,001$), IL-1ra ($r = 0,67$ при дисбиозе и $r = -0,53$ при эубиозе, $p < 0,001$), у ОАБ и TNF α ($r = 0,40$ при дисбиозе и $r = -0,45$ при эубиозе, $p < 0,001$). Новые корреляционные связи отмечались для *Staphylococcus* и IFN γ ($r = 0,50$, $p < 0,001$),

А (А)



Б (Б)



→ Положительная корреляционная связь
Positive correlation

→ Отрицательная корреляционная связь
Negative correlation

Рисунок 1. Коэффициент (r) корреляционных связей показателей локального уровня цитокинов в копрофильтратах и численности микросимбионтов при эубиозе (А) и дисбиозе (Б) толстого кишечника человека

Figure 1. Coefficient (r) of correlations between indicators of the local level of cytokines in coprofiltrates and the number of microsymbionts in eubiosis (А) and dysbiosis (Б) of the human large gut

IL-8 ($r = 0,50$, $p < 0,001$), *Enterobacteriaceae* и $IFN\gamma$ ($r = 0,82$, $p < 0,001$), IL-1ra ($r = 0,52$, $p < 0,001$).

Полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о тесном взаимодействии между кишечной микробиотой и цитокинами, что является одним из определяющих факторов формирования кишечного гомеостаза при эубиозе и нарушении его при дисбиозе с развитием иммунологических сдвигов на слизистых. Источниками происхождения цитокинов, в том числе определяющихся и в копрофильтратах, могут быть резидентные врожденные или адаптивные иммунные клетки, воспалительные клетки, инфильтрирующие ткани кишечника, а также сами эпителиальные клетки кишечника [6, 7, 8, 10]. Способность цитокинов непосредственно стимулировать или ограничивать пролиферацию кишечного эпителия, апоптоз и проницаемость делает их ключевыми игроками в поддержании, а иногда и в нарушении кишечного эпителиального барьера [2]. Кроме того, высвобождение цитокинов и хемокинов кишечным эпителием в ответ на микробиоту, взаимодействие с другими типами клеток и пищевыми соединениями позволяет цитокинам регулировать микроокружение клеток в кишечнике. Например, генетическая делеция IL-10 вызывала спонтанный колит у мышей, что указывало на участие этого цитокина в регуляции гомеостаза толстого кишечника. Однако ряд других цитокинов, включая IL-6, TNF, IL-18, IL-1 β и IL-17, экспрессируясь при воспалении кишечника, способствуют повреждению слизистой кишечника [8]. Выявленные в настоящей работе значимые связи количества и вида микросимбионтов с уровнем $IFN\gamma$ подтверждают роль данного цитокина в регуляции проницаемости

кишечного эпителия, как при эубиозе, так и дисбиозе. Считается, что увеличение проницаемости кишечного эпителия, индуцированное $IFN\gamma$, представляет собой наглядный пример сложных взаимосвязей между цитокинами, эпителием и иммунными клетками [11]. Установленные связи параметров микробиоты с уровнем IL-10 подтверждают роль данных взаимодействий в кишечном гомеостазе, поскольку основными продуцентами IL-10 в кишечнике являются макрофаги и регуляторные Т-клетки, которые при участии антигенов кишечных микросимбионтов формируют цитокиновые сети, обеспечивающие локальную иммуносупрессию и иммунную толерантность к нормобиоте [4].

Заключение

Результаты сравнительного исследования корреляционных связей между показателями микросимбиотоза при эу-/дисбиозе толстого кишечника человека и количественными изменениями про-/противовоспалительных цитокинов в копрофильтратах позволили сделать следующие выводы:

1. При дисбиозе толстого кишечника изменялась направленность взаимосвязей и определялись новые значимые корреляционные связи между параметрами микросимбиотоза кишечника человека (увеличение количества и ассоциаций УПМ) и уровнем про-/противовоспалительных цитокинов в копрофильтратах.

2. Численность, состав микросимбиотоза и локальный профиль цитокинов можно рассматривать как фактор, определяющий состояние гомеостаза кишечника человека при эу- и дисбиозе.

Список литературы / References

1. Иванова Е.И., Бондаренко Т.А., Чайникова И.Н., Перунова Н.Б. Локальные антимикробные факторы и цитокины при дисбиозе кишечника человека // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 2 (1). С. 691-692. [Ivanova E.I., Bondarenko T.A., Chaynikova I.N., Perunova N.B. Local antimicrobial factors and cytokines in human intestinal dysbiosis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 2 (1), pp. 691-692. (In Russ.)]
2. Andrews C., McLean M.H., Durum S.K. Cytokine tuning of intestinal epithelial function. *Front Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1270. doi: 10.3389/fimmu.2018.01270.
3. Ciesielska A., Matyjek M., Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2021, Vol. 78, no. 4, pp. 1233-1261.
4. Hirayama D., Iida T., Nakase H. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 1, 92. doi: 10.3390/ijms19010092.
5. Hou K., Wu Z.X., Chen X.Y., Wang J.Q., Zhang D., Xiao C., Zhu D., Koya J.B., Wei L., Li J., Chen Z.S. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2022, Vol. 7, no. 1, 135. doi: 10.1038/s41392-022-00974-4.
6. Jeffery V., Goldson A.J., Dainty J.R., Chieppa M., Sobolewski A. IL-6 signaling regulates small intestinal crypt homeostasis. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 199, pp. 304-311.
7. Jones S.A., Bryant C., Lloyd C.M., McInnes I., O'Neill L. A vision for cytokine biology with 20/20 clarity. *Function (Oxf.)*, 2020, Vol. 2, no. 1, zqaa042. doi: 10.1093/function/zqaa042.

8. Neurath M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 14, no. 5, pp. 329-342.
9. Pascale A., Marchesi N., Marelli C., Coppola A., Luzi L., Govoni S., Giustina A., Gazzaruso C. Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine*, 2018, Vol. 61, pp. 357-371.
10. Peterson L.W., Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 14, no. 3, pp. 141-153.
11. Sumagin R., Robin A.Z., Nusrat A., Parkos C.A. Transmigrated neutrophils in the intestinal lumen engage ICAM-1 to regulate the epithelial barrier and neutrophil recruitment. *Mucosal Immunol.*, 2014, Vol. 7, no. 4, pp. 905-915.

Авторы:

Бондаренко Т.А. — научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Иванова Е.В. — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Бекпергенова А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Чайникова И.Н. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Челпаченко О.Е. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Никифоров И.А. — к.г.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Здвижкова И.А. — научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Authors:

Bondarenko T.A., Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Ivanova E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Bekpergenova A.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Chaynikova I.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, 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, 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, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Zdvizhkova I.A., Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ДНК-ВАКЦИНУ, КОДИРУЮЩУЮ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН БЕЛКА S ВИРУСА SARS-CoV-2, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА УПАКОВКИ

**Боргоякова М.Б., Карпенко Л.И., Старостина Е.В.,
Волосникова Е.А., Задорожный А.М., Орлова Л.А., Ильичев А.А.**

Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. Массовая вакцинация против SARS-CoV-2 представляется одним из наиболее важных этапов на пути разрешения проблемы пандемии COVID-19, которая за два с половиной года унесла жизни миллионов человек. Для создания анти-COVID-19 вакцин были задействованы как традиционные подходы (инактивированные вакцины), так и инновационные, благодаря чему на рынке появились вакцины на основе нуклеиновых кислот (мРНК-, ДНК-вакцины). Мы сконструировали плазмиду (ДНК-вакцину), кодирующую ген рецептор-связывающего домена (RBD) белка шипа (S) вируса SARS-CoV-2. Данная ДНК-вакцина была названа pVAXrbd. Для упаковки pVAXrbd был использован поликатионный носитель полиглуконин-спермидин (PGS), а также его конъюгат с рекомбинантным белком RBD (PGS-RBD). При добавлении отрицательно заряженной плазмидой ДНК pVAXrbd к поликатионным молекулам PGS или PGS-RBD, происходило формирование комплексов полимеров с плазмидной ДНК путем самосборки за счет нековалентного взаимодействия. Целью данной работы было исследование клеточного ответа, индуцированного ДНК-вакциной в различных вариантах упаковки, а также анализ вклада упаковки в развитие иммунного ответа. Мышам линии BALB/c вводили ДНК-вакцину в трех вариантах: «голую» pVAXrbd; плазмиду pVAXrbd в оболочке PGS; pVAXrbd в оболочке PGS-RBD. В качестве контроля животным вводили рекомбинантный белок RBD. Клеточный ответ оценивали по продукции IFN γ с помощью двух методов – ELISpot и ICS с использованием проточной цитометрией. Было показано, что ДНК-вакцина pVAXrbd как сама по себе, так и в составе комплексов, обладает способностью индуцировать клеточный иммунный от-

Адрес для переписки:

*Боргоякова Мария Борисовна
Центр геномных исследований мирового уровня по
обеспечению биологической безопасности и технологической
независимости ФБУН Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
630559, Россия, Новосибирская обл., р. п. Кольцово.
Тел.: 8 (383) 363-47-00 (доб. 20-08).
E-mail: borgoyakova_mb@vector.nsc.ru*

Address for correspondence:

*Borgoyakova Mariya B.
Center of Genomic Studies in Biological Safety, State Research
Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo.
Phone: 7 (383) 363-47-00 (acc. 20-08).
E-mail: borgoyakova_mb@vector.nsc.ru*

Образец цитирования:

*М.Б. Боргоякова, Л.И. Карпенко, Е.В. Старостина,
Е.А. Волосникова, А.М. Задорожный, Л.А. Орлова,
А.А. Ильичев «Клеточный иммунный ответ на ДНК-
вакцину, кодирующую рецептор-связывающий домен
белка S вируса SARS-CoV-2, в зависимости от способа
упаковки» // Российский иммунологический журнал,
2022. Т. 25, № 2. С. 131-138.
doi: 10.46235/1028-7221-1114-CIR
© Боргоякова М.Б. и соавт., 2022*

For citation:

*M.B. Borgoyakova, L.I. Karpenko, E.V. Starostina,
E.A. Volosnikova, A.M. Zadorozhny, L.A. Orlova,
A.A. Ilyichev "Cellular immune response to DNA vaccine
encoding receptor-binding domain of SARS-CoV-2 S protein:
dependence on the packing mode", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,
Vol. 25, no. 2, pp. 131-138.
doi: 10.46235/1028-7221-1114-CIR
DOI: 10.46235/1028-7221-1114-CIR*

вет. Наиболее эффективный клеточный ответ был обнаружен в группе животных, иммунизированных комплексом pVAXrbd-PGS. С помощью метода ELISpot для этой группы было зарегистрировано наибольшее количество клеток, ответивших выбросом IFN γ на стимуляцию специфическими пептидами; с помощью ICS и проточной цитометрии для этой группы был показан большой процент IFN γ -продуцирующих CD4 $^+$ и CD8 $^+$ T-клеток. Этот эффект, по-видимому, связан с тем, что оболочка из полиглюкин-спермидина защищает ДНК от действия нуклеаз, а комплексы pVAXrbd-PGS более эффективно узнаются антигенпрезентирующими клетками, чем голая плазмидная ДНК. Представленные результаты показывают, что оболочка из полиглюкин-спермидина обеспечивает повышение иммуногенности ДНК-вакцины pVAXrbd в отношении вирус-специфического T-клеточного ответа.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, ДНК-вакцина, иммунный ответ, ELISpot, ICS, упаковка ДНК-вакцин

CELLULAR IMMUNE RESPONSE TO DNA VACCINE ENCODING RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF SARS-CoV-2 S PROTEIN: DEPENDENCE ON THE PACKING MODE

Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Starostina E.V., Volosnikova E.A., Zadorozhny A.M., Orlova L.A., Ilyichev A.A.

Center of Genomic Studies in Biological Safety, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. Massive vaccination against SARS-CoV-2 appears to be one of the most important steps towards solving the problem of the COVID-19 pandemic, which threatened the lives of millions of people over two and a half years. To create anti-COVID-19 vaccines, both traditional approaches (inactivated vaccines), and innovative efforts were used, including the nucleic acid-based vaccines (mRNA, DNA vaccines) which appeared on the market. We constructed a plasmid (DNA vaccine) encoding the gene for the receptor-binding domain (RBD) of spike protein (S) of the SARS-CoV-2 virus. This DNA vaccine was named pVAXrbd. The polycationic carrier polyglucine-spermidine (PGS) and its recombinant RBD protein conjugate (PGS-RBD) were used to package pVAXrbd. By adding the negatively charged DNA pVAXrbd plasmid to polycationic PGS or PGS-RBD molecules, the complexes of polymers with plasmid DNA were formed by self-assembly, due to their non-covalent interaction. The aim of this work was to study cellular response induced by the DNA vaccine at various packaging options, as well as to analyze influence of the vaccine packaging upon development of the immune response. BALB/c mice were injected with DNA vaccine in three versions: "naked" pVAXrbd; plasmid pVAXrbd in PGS envelope; pVAXrbd in PGS-RBD wrapper. In control group, the animals were injected with the recombinant RBD protein. Cellular response was assessed by the IFN γ production using two methods, i.e., ELISpot and ICS using flow cytometry. It was shown that the DNA vaccine pVAXrbd, both *per se*, or as part of complexes, showed the ability to induce cellular immune response. The most effective cellular immune response was found in the group of animals immunized with pVAXrbd-PGS complex. Using ELISpot detection technique for this group, the largest number of cells responding by IFN γ release was registered upon stimulation with specific peptides; usage of ICS and flow cytometry for evaluation in this group showed higher percentage of IFN γ -producing CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells. This observed effect could be explained by DNA protection from nuclease action by the polyglucine-spermidine envelope. The pVAXrbd-PGS complexes may be also more efficiently recognized by antigen-presenting cells than naked plasmid DNA. The presented results show that the polyglucine-spermidine envelope provides an increase in immunogenicity of the DNA vaccine pVAXrbd, in terms of virus-specific T cell response.

Keywords: SARS-CoV-2, DNA vaccine, packing, immune response, ELISpot, ICS

Исследование было выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

Введение

Вирус SARS-CoV-2, вызывающий острый респираторный синдром COVID-19, впервые был обнаружен в г. Ухань, в Китае, в декабре 2019 года. С самого начала многие страны предприняли беспрецедентные меры по ограничению распространения заболевания. Вакцинация – одна из таких мер, призванная не только ограничить распространение инфекции в популяции, но и облегчить течение болезни при заражении. Для создания анти-COVID-19 вакцин были задействованы как традиционные подходы (инактивированные вакцины), так и инновационные, благодаря чему на рынке появились вакцины на основе нуклеиновых кислот (мРНК, ДНК) [11]. Одной из отличительных особенностей вакцин, основанных на нуклеиновых кислотах, является их способность индуцировать кроме гуморального эффективный клеточный иммунитет, в том числе цитотоксический. Как показывают различные исследования, для защиты от инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, необходима стимуляция обоих звеньев иммунитета [5]. У пациентов с бессимптомной и легкой формой заболевания COVID-19 в отсутствие антител были выявлены высокие уровни специфических цитотоксических Т-лимфоцитов [7, 10], что подтверждает важность Т-клеточного ответа в блокировании инфекции.

В настоящее время несколько ДНК-вакцин против SARS-CoV-2 проходят клинические испытания, одна из них зарегистрирована и используется для вакцинации населения в Индии [1, 4, 6, 9]. Недостатком ДНК-вакцин является их низкая иммуногенность при введении в виде голый плазмидной ДНК, поэтому многие исследователи работают над разработкой эффективных и безопасных средств доставки.

Мы сконструировали плазмиду pVAXrbd (ДНК-вакцину), кодирующую ген рецепторсвязывающего домена (RBD) белка шипа (S) вируса SARS-CoV-2. В качестве упаковки был использован поликатионный носитель полиглюкин-спермидин, а также его конъюгат с рекомбинантным белком RBD, наработанным в клетках CHO-K1.

Целью данной работы было исследование клеточного ответа, индуцированного ДНК-

вакциной pVAXrbd, а также анализ вклада ее упаковки в развитие иммунного ответа.

Материалы и методы

Конструирование плазмиды pVAXrbd было описано ранее [2]. Последовательность гена, кодирующего белок RBD, была клонирована в составе эукариотического плазмидного вектора pVAX. Полученную плазмиду (ДНК-вакцину) обозначили pVAXrbd. Для оценки способности pVAXrbd обеспечивать синтез целевого белка в эукариотических клетках проводили трансфекцию клеток HEK-293T. Трансфицированные клетки были исследованы на наличие белка RBD с помощью иммуноблотинга с высокотитражной сывороткой к RBD, а также на наличие специфической мРНК путем ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров. Оба метода показали, что экспрессия гена, кодирующего RBD, эффективно проходит как на уровне РНК, так и на уровне белка в эукариотических клетках.

Наработка белка RBD в клетках CHO-K1 и его иммуногенные свойства, а также получение конъюгатов данного белка с поликатионным носителем полиглюкин-спермидином были описаны нами ранее [8]. При добавлении отрицательно заряженной плазмидой ДНК pVAXrbd к положительно заряженным полимерам – полиглюкин-спермидин (PGS) или его конъюгат с белком RBD (PGS-RBD) происходило формирование комплексов поликатионов с плазмидной ДНК путем самосборки за счет нековалентного взаимодействия. Таким образом, мы получили два типа частиц: pVAXrbd-PGS и CCV-RBD (CCV – combined coronavirus vaccine), в центре каждой из которых находилась ДНК-вакцина pVAXrbd. Образованные частицы были проанализированы с помощью электронной микроскопии, электрофореза в агарозном геле и гель-фильтрации [3].

Для оценки иммуногенности созданных конструкций использовали самок мышей BALB/c массой 16-18 г. Все эксперименты с животными проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с протоколами, утвержденными Bioэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (номер разрешения: НИЦ ВБ «Вектор» / 10.09.2020). Мышей разделили на группы по 8 животных в каждой и иммунизировали следующим образом: группа CCV-RBD – комбинированной вакциной, содержащей 100 мкг ДНК и 100 мкг белка; группа pVAXrbd-PGS – 100 мкг плазмиды pVAXrbd, инкапсулированной в оболочку из PGS; группа pVAXrbd – 100 мкг «голая» ДНК-вакцина; группа RBD – 100 мкг белка RBD. В группе intact были неиммунизированные

животные. Мышей иммунизировали внутримышечно дважды с интервалом три недели в бедро задней конечности. Спустя 10 дней после второй иммунизации у животных были взяты селезенки для исследования Т-клеточного иммунного ответа.

Селезенки последовательно измельчали на нейлоновых фильтрах для клеток с диаметром пор 70 и 40 мкм (BD Falcon™, США). После лизиса эритроцитов лизирующим буфером (Sigma, США) спленоциты дважды отмывали в среде RPMI и помещали в 1 мл RPMI с 2 мМ L-глутамин, гентамицин (50 мкг/мл) и 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) (ThermoFisherScientific, США). Клетки подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток TC20™ (Bio-Rad, США).

ELISpot анализ проводили с использованием набора Mouse IFN- γ ELISpot kit (BD, США), согласно инструкции производителя. Спленоциты вносили в лунки в количестве 5×10^5 клеток/лунка. Для стимуляции использовали пул пептидов, рестриктируемых МНС класса I (H-2-Dd, H-2-Kd, H-2-Ld) и II (H2-IAAd, H2-IEAd) мышей BALB/c из последовательности рецепторсвязывающего домена S-белка SARS-CoV-2, в концентрации 20 мкг/мл для каждого пептида. Пептиды были рассчитаны с помощью инструментов IEDB Analysis Resource и синтезированы компанией AtaGenix Laboratories (Китай), чистота пептидов составляла более 80%. В качестве отрицательного контроля использовали нестимулированные клетки, а в качестве положительного — клетки, к которым добавляли конканавалин А. Число IFN γ -продуцирующих клеток подсчитывали с помощью ELISpot-ридера (Carl Zeiss, Германия).

Окрашивание внутриклеточных цитокинов проводили следующим образом: спленоциты вносили в лунки 24-луночных культуральных планшетов (TPP, Швейцария) в количестве 2×10^6 клеток/лунку и стимулировали смесью вирус-специфических пептидов, указанной выше, в концентрации 20 мкг/мл для каждого пептида. Клетки инкубировали в течение 4 часов при 37 °С в 5% CO₂, после чего вносили брефельдин А (5 мкг/мл, GolgiPlug BD Biosciences) и продолжали инкубацию еще в течение 16 часов. На следующий день клетки окрашивали анти-CD3 Alexa Fluor 700 (BD, США), анти-CD4 BV786 (BD, США) и анти-CD8 FITC (BD, США) антителами и фиксировали с использованием 1%-ного раствора параформальдегида. Для обнаружения внутриклеточных цитокинов к клеткам добавляли анти-IFN γ APC антитела (BD, США). Образцы

анализировали на проточном цитофлуориметре ZE5 (Bio-Rad, США), результаты обрабатывали с помощью программы Everest.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрического анализа Манна–Уитни в программе GraphPadPrism 6.0, при $p < 0,05$ различия считали статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

Целью данной работы было исследование клеточного ответа, индуцированного ДНК-вакциной в различных вариантах упаковки, а также анализ вклада упаковки в развитие иммунного ответа. Мышам линии BALB/c вводили ДНК-вакцину в трех вариантах: «голую» pVAXrbd; плазмиду pVAXrbd в оболочке PGS; pVAXrbd в оболочке PGS-RBD. В качестве контроля животным вводили рекомбинантный белок RBD. Клеточный ответ оценивали по продукции IFN γ с помощью двух методов — ELISpot и ICS с использованием проточной цитометрии.

С помощью метода ELISpot оценивали количество спленоцитов, продуцирующих IFN γ в ответ на специфическую стимуляцию пулом пептидов из белка RBD. Было показано, что наиболее высокий показатель клеточного иммунитета был зарегистрирован в группе животных, иммунизированных ДНК-вакциной в оболочке из PGS (рис. 1).

Средний уровень SFU на 10^6 спленоцитов составил 172 для группы pVAXrbd-PGS и 125 для группы pVAXrbd, тогда как для группы CCV-RBD он составил 41, а показатели группы, иммунизированной белком, сравнимы с показателями группы интактных мышей. Более высокий уровень IFN γ -продуцирующих клеток в группе, иммунизированной плазмидой в оболочке из PGS, возможно, связан с тем, что полиглюкин-спермидин защищает ДНК от действия нуклеаз и повышает эффективность трансфекции за счет нейтрализации отрицательного заряда нуклеиновой кислоты. Наиболее низкий ответ по данным ELISpot был зафиксирован в группе мышей, иммунизированных комплексом pVAXrbd в оболочке PGS-RBD (CCV-RBD). Однако он достоверно не отличался от клеточного ответа, обнаруженного у группы животных, иммунизированных голдой pVAXrbd.

Чтобы получить более полное представление об активации разных субпопуляций Т-клеток, мы оценили процент IFN γ -продуцирующих CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов с помощью метода внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) и проточной цитометрии (рис. 2).

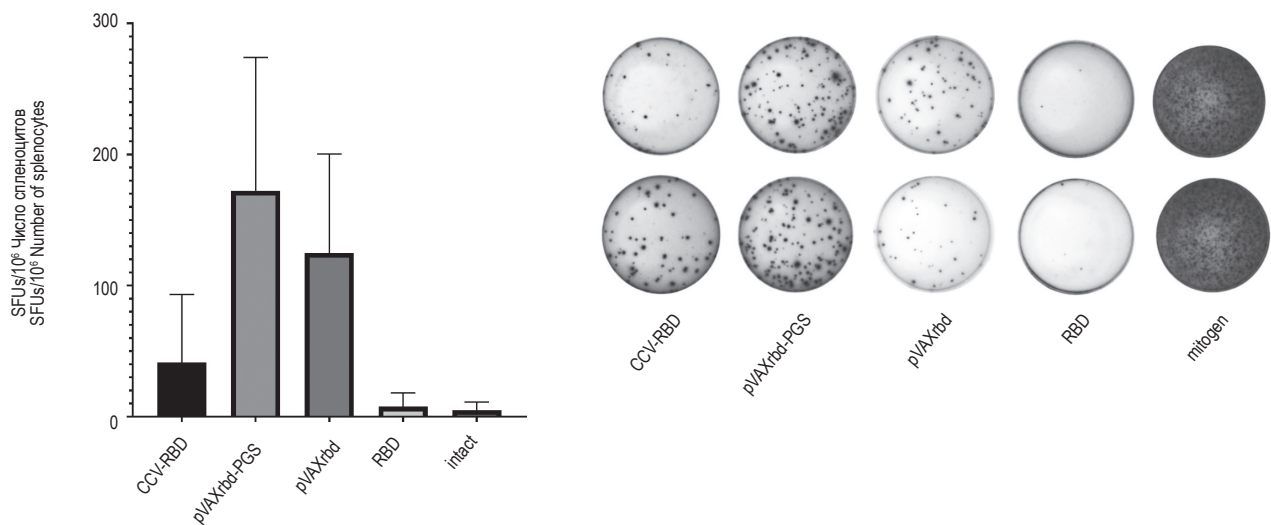


Рисунок 1. Число спленоцитов, продуцирующих IFN γ в ответ на специфическую стимуляцию, на 10⁶ клеток, определенное с помощью ELISpot

Примечание. Слева – данные представлены как средние \pm стандартное отклонение. Справа – типичный вид спотов для каждой группы иммунизированных животных.

Figure 1. Number of splenocytes producing IFN γ in response to specific stimulation, per 10⁶ cells, determined using ELISpot

Note. On the left, data are presented as means \pm standard deviation. On the right is a typical spot view for each group of the immunized animals.

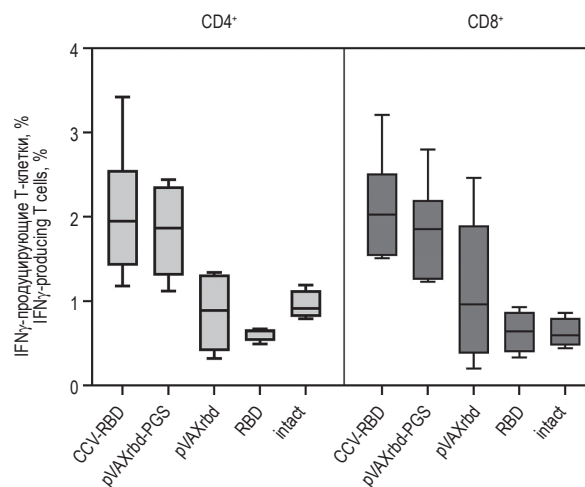


Рисунок 2. Процент SARS-CoV-2-специфических IFN γ -продуцирующих CD4⁺ и CD8⁺T-клеток, определенный с помощью ICS с использованием проточной цитометрии

Примечание. Графики выполнены в программе GraphPad Prism 8.0, данные представлены как разброс значений от минимальных к максимальным с обозначением средних.

Figure 2. Percentage of SARS-CoV-2-specific IFN γ -producing CD4⁺ and CD8⁺T cells determined by ICS using flow cytometry

Note. The graphs were created with GraphPad Prism 8.0 software, the data are presented as a spread of values from minimum to maximum with the designation of the average values.

Как видно из рисунка 2, наибольшее количество CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, способных синтезировать IFN γ в ответ на стимуляцию вирус-специфическими пептидами, выявлено в группе мышей, иммунизированных pVAXRbd в оболочке с PGS или PGS-RBD. По-видимому, оболочка из поликатионных конъюгатов способна обеспе-

чить более эффективную доставку ДНК-вакцины в антигенпрезентирующие клетки. Количество IFN γ -продуцирующих CD4⁺ и CD8⁺ ответ у животных, иммунизированных только белком RBD, было на уровне, выявленном у контрольной группы интактных животных. Введение животным только белка RBD не привело к значимому

формированию специфического Т-клеточного иммунитета.

Заключение

Таким образом, ДНК-вакцина pVAXrbd, кодирующая рецептор-связывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2, обладает способностью индуцировать клеточный иммунный ответ. Ком-

позиция данной плазмиды с поликатионным носителем полиглюкин-спермидин приводит к усилению клеточного ответа, что было показано с помощью ELISpot и ICS. Добавление белка на поверхности композиции также приводит к формированию специфического CD4⁺ и CD8⁺ ответа. pVAXrbd можно рассматривать как основу для создания различных комбинированных вакцин против COVID-19.

Список литературы / References

1. Ahn J.Y., Lee J., Suh Y.S., Song Y.G., Choi Y.J., Lee K.H., Seo S.H., Song M., Oh J.W., Kim M., Seo H.Y., Kwak J.E., Youn J.W., Woo J.W., Shin E.C., Sung Y.C., Park S.H., Choi J.Y. Safety and immunogenicity of two recombinant DNA COVID-19 vaccines containing the coding regions of the spike or spike and nucleocapsid proteins: an interim analysis of two open-label, non-randomised, phase 1 trials in healthy adults. *Lancet Microbe*, 2022, Vol. 3, no. 3, pp. e173-e183.
2. Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Rudometov A.P., Shanshin D.V., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Volkova N.V., Belenkaya S.V., Murashkin D.E., Shcherbakov D.N., Volosnikova E.A., Starostina E.V., Orlova L.A., Danilchenko N.V., Zaikovskaya A.V., Pyankov O.V., Ilyichev A.A. Immunogenic properties of the DNA construct encoding the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein. *Mol. Biol. (Mosk.)*, 2021, Vol. 55, no. 6, pp. 987-998.
3. Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Rudometov A.P., Volosnikova E.A., Merkuleva I.A., Starostina E.V., Zadorozhny A.M., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Shanshin D.V., Baranov K.O., Volkova N.V., Zaitsev B.N., Orlova L.A., Zaykovskaya A.V., Pyankov O.V., Danilenko E.D., Bazhan S.I., Shcherbakov D.N., Taranin A.V., Ilyichev A.A. Self-assembled particles combining SARS-CoV-2 RBD protein and RBD DNA vaccine induce synergistic enhancement of the humoral response in mice. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 4, 2188. doi: 10.3390/ijms23042188.
4. Kraynyak K.A., Blackwood E., Agnes J., Tebas P., Giffear M., Amante D., Reuschel E.L., Purwar M., Christensen-Quick A., Liu N., Andrade V.M., Diehl M.C., Wani S., Lupicka M., Sylvester A., Morrow M.P., Pezzoli P., McMullan T., Kulkarni A.J., Zaidi F.I., Frase D., Liaw K., Smith T.R.F., Ramos S.J., Ervin J., Adams M., Lee J., Dallas M., Shah Brown A., Shea J.E., Kim J.J., Weiner D.B., Broderick K.E., Humeau L.M., Boyer J.D., Mammen M.P. SARS-CoV-2 DNA vaccine INO-4800 induces durable immune responses capable of being boosted in a phase 1 open-label trial. *J. Infect. Dis.*, 2022, *jiac016*. doi: 10.1093/infdis/jiac016.
5. Lagunas-Rangel F.A., Chávez-Valencia V. What do we know about the antibody responses to SARS-CoV-2? *Immunobiology*, 2021, Vol. 226, no. 2, 152054. doi: 10.1016/j.imbio.2021.152054.
6. Mallapaty S. India's DNA COVID vaccine is a world first – more are coming. *Nature*, 2021, Vol. 597, pp. 161-162.
7. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Oldridge D.A., Greenplate A.R., Wu J.E., Alanio C., Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., D'Andrea K., Manne S., Chen Z., Huang Y.J., Reilly J.P., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Kuthuru O., Dougherty J., Nzingha K., Han N., Kim J., Pattekar A., Goodwin E.C., Anderson E.M., Weirick M.E., Gouma S., Arevalo C.P., Bolton M.J., Chen F., Lacey S.F., Ramage H., Cherry S., Hensley S.E., Apostolidis S.A., Huang A.C., Vella L.A.; UPenn COVID Processing Unit, Betts M.R., Meyer N.J., Wherry E.J. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*, 2020, Vol. 369, no. 6508, eabc8511. doi: 10.1126/science.abc8511
8. Merkuleva I.A., Shcherbakov D.N., Borgoyakova M.B., Shanshin D.V., Rudometov A.P., Karpenko L.I., Belenkaya S.V., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Kazachinskaia E.I., Volosnikova E.A., Esina T.I., Zaykovskaya A.V., Pyankov O.V., Borisevich S.S., Shelemba A.A., Chikaev A.N., Ilyichev A.A. Comparative immunogenicity of the recombinant receptor-binding domain of protein S SARS-CoV-2 obtained in prokaryotic and mammalian expression systems. *Vaccines (Basel)*, 2022, Vol. 10, no. 1, 96. doi: 10.3390/vaccines10010096.
9. Momin T., Kansagra K., Patel H., Sharma S., Sharma B., Patel J., Mittal R., Sanmukhani J., Maithal K., Dey A., Chandra H., Rajanathan C.T., Pericherla H.P., Kumar P., Narkhede A., Parmar D. Safety and immunogenicity

of a DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): Results of an open-label, non-randomized phase I part of phase I/II clinical study by intradermal route in healthy subjects in India. *EClinicalMedicine*, 2021, Vol. 38, 101020. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101020.

10. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E., Karolinska COVID-19 Study Group, Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J.I., Sönnnerborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.G., Aleman S., Buggert M. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 1, pp. 158-168.e14.

11. Simões R.S.Q., Rodríguez-Lázaro D. Classical and next-generation vaccine platforms to SARS-CoV-2: biotechnological strategies and genomic variants. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2022, Vol. 19, no. 4. 2392. doi: 10.3390/ijerph19042392.

Авторы:

Боргоякова М.Б. — младший научный сотрудник Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Карпенко Л.И. — д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Старостина Е.В. — к.б.н., научный сотрудник Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Волосникова Е.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Authors:

Borgoyakova M.B., Junior Research Associate, Center of Genomic Studies in Biological Safety, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Karpenko L.I., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Center of Genomic Studies in Biological Safety, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Starostina E.V., PhD (Biology), Research Associate, Center of Genomic Studies in Biological Safety, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Volosnikova E.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Center of Genomic Studies in Biological Safety, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Задорожный А.М. — стажер-исследователь, Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Орлова Л.А. — аспирант, стажер-исследователь, Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Ильичев А.А. — д.б.н., профессор, заведующий отделом биоинженерии, Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Zadorozhny A.M., Research Trainee, Center of Genomic Studies in Biological Safety, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Orlova L.A., Postgraduate Student, Research Trainee, Center of Genomic Studies in Biological Safety, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Ilyichev A.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of Bioengineering, Center of Genomic Studies in Biological Safety, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Поступила 13.05.2022
Отправлена на доработку 28.05.2022
Принята к печати 03.06.2022

Received 13.05.2022
Revision received 28.05.2022
Accepted 03.06.2022

ЧАСТОТА И ПАРАМЕТРЫ НЕРАВНОВЕСНОГО СЦЕПЛЕНИЯ ДВУХЛОКУСНЫХ ГАПЛОТИПОВ *HLA-B~MICA* У РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Вавилов М.Н.^{1,2}, Сулова Т.А.^{1,2}, Бурмистрова А.Л.¹

¹ ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

² ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», г. Челябинск, Россия

Резюме. Ген *MICA* расположен в области МНС на хромосоме 6p21.33, приблизительно 46,4 т.п.н. центромерно по отношению к гену *HLA-B* и находятся в строгом неравновесном сцеплении со всем регионом МНС I класса. Существенный полиморфизм человеческого гена *MICA* и его расположение в регионе HLA делает его наиболее вероятным кандидатом на роль дополнительного локуса гистосовместимости из двух функциональных генов семейства MHC. Данные об особенностях распределения двухлокусных гаплотипов *HLA-B~MICA* дают возможность получать информацию об уровне вероятных расхождений в локусе *MICA* при потенциальном подборе пары «донор — реципиент» по классическим локусам HLA для неродственной трансплантации ГСТ. В ходе исследования было проведено иммуногенетическое типирование 100 доноров, состоящих в Регистре доноров стволовой клетки ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», русских по национальности. Типирование локуса *MICA*, проводили методом полимеразной цепной реакции с сиквенс-специфическими праймерами на базовом разрешении. Типирование классического локуса *HLA-B* проводили методом NGS с использованием системы праймеров и программного обеспечения «HLA-Эксперт». Секвенирование проводили на приборе MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq v2 (Illumina). Показатели неравновесного сцепления D, D', r и частоты двухлокусных гаплотипов *HLA-B~MICA* были рассчитаны с помощью специализированной программы для иммуногенетических исследований Arlequin 3.5. В результате исследования были установлены основные параметры неравновесного сцепления и частоты двухлокусных гаплотипов *HLA-B~MICA* у русских Челябинской области. Выявлены аллельные группы *HLA-B* образующие устойчивые пары с конкретными аллельными вариантами *MICA* (*HLA-B*07, B*08, B*13, B*14, B*27, B*37, B*38, B*47, B*48, B*49, B*50, B*52, B*55, B*56, B*57*). При подборе пары «донор — реципиент» для неродственной трансплантации у лиц с этими аллельными группами можно ожидать отсутствие несовпадений по локусу *MICA* при условии полного совпадения по локусу *HLA-B*. А также аллельные группы *HLA-B*, образующие высоко варьируемые гаплотипы *HLA-B~MICA* (*HLA-B*15, B*18, B*35, B*39, B*40, B*41, B*44 и B*51*) с повышенным риском несоответствия по генам *MICA*. Полученные закономерности могут быть использованы в практической работе для оценки вероятности несовпадения пары «донор — реципиент» по неклассическому локусу *MICA* при подборе потенциального донора стволовых клеток гематологическим больным на основании классических локусов HLA. Кроме того, данные могут быть востребованы специалистами в популяционных исследованиях.

Ключевые слова: популяционная иммуногенетика, HLA, MICA, русская популяция, гаплотипы, Региональный регистр доноров костного мозга

Адрес для переписки:

Вавилов Михаил Николаевич
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»
454085, Россия, г. Челябинск, ул. Марченко, 7а, кв. 48.
Тел.: 8 (952) 508-90-84.
E-mail: vavlakhim@mail.ru

Address for correspondence:

Vavilov Mikhail N.
Chelyabinsk State University
454085, Russian Federation, Chelyabinsk, Marchenko str.,
7a, apt 48.
Phone: 7 (952) 508-90-84.
E-mail: vavlakhim@mail.ru

Образец цитирования:

М.Н. Вавилов, Т.А. Сулова, А.Л. Бурмистрова
«Частота и параметры неравновесного сцепления
двухлокусных гаплотипов *HLA-B~MICA* у русских
Челябинской области» // Российский иммунологический
журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 139-146.
doi: 10.46235/1028-7221-1134-FAP

© Вавилов М.Н. и соавт., 2022

For citation:

M.N. Vavilov, T.A. Suslova, A.L. Burmistrova "Frequency
and parameters of linkage disequilibrium of the two-locus
HLA-B~MICA haplotypes in Russians from Chelyabinsk
Region", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 139-146.
doi: 10.46235/1028-7221-1134-FAP

DOI: 10.46235/1028-7221-1134-FAP

FREQUENCY AND PARAMETERS OF LINKAGE DISEQUILIBRIUM OF THE TWO-LOCUS *HLA-B~MICA* HAPLOTYPES IN RUSSIANS FROM CHELYABINSK REGION

Vavilov M.N.^{a, b}, Suslova T.A.^{a, b}, Burmistrova A.L.^a

^a Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. *MICA* gene is located in the MHC region on chromosome 6p21.33, mapped ca. 46.4 kb centromeric to the *HLA-B* gene, being in strict linkage disequilibrium with MHC class I region. The sufficient polymorphism of human *MICA* gene and its location at the HLA region makes it a likely candidate locus for additional histocompatibility testing. The data on distribution of two-locus *HLA-B~MICA* haplotypes enable us to obtain information about the level of mismatches in the *MICA* locus when selecting suitable donor-recipient pair by conventional HLA loci for unrelated hematopoietic stem cell transplantation. We have performed immunogenetic typing of 100 donors of Russian Nationality from the Register of Stem Cell Donors at Chelyabinsk Regional Blood Bank. *MICA* genotyping was carried out by PCR tests with sequence-specific primers at basic resolution. Typing of the classical *HLA-B* locus was carried out by the NGS method using MiSeq instrument using a MiSeq v2 reagent kit (Illumina). Linkage disequilibrium indices D , D' , ρ , and the frequency of two-locus *HLA-B~MICA* haplotypes were calculated using Arlequin 3.5 software. As a result of this study, the main parameters of linkage disequilibrium and the frequency of two-locus *HLA-B~MICA* haplotypes were established for Russians from the Chelyabinsk region. *HLA-B* allelic groups have been identified that form stable pairs with specific *MICA* allelic variants (*HLA-B*07*, *B*08*, *B*13*, *B*14*, *B*27*, *B*37*, *B*38*, *B*47*, *B*48*, *B*49*, *B*50*, *B*52*, *B*55*, *B*56*, *B*57*). Moreover, we have revealed *HLA-B* allelic groups forming highly variable *HLA-B~MICA* haplotypes (*HLA-B*15*, *B*18*, *B*35*, *B*39*, *B*40*, *B*41*, *B*44* and *B*51*) with increased risk of mismatch for *MICA* genes. These results could be used in clinical practice in order to assess probability of the donor/recipient mismatch for non-classic *MICA* locus when selecting potential stem cell donors for hematological patients by HLA testing of classical loci. Moreover, these data could be demanded in population genetics.

Keywords: population immunogenetics, *HLA*, *MICA*, Russian population, haplotypes, Regional Bone Marrow Donor Registry

Введение

Одной из самых важных прикладных областей применения знаний о структуре и функциях генов главного комплекса гистосовместимости является аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток (ГСК). Так, повышение степени соответствия HLA между донором и реципиентом является одним из наиболее важных путей снижения риска посттрансплантационных осложнений. Для снижения рисков осложнений в посттрансплантационный период необходимо совпадение пары «донор – реципиент» по меньшей мере по 5 классическим локусам HLA (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*). Но даже при соблюдении строгих условий соответствия пары «донор – реципиент» по 10 генам из 10, частота РТПХ остается довольно высокой (у 50% пациентов развивается острая РТПХ II-IV степени, до 35% острая РТПХ III-IV степени и от 40% до 50% хроническая РТПХ) [3]. Более высокая частота РТПХ при полностью HLA-совместимой

неродственной трансплантации по сравнению с родственной намекает на существование дополнительных локусов гистосовместимости, вносящих свой вклад в посттрансплантационные осложнения. Наиболее многообещающим кандидатом, расположенным в регионе MHC I, является *MICA*, один из генов семейства *MIC* [1, 3, 4, 10, 13].

На данный момент известно 7 локусов *MIC*, из которых только *MICA* и *MICB* кодируют белковые продукты и обладают существенным аллельным полиморфизмом [5, 8, 12]. Человеческий ген *MICA* является наиболее вероятным кандидатом на роль дополнительного локуса гистосовместимости из двух функциональных генов семейства *MIC*. Ген *MICA* имеет размер ~15,5 т.п.н., расположен в области MHC на хромосоме 6p21.33, приблизительно 46,4 т.п.н. центромально по отношению к гену *HLA-B* и находятся в строгом неравновесном сцеплении со всем регионом MHC I класса. На сегодняшний день зарегистрировано

388 аллелей гена *MICA*, которые кодируют 192 варианта белковых продуктов [8].

Продуктом гена *MICA* является одноцепочечный (не зависящий от β 2-микроглобулина) гликопротеин клеточной поверхности, который активируется клеточным стрессом и является лигандом для активирующего рецептора NKG2D естественных киллеров. Распознавание молекулы *MICA* рецептором NKG2D позволяет иммунным клеткам идентифицировать и атаковать инфицированные или трансформированные клетки без необходимости экспрессии МНС класса I или распознавания антигена. Таким образом, взаимодействие *MICA*/NKG2D является эффективным механизмом иммунного надзора [4, 5, 12].

В связи с тем, что *MICA* представляет собой наиболее полиморфный неклассический локус HLA класса I, для *MICA* характерно наличие этнических и межпопуляционных различий в частотах генов, гаплотипов и параметрах неравновесного сцепления со всеми локусами входящими в регион HLA класса I, особенно это актуально для двухлокусных гаплотипов *HLA-B~MICA* [3, 8].

Популяционные особенности распределения частот генов и гаплотипов *MICA*, а также параметры их неравновесного сцепления с ближайшими локусами HLA у основных народов России до настоящего времени остаются мало изученными [8, 9]. Однако данные о популяционных особенностях в распределении генов *MICA* в различных регионах России могут быть востребованы при создании Российского Регистра доноров стволовой клетки. А данные о частотах двухлокусных гаплотипов *HLA-B~MICA* могут быть использованы для оценки уровня вероятных расхождений в локусе *MICA* при подборе пары «донор – реципиент» по классическим локусам HLA, способствуя разработке персонализированных подходов к терапии онкогематологических пациентов.

Цель исследования – вычислить частоту и параметры неравновесного сцепления двухлокусных гаплотипов *HLA-B~MICA* в популяции русских Челябинской области.

Материалы и методы

В исследование вошли 100 потенциально здоровых, случайно выбранных неродственных, постоянно проживающих на территории Челябинской области доноров, состоящих в Регистре доноров стволовой клетки ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», русских по национальности. Принадлежность к определенной этнической группе определялась по официальным документам и данным генеалогического анамнеза в трех поколениях согласно рекомендациям 8-го Международного Уоркшопа 1980 года.

Иммуногенетическое типирование локуса *MICA* осуществляли методом полимеразной цепной реакции с сиквенс-специфическими праймерами (Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction, PCR-SSP) на базовом разрешении [11].

Типирование HLA-B проводили методом NGS с использованием системы праймеров «HLA-Эксперт» согласно инструкции производителя (ДНК-технология, Москва, Россия). Анализ последовательности генов HLA-B проводили методом ПЦР-амплификации экзонов 2, 3, 4 и фланкирующих интронных областей. Библиотеки для секвенирования готовили с помощью набора «HLA-Эксперт», реакции включали 1-5 нг геномной ДНК (Protrans DNA BOX 500, Германия). Секвенирование проводили на приборе MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq v2 (500 циклов) (Illumina). Анализ данных первичной последовательности проводили с использованием программного обеспечения «HLA-Эксперт». Аллели были обозначены и аннотированы с использованием программного обеспечения собственной разработки и базы данных IMGT/HLA.

С помощью компьютерной программы Arlequin 3.5 [2, 6] была рассчитана частота гаплотипов (HF – haplotype frequency) и параметры неравновесного сцепления (D , D' , χ^2) и степень достоверности полученных значений P-values (достоверность при $p \leq 0,05$).

Для визуального представления характера межпопуляционных различий на основе частот двухлокусных гаплотипов в программе PAST (версия 2.17) было произведено построение графика рассеяния методом многомерного шкалирования (Multidimensional scaling – MDS) по двум осям [7].

Материалом для сравнительного популяционного исследования послужили частоты гаплотипов *HLA-B~MICA* у русских Челябинской области и 23 мировых популяций из международной базы данных The Allele Frequency Net Database (AFND) (<http://www.allelefrequencies.net>) [9].

Результаты и обсуждение

Анализируя результаты вычисления основных параметров неравновесного сцепления и частот двухлокусных гаплотипов *HLA-B~MICA* у русских Челябинской области, представленные в таблице 1, можно выделить некоторые закономерности. Основная часть гаплотипов *HLA-B~MICA* характеризуется высокими показателями неравновесного сцепления и представляет собой единственный устойчивый вариант сочетания аллельного семейства *HLA-B* и конкретного аллельного варианта *MICA*. Так, аллельные группы *HLA-B*07*, *B*08*, *B*13*, *B*14*, *B*27*, *B*37*, *B*38*, *B*47*, *B*48*, *B*49*, *B*50*, *B*52*, *B*55*, *B*56*, *B*57*

ТАБЛИЦА 1 ДВУХЛОКУСНЫЕ ГАПЛОТИПЫ HLA-B~MICA У РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

TABLE 1. TWO-LOCUS HLA-B~MICA HAPLOTYPES IN RUSSIANS FROM THE CHELYABINSK REGION

Аллельные группы Allelic groups HLA-B*	Галлотип Haplotype HLA-B~MICA	Количество* Number n	Частота галлотипа Haplotype frequency (Hf), %	Неравновесное сцепления D' ^{***} Linkage disequilibrium D'	Уровень значимости, p Level of significance, p
	B*07:02~MICA*008	29	14,5	1	<<0,001
	B*08:01~MICA*008	13	6,5	1	<<0,001
	B*13:02~MICA*008	12	6	1	<<0,001
	B*14:02~MICA*011	3	1,5	1	<<0,001
B*15	B*15:01~MICA*010	18	9	1	<<0,001
	<i>B*15:16~MICA*002</i>	<i>1</i>	<i>0,5</i>	<i>1</i>	<i>0,022</i>
	<i>B*15:24~MICA*010</i>	<i>1</i>	<i>0,5</i>	<i>1</i>	<i>0,002</i>
B*18	B*18:01~MICA*018	9	4,5	0,895	<<0,001
	B*18:03~MICA*018	1	0,5	1	<<0,001
	<i>B*18:01~MICA*002</i>	<i>1</i>	<i>0,5</i>	<i>-0,38</i>	<i>0,595</i>
	B*27:05~MICA*007	12	6	1	<<0,001
B*35	B*35:01~MICA*002	16	8	0,930	<<0,001
	<i>B*35:03~MICA*002</i>	<i>2</i>	<i>1</i>	<i>0,405</i>	<i>0,061</i>
	<i>B*35:01~MICA*016</i>	<i>1</i>	<i>0,5</i>	<i>1</i>	<i>0,001</i>
	<i>B*35:03~MICA*009:01</i>	<i>2</i>	<i>1</i>	<i>0,459</i>	<i>0,001</i>
	B*37:01~MICA*008	3	1,5	1	0,021
	B*38:01~MICA*002	4	2	1	<<0,001
B*39	B*39:01~MICA*002	6	3	0,830	<<0,001
	B*39:06~MICA*002	1	0,5	1	0,022
	<i>B*39:01~MICA*007</i>	<i>1</i>	<i>0,5</i>	<i>0,078</i>	<i>0,442</i>
B*40	B*40:01~MICA*008	6	3	1	0,001
	B*40:02~MICA*027	3	1,5	1	<<0,001
	<i>B*40:02~MICA*048</i>	<i>1</i>	<i>0,5</i>	<i>1</i>	<i><<0,001</i>
B*41	B*41:01~MICA*004	1	0,5	0,462	0,017
	B*41:02~MICA*004	5	2,5	1	<< 0,001
	<i>B*41:01~MICA*008</i>	<i>1</i>	<i>0,5</i>	<i>0,213</i>	<i>0,690</i>
B*44	B*44:02~MICA*008	7	3,5	1	<<0,001
	<i>B*44:05~MICA*008</i>	<i>1</i>	<i>0,5</i>	<i>1</i>	<i>0,186</i>
	<i>B*44:03~MICA*004</i>	<i>6</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i><<0,001</i>

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Аллельные группы Allelic groups HLA-B*	Гаплотип Haplotype HLA-B~MICA	Количество* Number n	Частота гаплотипа Haplotype frequency (Hf), %	Неравновесное сцепления D'*** Linkage disequilibrium D'	Уровень значимости, p Level of significance, p
	<i>B*47:01~MICA*008</i>	1	0,5	1	0,186
	<i>B*48:01~MICA*del</i>	1	0,5	1	<<0,001
	<i>B*49:01~MICA*004</i>	2	1	1	<<0,001
	<i>B*50:01~MICA*009:02</i>	2	1	1	<<0,001
B*51	<i>B*51:01~MICA*009:01</i>	8	4	0,584	<<0,001
	<i>B*51:01~MICA*006</i>	2	1	1	<<0,001
	<i>B*51:01~MICA*007</i>	1	0,5	0,007	0,919
	<i>B*51:01~MICA*049</i>	2	1	1	<<0,001
	<i>B*52:01~MICA*009:01</i>	5	2,5	1	<<0,001
	<i>B*55:01~MICA*012</i>	1	0,5	1	<<0,001
	<i>B*56:01~MICA*002</i>	1	0,5	1	0,022
	<i>B*57:01~MICA*017</i>	7	3,5	1	<<0,001
Сумма частот наиболее вероятных гаплотипов **** Sum of frequencies of the most probable haplotypes ****		180	90		
Сумма частот маловероятных гаплотипов***** Sum of frequencies of hardly probable haplotypes*****		20	10		

Примечание. * – аллельные группы *HLA-B* с наибольшим разнообразием вариантов гаплотипов; ** – количество положительных индивидуумов; *** – нормированное неравновесное сцепление; **** – сумма самых устойчивых сочетаний двухлокусных гаплотипов *HLA-B~MICA* внутри аллельных групп *HLA-B*; ***** – сумма всех остальных гаплотипов, отражает общую вероятность миссматчей при трансплантации ГСК.

Note. *, *HLA-B* allelic groups with the highest diversity of haplotype variants; **, number of positive individuals; ***, normalized linkage disequilibrium; ****, the sum of the most stable combinations of two-locus *HLA-B~MICA* haplotypes within *HLA-B* allelic groups; *****, the sum of all other haplotypes reflects the overall probability of mismatches during HSC transplantation.

образуют устойчивые пары с конкретными аллельными вариантами *MICA* и при подборе пары «донор – реципиент» для неродственной трансплантации можно ожидать отсутствие несовпадений по локусу *MICA* при условии полного совпадения по локусу *HLA-B*.

Для аллельных групп *HLA-B*15, B*18, B*35, B*39, B*40, B*41, B*44, B*51* характерно наличие помимо одного или двух самых устойчивых и ожидаемых вариантов сочетания *HLA-B~MICA*, еще и непредсказуемых и мало сцепленных сочетаний гаплотипов. Так, аллельная группа *HLA-B*15* в 19 гаплотипах встречается с *MICA*010* и толь-

ко один гаплотип представлен нетипичным сочетанием *B*15:16~MICA*002*. Похожая ситуация наблюдается для *HLA-B*18* и *HLA-B*35*. *HLA-B*18* в 10 гаплотипах сцеплен с *MICA*018* и только один гаплотип образован с аллельным вариантом *MICA*002*, Сочетание *B*35~MICA*002* встречается в 18 случаях и только 3 гаплотипа образованы аллельными вариантами *MICA*016* и *MICA*009:01*.

В аллельных группах *B*39* и *B*41* соотношение устойчивых и не устойчивых гаплотипов 7 против 1 и 6 против 1 соответственно. Наибольшая неоднозначность в формировании гаплоти-

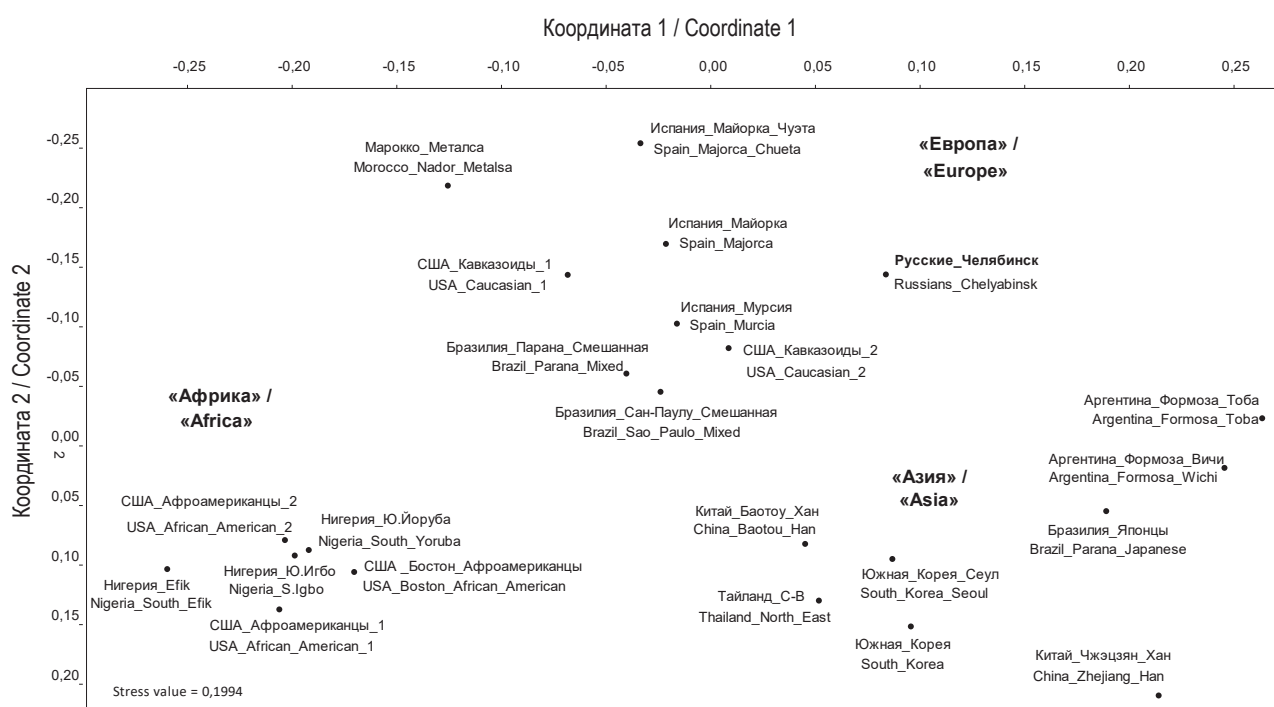


Рисунок 1. Многомерное шкалирование в двух измерениях на основании частот двухлокусных гаплотипов HLA-B~MICA 23-х популяций

Примечание. Диаграмма построена в программе PAST (версия 2.17) на основании частот двухлокусных гаплотипов HLA-B~MICA 23 популяций, при помощи метода многомерного шкалирования по двум осям (MDS). В качестве критерия оценки точности полученного графического изображения MDS использовали меру Stress value = 0,1994 (от 0.4 – низкий до 0.0 – идеальный). Мировые популяции, вошедшие в сравнительное исследование (в скобках указаны размер выборки, автор исследования и год): «Африка»: Нигерия Эфик (32, Tian W., 2002), Нигерия Ю. Игбо (46, Tian W., 2002), Нигерия Ю. Йоруба (74, Tian W., 2002), США Афроамериканцы 1 (201, Zhang Y., 2002), США Афроамериканцы 2 (39, Tian W., 2002), США Бостон Афроамериканцы (60, Tian W., 2002); «Европа»: США Кавказоиды 1 (242, Petersdorf E.W., 1998), США Кавказоиды 2 (103, Zhang Y., 2000), Марокко Металса (82, Piantatelli D., 2001), Испания Майорка (165, Cambra A., 2008), Испания Мурсия (154, Lucas D., 2007), Испания Майорка Чуэта (95, Cambra A., 2009); «Азия»: Бразилия Японцы (190, de Alencar J.B., 2017), Китай Баоту Хань (104, Tian W., 2009), Китай Чжэцзян Хань (100, Zhu F., 2008), Южная Корея (199, Pyo C.-W., 2003), Южная Корея, Сеул (139, Sohn Y.-H., 2009), Северо-Восток Таиланда (255, Romphruk A.V., 2000); «Другие»: Аргентина Формоза Тоба (94, Zhang Y., 2002), Аргентина Формоза Вичи (42, Zhang Y., 2002), Бразилия Парана Смешанная (201, Visentainer J.E.L., 2011), Бразилия Сан-Паулу Смешанная (200, Marin M.L.C., 2001).

Figure 1. Multivariate scaling in two dimensions based on the frequencies of two-locus HLA-B~MICA haplotypes of 23 populations. Note. The diagram was built in the PAST program (version 2.17) based on the frequencies of the two-locus HLA-B~MICA haplotypes of 23 populations, using the method of Multidimensional scaling (MDS). Stress value = 0.1994 (from 0.4 – low to 0.0 – ideal).

World populations included in the comparative study (in parentheses are the sample size, the author of the study and the year): "Africa": Nigeria Efik (32, Tian W., 2002), Nigeria Y. Igbo (46, Tian W., 2002), Nigeria Yu Yoruba (74, Tian W., 2002), US African American 1 (201, Zhang Y., 2002), US African American 2 (39, Tian W., 2002), US Boston African American (60, Tian W., 2002); "Europe": US Caucasians 1 (242, Petersdorf E.W., 1998), US Caucasians 2 (103, Zhang Y., 2000), Morocco Metalsa (82, Piantatelli D., 2001), Spain Mallorca (165, Cambra A., 2008), Spain Murcia (154, Lucas D., 2007), Spain Mallorca Chueta (95, Cambra A., 2009); "Asia": Brazil Japanese (190, de Alencar J.B., 2017), China Baotou Han (104, Tian W., 2009), China Zhejiang Han (100, Zhu F., 2008), South Korea (199, Pyo C.-W., 2003), South Korea, Seoul (139, Sohn Y.-H., 2009), Northeast Thailand (255, Romphruk A.V., 2000); "Others": Argentina Formosa Toba (94, Zhang Y., 2002), Argentina Formosa Vichi (42, Zhang Y., 2002), Brazil Parana Mixed (201, Visentainer J.E.L., 2011), Brazil São Paulo Mixed (200, Marin M.L.C., 2001)

пов наблюдается в группах *B*44* и *B*51*. *B*44* в 8 случаях имеет устойчивую связь с *MICA*008* и в 6 случаях встречается с *MICA*004*. В гаплотипах с *B*51* 8 гаплотипов образованы за счет сочетания с *MICA*009:01* и 5 гаплотипов образуются за счет различных *MICA*: *MICA*006*, *MICA*007* и *MICA*049*.

В общей сложности до 10 процентов гаплотипов представляют собой маловероятные сочетания. Именно подобные непредсказуемые сочетания могут представлять потенциальную угрозу посттрансплантационных осложнений при неродственной трансплантации ГСТ. Наши данные хорошо согласуются с исследованиями,

где утверждается, что из-за высокой степени сцепленности локуса *MICA* с *HLA-B* до 88% пар «донор – пациент», подобранных по 5 классическим локусам HLA (10/10), также подходят и по *MICA* [3].

В совокупности наши результаты предполагают возможность внедрить выборочное предтрансплантационное типирование по генам *MICA* только для лиц, находящихся в группе риска, обладающих *HLA-B* с повышенной вариабельностью гаплотипов *HLA-B~MICA*. Что облегчает нахождение полностью совпадающего по генам *MICA* донора, при условии полного совпадения по классическим локусам HLA. Применение данного подхода может быть прямым средством снижения частоты как острой, так и хронической РТПХ.

Следующим этапом нашего исследования было попытаться выявить наличие межпопуляционных закономерностей в частотах гаплотипов *HLA-B~MICA*.

Для оценки межпопуляционного разнообразия в частотах гаплотипов *HLA-B~MICA* было произведено построение графика рассеяния на основе частот двухлокусных гаплотипов с 23 мировыми популяциями методом MDS (рис. 1).

На рисунке 1 мы видим, что популяции африканского происхождения, популяции азиатского происхождения и популяции европейского происхождения формируют довольно выраженные кластеры в соответствии с географическим регионом их происхождения. Данный факт позволяет предположить, что существующие различия носят не случайный характер, а основаны на род-

стве популяций, указывая на регион происхождения предковых популяций.

Это позволяет утверждать, что существующие региональные закономерности в частотах гаплотипов, необходимо учитывать при подборе донора.

Заключение

Хотя вопрос о причине аллельного разнообразия локусов MICA до сих пор остается открытым, нет сомнений, что полиморфизм данных генов может играть определенную роль в отторжении аллотрансплантата [1, 3, 4, 10, 13], осложняя тем самым подбор доноров для пересадки органов и тканей. Совместимость пары «донор – реципиент» по MICA помогает осуществить более точный и специфический подбор доноров нуждающихся в неродственной пересадке ГСТ, снижая риск отторжения трансплантата по неклассическим локусам HLA [1, 3, 4, 10, 13].

Располагая данными о частотах гаплотипов *HLA-B~MICA* в конкретной этнической группе можно выделить группу лиц с определенными аллельными вариантами *HLA-B* с повышенным риском несовпадения по *MICA* при подборе пары «донор – реципиент». Это дает возможность для персонализированного подхода как в подборе донора для ГСТ, так и для отслеживания посттрансплантационных осложнений. Кроме того, полученные данные могут служить группой сравнения для проведения научно-исследовательских работ по направлению «HLA и заболевания», а также могут быть востребованы специалистами в популяционных исследованиях.

Список литературы / References

1. Anderson E., Grzywacz B., Wang H., Wang T., Haagenson M., Spellman S., Blazar B.R., Miller J.S., Verneris M.R. Limited role of MHC class I chain-related gene a (MICA) typing in assessing graft-versus-host disease risk after fully human leukocyte antigen-matched unrelated donor transplantation. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 21, pp. 4753-4754.
2. Arlequin: An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis [cmpg.unibe.ch]. Arlequin ver 3.5.2.2 [released on 02.08.2015; date of access May 2022]. Available at: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>.
3. Carapito R., Jung N., Kwemou M., Untrau M., Michel S., Pichot A., Giacometti G., Macquin C., Ilias W., Morlon A., Kotova I., Apostolova P., Schmitt-Graeff A., Cesbron A., Gagne K., Oudshoorn M., Holt B., Labalette M., Spierings E., Picard C., Loiseau P., Tamouza R., Toubert A., Parissiadis A., Dubois V., Lafarge X., Maumy-Bertrand M., Bertrand F., Vago L., Ciceri F., Paillard C., Querol S., Sierra J., Fleischhauer K., Nagler A., Labopin M., Inoko H., Borne P., Kuball J., Ota M., Katsuyama Y., Michallet M., Lioure B., Latour R.P., Blaise D., Cornelissen J.J., Yakoub-Agha I., Claas F., Moreau P., Milpied N., Charron D., Mohty M., Zeiser R., Socié G., Bahram S. Matching for the nonconventional MHC-I MICA gene significantly reduces the incidence of acute and chronic GVHD. *Blood*, 2016, Vol. 128, no. 15, pp. 1979-1986.
4. Chen D., Gyllensten U. MICA polymorphism: biology and importance in cancer. *Carcinogenesis*, 2014, Vol. 35, no. 12, pp. 2633-2642.
5. Collins R.W.M. Human MHC class I chain related (MIC) genes: Their biological function and relevance to disease and transplantation. *Eur. J. Immunogenet.*, 2004, Vol. 31, no. 3, pp. 105-114.
6. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.*, 2010, Vol. 10, no. 3, pp. 564-567.

7. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.*, 2001, Vol. 4, no. 1, pp. 1-9.
8. HLA Alleles Numbers [HLA.Alleles.org]. Nomenclature HLA; 2022 [Date of access May 2022]. Available at: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>.
9. MIC » MIC-HLA Association Frequency Search [allelefrequencies.net]. Allele Frequency Net Database; [Date of access May 2022]. Available at: <http://www.allelefrequencies.net/mic6001a.asp>.
10. Parmar S., del Lima M., Zou Y., Patah P.A., Liu P., Cano P., Rondon G., Pessoa S., Padua Silva L., Qazilbash M.H., Hosing C., Popat U., Kebriaei P., Shpall E.J., Giralt S., Champlin R.E., Stastny P., Fernandez-Vina M. Donor-recipient mismatches in MHC class I chain-related gene a in unrelated donor transplantation lead to increased incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 14, pp. 2884-2887.
11. Rees M.T., Downing J., Darke C. A typing system for the Major Histocompatibility Complex class I chain related genes A and B using polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Genet. Test.*, 2005, Vol. 9, no. 2, pp. 93-110.
12. Stastny P. Introduction: MICA/MICB in Innate Immunity, Adaptive Immunity, Autoimmunity, Cancer, and in the immune response to transplants. *Hum. Immunol.*, 2006, Vol. 67, no. 3, pp. 141-144.
13. Warren E.H., Zhang X.C., Li S., Fan W., Storer B.E., Chien J.W., Boeckh M.J., Zhao L.P., Martin P.J., Hansen J.A. Effect of MHC and non-MHC donor/recipient genetic disparity on the outcome of allogeneic HCT. *Blood*, 2012, Vol. 120, no. 14, pp. 2796-2806.

Авторы:

Вавилов М.Н. – аспирант кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»; биолог лаборатории иммунологических исследований ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», г. Челябинск, Россия

Суслова Т.А. – к.м.н., доцент, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»; заведующая лабораторией иммунологических исследований ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», 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:

Vavilov M.N., Postgraduate Student, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University; Biologist, Laboratory of Immunological Testing, Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station, Chelyabinsk, Russian Federation

Suslova T.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University; Head, Laboratory of Immunological Testing, Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station, 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 15.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 15.05.2022
Accepted 29.05.2022

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ И АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

**Гаврилова Е.Д., Демченко Е.Н., Гойман Е.В., Чумасова О.А.,
Вольский Н.Н., Сизиков А.Э., Козлов В.А.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия*

Резюме. Нейтрофильные лейкоциты играют ключевую роль в поражении суставов при развитии ревматоидного артрита (РА). Процесс специфической гибели этих клеток (нетоз) может быть важным источником происхождения обнаруживаемого в крови пациентов с РА повышенного уровня внДНК. Большой интерес представляет изучение предполагаемой зависимости между содержанием в крови внДНК, способной играть роль аутоантигена и таким образом участвовать в инициации аутоиммунных реакций и показателями активации нейтрофилов при этом иммунопатологическом состоянии. Целью исследования стало определение уровней внДНК в плазме крови пациентов с РА в зависимости от клинических показателей течения заболевания и выявление возможной связи данного показателя с активацией нейтрофильных лейкоцитов. В исследование были включены 63 пациента с РА, находившиеся на стационарном лечении в ревматологическом отделении клиники иммунопатологии НИИФКИ (г. Новосибирск) и 28 условно здоровых доноров. Определение уровня внДНК проводили с помощью флюоресцентного красителя PicoGreen. Нейтрофилы из периферической крови доноров и пациентов с ревматоидным артритом выделяли в двойном градиенте плотности фиколл-урографин. Нейтрофильные лейкоциты составляли более 98% во фракции выделенных клеток, а их жизнеспособность составляла 99%. Часть свежее выделенных нейтрофилов стимулировали добавлением форболмиристан-ацетата (РМА). Концентрацию миелопероксидазы в плазме крови доноров и пациентов с РА определяли с помощью набора Human MPO ELISA kit. Показано, что возрастание концентрации внеклеточной ДНК в плазме крови пациентов с РА происходит параллельно увеличению степени активности заболевания, и данный параметр может служить относительно независимым показателем интенсивности патологического процесса. Выявлены статистически достоверные корреляции уровня внДНК с основными показателями, позволяющими оценивать активность заболевания в клинике: DAS-28 и уровнем С-реактивного белка в сыворотке ($p < 0,05$). У пациентов с ревматоидным артритом на фоне лечения наблюдается снижение концентрации внДНК в плазме, что может быть связано с положительным прогнозом: снижением клинических проявлений заболевания, а значит, и правильно подобранной терапией. Установлена корреляция между уровнем внДНК и концентрацией миелопероксидазы в крови пациентов с РА. Полученные при исследовании данные говорят о возможной

Адрес для переписки:

*Гаврилова Елена Давидовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск,
ул. Ядринцевская, 14, каб. 215.
Тел.: 8 (383) 222-04-38.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: edav.gavr@mail.ru*

Address for correspondence:

*Gavrilova Elena D.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14, room 215.
Phone: 7 (383) 222-04-38.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: edav.gavr@mail.ru*

Образец цитирования:

*Е.Д. Гаврилова, Е.Н. Демченко, Е.В. Гойман,
О.А. Чумасова, Н.Н. Вольский, А.Э. Сизиков,
В.А. Козлов «Внеклеточная ДНК в плазме крови
и активность нейтрофильных лейкоцитов у
пациентов с ревматоидным артритом» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 147-154.
doi: 10.46235/1028-7221-1110-PED
© Гаврилова Е.Д. и соавт., 2022*

For citation:

*E.D. Gavrilova, E.N. Demchenko, E.V. Goiman,
O.A. Chumasova, N.N. Volsky, A.E. Sizikov, V.A. Kozlov
“Plasma extracellular DNA and neutrophilic leukocyte
activity in patients with rheumatoid arthritis”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,
Vol. 25, no. 2, pp. 147-154.
doi: 10.46235/1028-7221-1110-PED
DOI: 10.46235/1028-7221-1110-PED*

связи повышенной концентрации внеклеточной ДНК с активацией нейтрофильных лейкоцитов при ревматоидном артрите и с усилением нетоза в пораженных суставах.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, нейтрофильные лейкоциты, нетоз, миелопероксидаза

PLASMA EXTRACELLULAR DNA AND NEUTROPHILIC LEUKOCYTE ACTIVITY IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Gavrilova E.D., Demchenko E.N., Goiman E.V., Chumasova O.A., Volsky N.N., Sizikov A.E., Kozlov V.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Neutrophilic leukocytes play a key role for the joint damage in development of rheumatoid arthritis (RA). The specific death mode of these cells (netosis) may be an important reason of increase of cell-free DNA (cfDNA) in peripheral blood of the RA patients. Of great interest would be studies of alleged relationships between the of blood cfDNA contents being able of playing the role of an auto-antigen participating in the initiation of autoimmune reactions, and indices of neutrophil activation in this immunopathological disorder. The aim of the present study was to determine the levels of cfDNA in blood plasma of patients with RA depending on the clinical course of the disease, and to evaluate possible relationships between this index and activation of neutrophilic leukocytes. The study was conducted on 28 conditionally healthy donors and 63 patients with RA from the Rheumatology Department at the Clinic of Immunopathology (Novosibirsk). The level of cfDNA was determined using PicoGreen fluorescent dye. Neutrophils from the peripheral blood of donors and patients with rheumatoid arthritis were isolated in a Ficoll-Urografin density gradient. Neutrophilic leukocytes accounted for more than 98% of the fraction of isolated cells, and their viability was 99%. A portion of freshly isolated neutrophils was stimulated by phorbol myristate acetate. Concentration of myeloperoxidase in blood plasma of donors and patients with RA was determined using the Human MPO ELISA kit. It has been shown that the increased concentration of extracellular DNA in blood plasma of RA patients correlates with an higher degree of disease activity, and this parameter may serve as a relatively independent indicator of the disease intensity. A correlation was found between the level of cfDNA and common biochemical markers used to assess the activity of disease, i.e., DAS-28 and C-reactive protein levels in serum ($p < 0.05$). Decrease of cfDNA concentrations is detected during treatment of the RA patients. This is due to the expected prognosis, i.e., a decreased manifestation of the disease, which also means correct administration of therapy. A relationship was found between the level of cfDNA and blood myeloperoxidase concentration in RA patients. The data obtained during the study suggest a possible connection between increased concentration of extracellular DNA, and activation of neutrophilic leukocytes in rheumatoid arthritis, with increased netosis in the affected joints.

Keywords: extracellular DNA, neutrophilic leukocytes, netosis, myeloperoxidase

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета для выполнения государственного задания на научно-исследовательскую работу «Изучение иммунопатогенеза фенотипов социально значимых заболеваний человека и полиморбидности как основа для разработки новых методов персонифицированной диагностики и лечения» (РК № 122012000366-9).

Введение

В последние десятилетия было установлено, что содержание внеклеточной ДНК (внДНК) в циркулирующей крови человека и животных за-

кономерно изменяется при различных патофизиологических процессах и может служить показателем их динамики. Существенные изменения этого параметра обнаружены у пациентов с различными видами опухолей, при воспалительных реакциях, иммунопатологических состояниях и других заболеваниях (в качестве обзора см. работы [1, 7]). Поскольку предполагается, что внДНК способна играть роль аутоантигена и участвовать в инициации аутоиммунных реакций, внимание исследователей было привлечено к изменениям ее концентрации в крови при болезнях, обусловленных нарушениями деятельности иммунной

системы и, в частности, при ревматоидном артрите (РА). Было показано, что уровень внДНК в плазме крови при РА существенно повышен и в некоторых случаях может быть связан с особенностями патологического процесса у индивидуальных больных [7, 8, 11].

Нейтрофильные лейкоциты играют ключевую роль в поражении суставов при развитии РА и нетоз этих клеток (то есть выход фрагментов ядерного материала в комплексе с разнообразными гидролитическими ферментами за пределы цитоплазматической мембраны и формирование специфической внеклеточно расположенной «сети») может быть важным источником происхождения внДНК, обнаруживаемой в крови пациентов с РА.

В связи с этим **целью настоящей работы** стало изучение зависимости уровня внДНК в плазме крови пациентов с РА от клинических показателей течения болезни и выявление возможной связи между активацией нейтрофильных лейкоцитов и уровнем внДНК.

Материалы и методы

Характеристика пациентов

В данную работу были включены 63 пациента с РА, находившиеся на стационарном лечении в ревматологическом отделении клиники иммунопатологии НИИФКИ (г. Новосибирск). Право на участие в исследовании подтверждалось письменным информированным согласием. Протокол обследования был одобрен локальным этическим комитетом.

Исследованная группа состояла из 54 женщин (85%) и 9 мужчин (15%) в возрасте от 22 до 83 лет (медиана – 55 лет). По степени активности заболевания исследуемые были разделены на три группы: 1 – с низкой активностью ($DAS-28 < 3,2$), 2 – с умеренной ($DAS-28$ – от 3,2 до 5,1) и 3 – с высокой активностью ($DAS-28 > 5,1$). В клиники иммунопатологии НИИФКИ у всех исследуемых было определено наличие ревматоидного фактора, антител к циклическому цитруллинсодержащему пептиду и уровень С-реактивного белка в сыворотке крови, что учитывалось при постановке диагноза РА и использовано в данном исследовании.

В исследование включены 28 образцов от условно здоровых доноров, набранных на Пункте забора донорской крови ГКБ № 1 г. Новосибирска.

Методы исследования

Выделение внеклеточной ДНК

Забор периферической крови для проведения анализа осуществлялся с помощью венозной пункции в вакуумную пробирку с антикоагулянтом (ЭДТА).

Плазму отделяли от форменных элементов центрифугированием при 400g в течение 20 мин [12]. Выделение внеклеточной ДНК из плазмы проводили на колонках компании «Био-Силика» (г. Новосибирск) согласно инструкции по применению «Набора для выделения ДНК из плазмы крови». Определение ДНК проводили с помощью флюоресцентного красителя PicoGreen (Invitrogen). Концентрация ДНК пересчитывалась по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций стандартной двуцепочечной λ ДНК.

Уровень метилирования ДНК был определен с помощью набора реагентов Methyl Flash Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric) (Epigentek, США) согласно протоколу производителя. В основе метода лежит колориметрическое иммуноферментное определение процентного содержания 5-метилцитозина в образце ДНК. Оптическая плотность образцов измерялась на спектрофотометре Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм.

Выделение нейтрофилов

Периферическую кровь у доноров и пациентов с ревматоидным артритом забирали в утренние часы натощак в пропиленовые пробирки с гепарином (20 МЕ/мл крови). Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования в двойном градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho = 1,077$ г/см³ и $\rho = 1,119$ г/см³) при 400 g 25 мин. Полученное кольцо нейтрофилов переносили в пробирки и трижды отмывали в 5 мл PBS, центрифугируя при 200 g 10 минут, а затем ресуспендировали в культуральной среде, включающей RPMI-1640 без фенолового красного с добавлением 1% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки. Нейтрофильные лейкоциты составляли более 98% во фракции выделенных клеток, а их жизнеспособность составляла 99%, что определялось тестом с трипановым синим.

Определение спонтанного и стимулированного нетоза нейтрофилов *in vitro*

Свежевыделенные нейтрофилы переносили в черный планшет в концентрации 2×10^5 клеток на лунку и часть из них стимулировали добавлением форболмиристат-ацетата (Sigma Aldrich, Франция) до концентрации 50 nM, с последующим культивированием при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 3 часов. Затем в лунки вносили 5 μ M Sytox Green (Invitrogen, США). Уровень флюоресценции регистрировали на ридере Tristar™ LB941 BERTHOLD (Германия): длина волны возбуждения – 485 нм и длина волны излучения – 527 нм [3].

Определение миелопероксидазы

Концентрацию миелопероксидазы в плазме крови больных определяли иммуноферментным

методом с помощью набора Human MPO ELISA kit (НускультБиотек, Нидерланды).

Ревматоидный фактор (суммарное определение субклассов IgA-, IgM- и IgG-аутоантител) определяли в лаборатории клинической иммунологии клиники иммунопатологии НИИФКИ на анализаторе специфических белков Immage 800 (Beckman Coulter).

Статистическая обработка

Результаты в таблице и на рисунке приведены в виде средних величин. Достоверность выявленных различий и величину связей между измеренными параметрами оценивали методами непараметрической статистики с использованием U-критерия Манна–Уитни, T-критерия Вилкоксона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Данные, полученные при проведении данного исследования, убедительно свидетельствуют о значительном увеличении содержания свободной внеклеточной ДНК в плазме крови пациентов с РА и о тесной связи этого параметра с активностью заболевания.

На рисунке 1 видно, что среднее содержание внДНК у пациентов, поступивших в клинику с диагнозом РА и рассматриваемых как единая группа, в несколько раз превосходит величину этого показателя в группе здоровых доноров (рис. 1А). Также показано, что такое увеличение количества внДНК в плазме крови связано со степенью активности патологического процесса у конкретных пациентов (рис. 1Б).

При этом в группе с наименьшей активностью заболевания (группа 1; среднее значение DAS-28 – 2,80) уровень внДНК был практически вдвое ниже, чем ее уровни в группах 2 (DAS-28 – 4,11) и 3 (DAS-28 – 5,85). О значимой положительной связи концентрации внДНК в плазме крови пациентов с РА со степенью активности патологического процесса, наблюдаемого у них в период исследования, говорят и статистически достоверные корреляции уровня внДНК с основными показателями, позволяющими оценивать активность заболевания в клинике: DAS-28 ($\rho = 0,319$; $p < 0,05$) и уровнем С-реактивного белка в сыворотке ($\rho = 0,270$; $p < 0,05$). Полученные результаты хорошо согласуются с данными, опубликованными другими авторами [7, 8, 11], о повышении

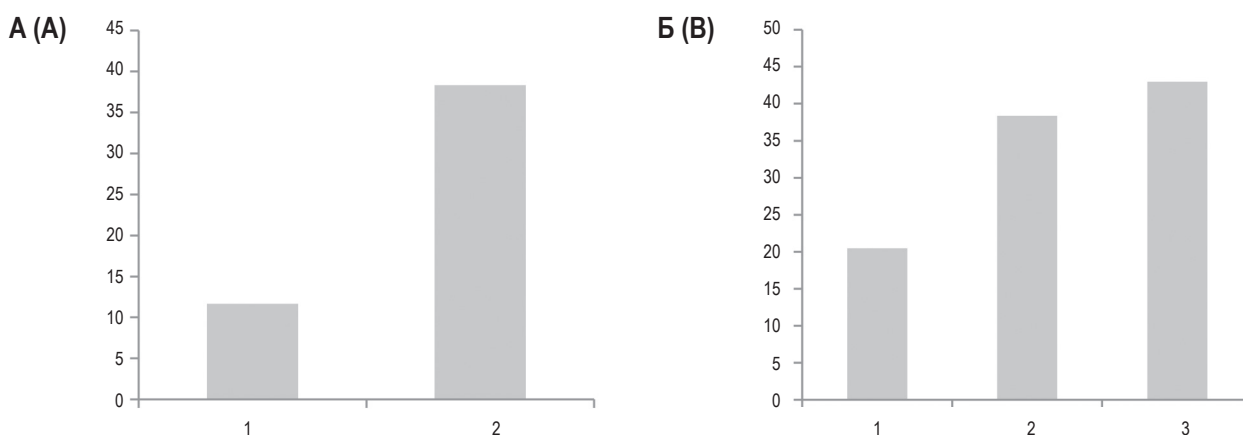


Рисунок 1. Концентрация внДНК в плазме крови условно здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом

Примечание. По оси ординат – уровень внеклеточной ДНК, нг/мл. По оси абсцисс – группы:

А: 1 – условно здоровые доноры (n = 18); 2 – группа пациентов с РА (n = 58).

Б – уровни внДНК у пациентов с РА в зависимости от степени активности патологического процесса: 1 – группа пациентов с низкой активностью (n = 9); 2 – с умеренной активностью (n = 26); 3 – с высокой активностью заболевания (n = 23).

*** – достоверное отличие от доноров ($p < 0,001$).

Figure 1. Concentration of cfDNA in the blood plasma of conditionally healthy donors and patients with rheumatoid arthritis

Note. The y-axis shows the level of extracellular DNA, ng/mL. On the abscissa axis – groups:

(A) 1, conditionally healthy donors (n = 18); 2, group of patients with RA (n = 58).

(B) levels of cfDNA in patients with RA depending on the degree of activity of the pathological process: 1, group of patients with low activity (n = 9); 2, with moderate activity (n = 26); 3, with high disease activity (n = 23).

***, significant difference from donors ($p < 0.001$).

уровня внДНК при РА и о связи этого показателя с клиническим течением болезни.

У части исследованных пациентов (24 человека) уровень внДНК был определен дважды: при поступлении в клинику и после курса назначенного лечения (как правило, введение ритуксимаба или тоцилизумаба, стероидных гормонов и вазоактивная терапия). Полученные при этом данные также свидетельствуют о существовании закономерной связи исследуемого параметра с клинической картиной заболевания. Исходно повышенный уровень внДНК в этой группе пациентов существенно снизился с 52,92 нг/мл до 36,56 нг/мл ($p < 0,05$) после курса специфической терапии. При этом наблюдалось и параллельное уменьшение степени активности патологического процесса, оцениваемой по величине DAS-28: после лечения этот показатель снизился с 4,44 до 4,01 ($p < 0,01$).

Немаловажное значение в нарастании количества внДНК при развитии заболевания может иметь обнаруженное у пациентов с РА увеличение доли ДНК митохондриального происхождения в общем пуле внДНК [11]. Будучи сходной с бактериальной ДНК, в частности по значительно более низкому, чем в ядерной ДНК уровню метилирования нуклеотидов [7, 10], эта фракция нуклеиновых кислот способна – через рецептор TLR9 – стимулировать интенсивность воспалительных реакций [13, 14]. Следовало ожидать, что развитие РА, будет сопровождаться снижением степени метилирования общего пула внДНК. Действительно, метилирование внДНК в исследу-

дованной группе пациентов с РА (17,5%) оказалось несколько ниже, чем у здоровых доноров (20,8%). После проведенного курса соответствующей терапии отмечена тенденция к повышению процентного содержания 5-метилцитозина в образцах ДНК у пациентов (21,7%). Увеличение выборки исследованных пациентов, возможно, позволит достоверно подтвердить наличие нарушения эпигенетических механизмов, наблюдаемых при аутоиммунных заболеваниях, в частности при РА.

Существенным результатом проведенного исследования можно считать выявление связи между уровнем внДНК и концентрацией миелопероксидазы в крови пациентов с РА. У исследованных пациентов с РА среднее содержание этого характерного для нейтрофильных лейкоцитов фермента составляло 22,8 нг/мл, что значительно превышало величину данного показателя у здоровых доноров – 9,7 нг/мл ($p < 0,05$). При этом возрастание концентрации миелопероксидазы в крови пациентов с РА обнаруживалось параллельно увеличению у них уровня внДНК, и коэффициент ранговой корреляции (ρ) между этими параметрами был равен 0,412 ($p < 0,05$). Поскольку наличие миелопероксидазы – специфический признак нейтрофилов, ее появление в крови расценивается обычно как показатель активации и нетоза с выходом цитоплазматических белков во внеклеточную среду [5]. Таким образом, исходя из полученных нами данных, можно предполагать, что увеличение концентрации внДНК у пациентов с РА в значительной степени обусловлено

ТАБЛИЦА 1. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ИНТЕНСИВНОСТЬ НЕТОЗА ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ (РА) И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

TABLE 1. FLUORESCENT INTENSITY OF NETOSIS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS (RA) AND HEALTHY DONORS

Параметры Parameters	Здоровые доноры Healthy donors	Пациенты с РА Patients with RA	p-значения p-value
Нетоз спонтанный Spontaneous netosis	1344549	1388928	$p < 0,05$
Нетоз при стимуляции Netosis on stimulation	1825981	2633243	$p < 0,001$
Индекс стимуляции Stimulation Index	1,30	2,06	$p < 0,001$

Примечание. Интенсивность нетоза представлена в условных единицах (интенсивность флуоресценции красителя) и отражает относительное количество ДНК нейтрофильных лейкоцитов, перешедшее в раствор после трехчасовой инкубации *in vitro*.

Note. The intensity of netosis is presented in conventional units (dye fluorescence intensity) and reflect the relative amount of neutrophils DNA that passed into solution after a three-hour incubation *in vitro*.

нетозом нейтрофилов и появлением их ДНК во внеклеточном пространстве, а следовательно, изменения этого параметра могут рассматриваться и в качестве косвенного признака вовлеченности нейтрофильных лейкоцитов в иммунопатологический процесс. В пользу такого предположения свидетельствуют и данные Birkelund и соавт. [4], убедительно обосновывающие нейтрофильное происхождение внДНК в синовиальной жидкости пораженных суставов у пациентов с РА.

Одной из задач данной работы было определение функционального состояния нейтрофильных лейкоцитов из крови больных РА и их готовность к реакции нетоза с появлением нитей ДНК во внеклеточном пространстве, так называемой, нейтрофильной ДНК (внДНКн). Результаты этого исследования приведены в таблице 1.

Видно, что интенсивность спонтанного (без каких-либо внешних воздействий) нетоза нейтрофилов, выделенных из крови пациентов с РА, лишь не намного (но статистически достоверно) превышает аналогичный показатель у здоровых лиц. В то же время на стимуляцию клеток РМА нейтрофилы пациентов с РА отвечают значительно более выраженной реакцией, нежели лейкоциты доноров, что отчетливо видно при сравнении индексов стимуляции в этих группах испытуемых. Можно считать, что нейтрофильные лейкоциты пациентов с РА находятся в примированном состоянии, потенцирующем ответ этих клеток на сигналы, вызывающие запуск реакции нетоза. Такое утверждение об особом активированном состоянии нейтрофилов при РА не вызывает удивления, поскольку издавна полиморфноядерные нейтрофильные лейкоциты считаются клетками, играющими ключевые роли в развитии воспалительного поражения суставов при этом заболевании. В литературе достаточно работ, в которых описана активация лейкоцитов у пациентов с РА, приводящая к усилению их нетоза в условиях *in vitro* [6, 9].

Следует обратить внимание на то обстоятельство, что у исследованных пациентов не было обнаружено какой-либо значимой корреляции между показателями спонтанного и стимулированного нетоза *in vitro*, с одной стороны, и концентрацией внДНК в крови, с другой. На первый взгляд, этот результат ставит под сомнение ранее высказанное утверждение о существенной роли нетоза нейтрофилов в резком увеличении уровня внДНК у таких пациентов. Видимую противоречивость полученных результатов нетрудно объяснить, если принять во внимание тот факт, что выявленная примированность нейтрофилов из периферической крови представляет собой системный показатель и отражает общее состояние нейтрофильных лейкоцитов при данной пато-

логии, в то время как на уровень внДНК может влиять лишь интенсивность нетоза в конкретных участках воспаления пораженных суставов. В тех же случаях, когда уровень внДНК и интенсивность нетоза определялись непосредственно на месте (в синовиальной жидкости воспаленных суставов) тесная корреляция между этими параметрами выявлялась вполне отчетливо [4].

В относительно недавней работе Aleyd и соавт. [2] было показано, что субкласс IgA-аутоантител, входящий в состав ревматоидного фактора (РФ), способен фиксироваться на поверхности нейтрофильных лейкоцитов, вызывая их нетоз и, соответственно, выход ДНК за пределы клеточной мембраны. Исходя из этого, можно было бы ожидать, что у больных РА должна выявляться некоторая связь между содержанием РФ в крови и показателями активации нейтрофилов. В проведенном нами исследовании корреляция между общим ревматоидным фактором в сыворотке крови больных и спонтанным нетозом их нейтрофилов *in vitro* оказалась незначительна ($\rho = 0,217$; $p > 0,05$). При дополнительном сравнении интенсивности нетоза *in vitro* в группах пациентов с низким (< 20 МЕ) и высоким (> 20 МЕ) содержанием РФ в крови обнаружено, что при высоком уровне РФ нетоз оказался более интенсивным нежели в оппозитной группе больных (1494256 vs 1206158), но это различие не достигало уровня статистической достоверности ($p = 0,09$). Однако полученные результаты нельзя считать противоречащим факту, установленному в работе Aleyd и соавт. Расхождения легко объяснимы тем, что функционально активный субкласс IgA-аутоантител, составляет лишь часть в общей величине РФ, и, вероятно, вследствие этого, в нашем исследовании связь между общим уровнем РФ, суммарным определением субклассов IgA-, IgM- и IgG-аутоантител, и нетозом нейтрофилов оказывается размытой.

Заключение

Согласно полученным в настоящем исследовании данным, уровень внДНК в плазме крови больных РА способен служить относительно независимым показателем степени активности патологического процесса при этом заболевании. В связи с этим можно говорить о перспективности анализа данного параметра в качестве дополнительного критерия оценки при комплексной диагностики патогенеза РА и эффективности подбора проводимой терапии. В то же время зависимость внДНК от степени активации и интенсивности нетоза нейтрофильных лейкоцитов еще не до конца выяснена и требует дальнейшего изучения.

Список литературы / References

1. Козлов В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 5. С. 399-412. [Kozlov V.A. Free extracellular DNA in normal state and under pathological conditions. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 5, pp. 399-412. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-5-399-412.
2. Aleyd E., Al M., Tuk C.W., van der Laken C.J., van Egmond M. IgA complexes in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis induce neutrophil extracellular traps via FcαR1RA. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 197, no. 12, pp. 4552-4559.
3. Barrientos L., Marin-Esteban V., Chaisemartin L., Lievin Le-Moal V., Sandre C., Bianchini E., Nicolas V., Pallardy M., Chollet-Martin S. An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 166. doi: 10.3389/fimmu.2013.00166.
4. Birkelund S., Bennike T.B., Kastaniegaard K., Lausen M., Poulsen T.B.G., Kragstrup T.W., Deleuran B.W., Christiansen G., Stensballe A. Proteomic analysis of synovial fluid from rheumatic arthritis and spondyloarthritis patients. *Clin. Proteom.*, 2020, Vol. 17, 29. doi: 10.1186/s12014-020-09292-9.
5. Chornenki N.L.J., Coke R., Kwong A.C., Dwivedi D.J., Xu M.K., McDonald E., Marshall J.C., Fox-Robichaud A.E., Charbonney E., Liaw P.C. Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intensive Care Med. Exp.*, 2019, Vol. 7, no. 1, pp. 29-38.
6. Chowdhury C.S., Giaglis S., Walker U.A., Buser A., Hahn S., Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res. Ther.*, 2014, Vol. 16, no. 3, R122. doi: 10.1186/ar4579.
7. Duvvuri B., Lood C. Cell-free DNA as a biomarker in autoimmune rheumatic diseases. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 502. doi: 10.3389/fimmu.2019.00502.
8. Hashimoto T., Yoshida K., Hashiramoto A., Matsui K. Cell-free DNA in rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 16, 8941. doi: 10.3390/ijms22168941.
9. Perez-Sanchez C., Ruiz-Limon P., Aguirre M.A., Jimenez-Gomez Y., Arias-de la Rosa I., Abalos-Aguilera M.C., Rodriguez-Ariza A., Castro-Villegas M.C., Ortega-Castro R., Segui P., Martinez C., Gonzalez-Conejero R., Rodriguez-Lopez S., Gonzalez-Reyes J.A., Villalba J.M., Collantes-Estevez E., Escudero A., Barbarroja N., Lopez-Pedraza Ch. Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. *J. Autoimmun.*, 2017, Vol. 82, no. 1, pp. 31-40.
10. Pollack Y., Kasir J., Shemer R., Metzger S., Szyf M. Methylation pattern of mouse mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1984, Vol. 12, no. 12, pp. 4811-4824.
11. Rykova E., Sizikov A., Roggenbuck D., Antonenko O., Bryzgalov L., Morozkin E., Skortsova K., Vlassov V., Laktionov P., Kozlov V. Circulating DNA in rheumatoid arthritis: pathological changes and association with clinically used serological markers. *Arthritis Res. Ther.*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 85-94.
12. Tamkovich S.N., Litviakov N.V., Bryzgunova O.E., Dobrodeev A.Y., Rykova E.Y., Tuzikov S.A., Zav'ialov A.A., Vlassov V.V., Cherdyn'tseva N.V., Laktionov P.P. Cell-surface-bound circulating DNA as a prognostic factor in lung cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, Vol. 1137, no. 1, pp. 214-217.
13. West A.P., Shadel G.S. Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 6, pp. 363-375.
14. Zhang Q., Raoof M., Chen Y., Sumi Y., Sursal T., Junger W., Brohi K., Itagaki K., Hauser C.J. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 2010, Vol. 464, no. 7285, pp. 104-107.

Авторы:

Гаврилова Е.Д. — к.б.н., заведующая лабораторией экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Демченко Е.Н. — к.х.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Гойман Е.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Gavrilova E.D., PhD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Demchenko E.N., PhD (Chemistry), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Goiman E.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Чумасова О.А. — к.м.н., врач-ревматолог, ревматологическое отделение, клиника иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Вольский Н.Н. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сизиков А.Э. — к.м.н., заведующий ревматологическим отделением, клиника иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Chumasova O.A., PhD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Department of Rheumatology, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Volskiy N.N., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sizikov A.E., PhD (Medicine), Head, Department of Rheumatology, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Scientific Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 13.05.2022
Принята к печати 28.05.2022

Received 13.05.2022
Accepted 28.05.2022

ЭНДОГЕННЫЙ РЕТРОВИРУС ЧЕЛОВЕКА HERV-E λ 4-1 В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ АФФЕКТИВНОГО РАССТРОЙСТВА

Гольдина И.А.¹, Гольдин Б.Г.², Маркова Е.В.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² ФГБОУ «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. Целью настоящей работы было исследование зависимости уровня продукции ряда провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками крови больных рекуррентной депрессией от активации в них эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1.

В исследование были включены 30 больных с установленным диагнозом рекуррентной депрессии (F 33,0) в возрасте 26-45 лет, с длительностью заболевания на момент включения в исследование не менее 3 месяцев. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли при помощи центрифугирования на градиенте плотности фикола 1,078 г/см³. Экспрессию гена *env* эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1 определяли методом полимеразной цепной реакции, с использованием пар олигонуклеотидных праймеров. Для оценки продукции цитокинов мононуклеарные клетки крови культивировали в течение 24-72 часов, в зависимости от условий эксперимента. Количественное определение спонтанной продукции цитокинов проводилось «сэндвич»-вариантом метода твердофазного иммуоферментного анализа в кондиционных средах клеточных культур, согласно инструкции производителя тест-системы. Полученные нами данные свидетельствуют о более высокой продукции IL-1β и IFNγ мононуклеарными клетками крови больных рекуррентной депрессией, у которых была выявлена экспрессия гена *env* HERV-E λ 4-1, по сравнению с больными, у которых экспрессии гена *env* HERV-E λ 4-1 обнаружено не было. При изучении корреляционной зависимости экспрессии гена *env* HERV-E λ 4-1 и продукции IL-1β и IFNγ была установлена положительная корреляция между исследуемыми параметрами. Таким образом, учитывая полученные нами ранее данные о иммуномодулирующих свойствах эндогенного ретровируса HERV-E λ 4-1, транскрипты которого, согласно данным литературы, были идентифицированы в головном мозге больных психическими заболеваниями, а также повышение продукции IL-1β и IFNγ у больных рекуррентной депрессией с выявленной экспрессией гена *env* HERV-E λ 4-1, наличие положительной корреляции между экспрессией гена *env* HERV-E λ 4-1 и повышением уровня цитокинов, вовлеченных в формирование патологического процесса в нервной системе при депрессии, можно заключить, что одним из механизмов иммунопатогенеза рекуррентной депрессии является активация HERV-E λ 4-1, стимулирующего синтез провоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: эндогенный ретровирус, экспрессия, мононуклеарные клетки крови, рекуррентное депрессивное расстройство, иммунопатогенез, цитокины

Адрес для переписки:

Гольдина Ирина Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, Ядринцевская ул., 14.
Тел.: 8 (905) 936-88-80.
E-mail: igoldina@mail.ru

Address for correspondence:

Goldina Irina A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (905) 936-88-80.
E-mail: igoldina@mail.ru

Образец цитирования:

И.А. Гольдина, Б.Г. Гольдин, Е.В. Маркова
«Эндогенный ретровирус человека HERV-E λ 4-1
в иммунопатогенезе аффективного расстройства» //
Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 2. С. 155-160. doi: 10.46235/1028-7221-1130-HER
© Гольдина И.А. и соавт., 2022

For citation:

I.A. Goldina, B.G. Goldin, E.V. Markova "Human endogenous
retrovirus HERV-E λ 4-1 in immunopathogenesis of affective
disorder", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 155-160.
doi: 10.46235/1028-7221-1130-HER
DOI: 10.46235/1028-7221-1130-HER

HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUS HERV-E λ 4-1 IN IMMUNOPATHOGENESIS OF AFFECTIVE DISORDER

Goldina I.A.^a, Goldin B.G.^b, Markova E.V.^a

^a Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The aim of this work was to study a dependence between the production level of some pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells, and activation of human endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1 in the patients with recurrent depression. Patients and methods: the study included 30 patients with an verified diagnosis of recurrent depression (F 33.0) aged 26-45 years, with a disease duration of at least 3 months prior to inclusion into the study. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by centrifugation in Ficoll density gradient (1.078 g/cm³). The human endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1 *env* gene expression was determined by polymerase chain reaction using paired oligonucleotide primers. To assess the cytokine production, peripheral blood mononuclear cells were cultured for 24-72 hours, depending on the experimental conditions. Quantitative determination of spontaneous cytokine production was carried out by a “sandwich” variant of ELISA method in conditioned media from the cell cultures, according to the manufacturer instructions. Results: our data reveal higher production of IL-1 β and IFN γ in peripheral blood mononuclear cells from those patients with recurrent depression who showed detectable HERV-E λ 4-1 *env* expression compared to the patients in whom the HERV-E λ 4-1 *env* gene expression was not detected. When studying correlation between HERV-E λ 4-1 *env* expression and production of IL-1 β and IFN γ , a positive correlation between the studied parameters was established. Thus, taking into account our earlier data on HERV-E λ 4-1 immunomodulatory properties, as well as literature data concerning the HERV transcripts found in brains of mentally ill patients, along with increase of IL-1 β and IFN γ production in the patients with recurrent depression and positive HERV-E λ 4-1 *env* gene expression, and a positive correlation between the HERV-E λ 4-1 *env* gene expression and increased level of cytokines involved in formation of pathological events in the nervous system in the patients with depression, one may conclude that activation of HERV-E λ 4-1 could participate in immunopathogenesis of recurrent depression by stimulating the synthesis of pro-inflammatory cytokines.

Keywords: endogenous retrovirus, expression, blood mononuclear cells, recurrent depressive disorder, immunopathogenesis, cytokines

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований по теме «Обоснование и разработка новых технологий иммуномодуляции, стимуляции репаративных процессов и коррекции поведенческих и аддиктивных расстройств на основе использования миелоидных, лимфоидных и стволовых клеток и/или продуктов их секреторма» № 122011800324-4 (2021-2023).

Введение

Разработка валидных диагностических критериев психических расстройств, основанных на выявлении нейробиологических маркеров ключевых аспектов патогенеза данных заболеваний является актуальной задачей современной медицины. Несмотря на значительное количество исследований в этой области, в настоящее время диагностика психических расстройств основывается преимущественно на феноменологических параметрах.

Наличие реципрокных взаимоотношений между нервной и иммунной системами, изменения в функционировании иммунной системы, вовлеченные в этиологию, патопсихологию и патогенез ряда психических расстройств, а также высокая степень их коморбидности с аутоиммунными, инфекционными и хроническими воспалительными заболеваниями подтверждает наличие общих для данных патологических процессов механизмов формирования патологического процесса в нервной системе [1, 5, 7, 8].

Рекуррентное депрессивное расстройство (РДР) является широко распространенным в настоящее время психическим заболеванием, связанным с нарушением функционирования в широком диапазоне сфер жизнедеятельности человека [12]. Этиология РДР сложна и обусловлена как генетическими, эпигенетическими факторами, так и факторами окружающей среды.

Несмотря на убедительные доказательства наследуемости РДР, расшифровка генетической архитектуры предрасположенности и идентифика-

ция специфических «генов уязвимости» привела к критическому пониманию того, что генетическая основа ее полигенна и является результатом аддитивного эффекта многих генетических вариантов с небольшой величиной эффекта каждого [15]. Патогенез РДР до конца не изучен, хотя моноаминергическая теория депрессии в настоящее время считается общепринятой. Кроме того, дисрегуляция гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, дисфункция гиппокампа и лобных долей вследствие нейродегенерации [11], а также нейротоксические, воспалительные и иммунопатологические процессы вовлечены в патогенез РДР [4, 10]. Многие психологические гипотезы также пытаются объяснить причины депрессии (например, гипотеза «выученной беспомощности» [14]).

Таким образом, в настоящее время преобладает представление о РДР как о заболевании с полигенным фенотипом. Причем в последние годы наблюдается сдвиг парадигмы в сторону исследования эпигенетических механизмов развития депрессии.

Эндогенные ретровирусы (ЭР), относящиеся к классу мобильных элементов генома и представляющих собой провирусную форму экзогенных ретровирусов, постоянно присутствуют в геноме человека. Для обеспечения стабильности и целостности генома экспрессия ЭР обычно подавляется эпигенетическими механизмами регуляции экспрессии генов – метилированием ДНК и модификациями гистонов. Однако если механизм эпигенетического контроля нарушается, ЭР активируются и становятся транскрипционно активными [2, 9]. Было показано, что различные воспалительные процессы, воздействие γ -интерферона индуцируют экспрессию ЭР, а протеины некоторых ЭР обладают провоспалительными и иммуномодулирующими свойствами [5, 6]. Аберрантная эпигенетическая регуляция и экспрессия мобильных элементов генома рассматривается как потенциальный механизм, лежащий в основе развития различных нейроиммунных и психических расстройств, включая рассеянный склероз, расстройства аутистического спектра, шизофрению, депрессию [3, 13].

Учитывая данные о том, что в патогенез РДР, наряду с гипометилированием ДНК, вовлечено хроническое низкоградиентное воспаление, мы предположили, что аберрантная эпигенетическая регуляция активности ЭР HERV-E λ 4-1 играет важную роль в иммунопатогенезе РДР.

Целью настоящей работы было исследование зависимости уровня продукции ряда провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками крови больных рекуррентной депрессией от

активации в них эндогенного ретровируса человека HERV-E λ 4-1.

Материалы и методы

В исследование были включены 30 больных (11 мужчин и 19 женщин) с установленным диагнозом аффективного расстройства в виде РДР (F 33,0) в возрасте 26-45 лет, с длительностью заболевания на момент включения в исследование не менее 3 месяцев, а также 30 условно здоровых доноров. Группы были рандомизированы по полу и возрасту. Протокол исследования был разработан в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и «Правилами надлежащей клинической практики», утвержденными Приказом МЗ РФ № 200н от 01.04.2016 г. Выраженность симптоматики аффективных нарушений определяли по шкалам депрессии М. Гамильтона и А.Т. Бека, а также при проведении клинического интервью. Диагноз депрессии был установлен на основании клинических критериев МКБ-10.

Критерии включения: установленный диагноз РДР; отсутствие тяжелой сопутствующей соматической патологии.

Критерии исключения: одновременное участие в другом клиническом исследовании; несоответствие критериям включения; декомпенсированная недостаточность сердечно-сосудистой, дыхательной, гепатобилиарной, мочевыводящей, эндокринной систем; коморбидные аутоиммунные и онкологические заболевания; другие психические и поведенческие расстройства; период беременности, родов и лактации; предшествующая терапия иммуномодулирующими и иммуносупрессорными препаратами в течение 12 недель до начала исследования.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК) выделяли при помощи центрифугирования гепаринизированной венозной крови на градиенте плотности фиколла 1,078 г/см³ (Lymphocyte separation medium, MP Biomedicals, LLC, Эшwege, Германия). Клетки, собранные из интерфазы, трехкратно отмывали, ресуспендировали в полной культуральной среде и подсчитывали их общее количество общепринятым методом в камере Горяева. Экспрессию гена *env* ЭР человека HERV-E λ 4-1 определяли в МНК методом полимеразной цепной реакции, с использованием пар олигонуклеотидных праймеров. Положительными считали образцы с наличием в геле полосы кДНК, соответствующей ожидаемому размеру ампликона. Полученный сегмент ДНК соответствующего размера выявляли

ТАБЛИЦА 1. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ РЕКУРРЕНТНОЙ ДЕПРЕССИЕЙ ПРИ АКТИВАЦИИ ЭНДОГЕННОГО РЕТРОВИРУСА HERV-E λ 4-1, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. RECURRENT DEPRESSION PATIENT'S BLOOD MONONUCLEAR CELLS CYTOKINES PRODUCTION UPON ACTIVATION OF HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUS HERV-E λ 4-1, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Исследуемый параметр, пг/мл Parameter under study, pg/mL	Больные с положительной экспрессией гена <i>env</i> HERV-E λ 4-1 Patients with positive expression of HERV-E λ 4-1 <i>env</i> gene	Больные, не экспрессирующие ген <i>env</i> HERV-E λ 4-1 Patients with negative expression of HERV-E λ 4-1 <i>env</i> gene	Референсные значения, пг/мл Reference values, pg/mL
IL-1β	9, 2 (8,0-11,3)*	6,1 (4,5-7,9)	0,0-5,0
TNFα	8,3 (6,7-9,4)	7,9 (6,7-9,0)	0,0-8,1
IL-6	6570 (5503-7254)	3340 (2750-5420)	1,5-5000,0
IFNγ	62,0 (55,2-74,3)*	49,4 (37,1-56,3)	0,0-50,0

Примечание. * – $p < 0,05$ (U-критерий Манна–Уитни).

Note. *, $p < 0.05$ (Mann–Whitney U test).

с использованием программы Image Master VDS (Software, США).

Для оценки продукции цитокинов МНК культивировали в среде RPMI-1640 (ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская обл., п. Кольцово), содержащей 5% инактивированной сыворотки крови человека АВ (IV) (Новосибирский центр крови), 10 мМ Hepes (ICN Biomedicals Inc., Орора, Огайо, США), 4×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола (L.Oba Feinchemie, Фишаменд, Австрия), 2 Мм L-глутамин (ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская обл., п. Кольцово), 40 мкг/мл гентамицин (ФГУП НПО «Вирион») в течение 24-72 часов, в зависимости от условий эксперимента. Количественное определение спонтанной продукции цитокинов *in vitro* проводилось «сэндвич»-вариантом метода твердофазного иммуноферментного анализа в кондиционных средах клеточных культур. В качестве индикаторного фермента использовалась пероксидаза хрена. Определение IL-1β, TNFα, и IL-6 проводили с использованием тест-системы фирмы «Протеиновый контур» (ГНЦ НИИ ОЧБ, Санкт-Петербург), изучение уровня продукции IFNγ проводили с использованием коммерческих тест-систем фирмы «Цитокин» (Санкт-Петербург), согласно прилагаемой инструкции, на иммуноферментном анализаторе «Мульти-скан» (TITERTEK, Финляндия) при длине волны 450 нм.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ STATISTICA v. 10.0 (StatSoft, США). Для оценки статистической значимости различий применялся двусторонний вариант точного критерия

Фишера и U-критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Больные РДР характеризовались нарушением настроения, преимущественно в сторону угнетения, изменение настроения сопровождалось снижением общего уровня эмоциональной и физической активности, имело тенденцию к повторяемости. Начало отдельных эпизодов подавленного настроения в ряде случаев было связано со стрессовыми ситуациями и событиями. В структуре РДР преобладала депрессия средней степени тяжести (70%) и тяжелая (23,3%), тогда как депрессия легкой степени наблюдалась лишь в 6,7% исследованных случаев.

При исследовании экспрессии гена *env* ЭР HERV-E λ 4-1 у этих больных было установлено, что данный параметр определяется у 40% (12/30) больных и 3,3% (1/30) доноров ($p < 0,05$, двухсторонний вариант точного критерия Фишера), что согласуется с полученными нами ранее данными.

Результаты, полученные при изучении продукции цитокинов МНК больных РДР, с наличием экспрессии гена *env* HERV-E λ 4-1, или без таковой, представлены в таблице 1.

Полученные данные свидетельствуют о более высокой продукции IL-1β и IFNγ мононуклеарными клетками крови больных РДР, у которых была выявлена экспрессия ЭР HERV-E λ 4-1, по сравнению с больными, у которых экспрессии ЭР HERV-E λ 4-1 обнаружено не было. При изучении корреляционной зависимости экспрессии *env* HERV-E λ 4-1 и продукции IL-1β и IFNγ была установлена положительная корреляционная зависимость между исследуемыми параметрами

(коэффициент ранговой корреляции Спирмена $r = 0,74$).

Таким образом, учитывая полученные нами ранее данные об иммуномодулирующих свойствах ЭР HERV-E λ 4-1, транскрипты которого, согласно данным литературы, были идентифицированы в головном мозге больных психическими заболеваниями, а также повышение продукции ИЛ-1 β и IFN γ у больных РДР с выявленной экспрессией ЭР HERV-E λ 4-1 и наличие положительной корреляции между экспрессией HERV-E λ 4-1 и повышением уровня цитокинов, вовлеченных в формирование патологического процесса в нервной системе при депрессии, установленное в данном исследовании, можно заключить, что одним из механизмов иммунопатогенеза РДР является активация ЭР HERV-E λ 4-1, стимулирующего синтез провоспалительных цитокинов.

Заключение

Так как одним из механизмов реализации биологических эффектов ЭР HERV-E λ 4-1 является выработка протеинов, обладающих иммуностропными свойствами, ассоциация экспрессии данного ретровируса с течением РДР может быть отчасти ответственна за поддержание провоспалительного статуса при этой патологии. Полученные данные обуславливают актуальность дальнейших исследований роли ЭР HERV-E λ 4-1 в патогенезе депрессии, с целью выявления возможных диагностических маркеров на основе детекции активации данного ретровируса и разработки новых патогенетически обоснованных стратегий медикаментозной коррекции данного заболевания.

Список литературы / References

1. Гольдин Б.Г., Гольдина И.А. Цитокины в этиологии и патогенезе депрессии // Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке», 2017. Т. 19, № 11. С. 17-25. [Goldin B.G., Goldina I.A. Cytokines in etiology and pathogenesis of depression. *Elektronnyy nauchno-obrazovatelnyy vestnik "Zdorovye i obrazovanie v XXI veke" = Electronic Scientific and Educational Bulletin "Health and Education in the XXI Century"*, 2017, Vol. 19, no. 11, pp. 17-25. (In Russ.)]
2. Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Козлов В.А. УФО-индуцированная экспрессия эндогенного ретровируса человека HERV-E 4-1 в мононуклеарных клетках крови // Бюллетень сибирской медицины, 2018. Т. 17, № 1. С. 36-44. [Goldina I.A., Gaidul K.V., Kozlov V.A. UVI-induced expression of human endogenous retrovirus HERV-E 4-1 in blood mononuclear cells. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2018, Vol. 17, no. 1, pp. 36-44. (In Russ.)]
3. Гольдина И.А., Гольдин Б.Г. Экспрессия гена ENVELOPE эндогенного ретровируса человека HERV – E λ 4 – 1 при аффективных расстройствах // Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке», 2016. Т. 18, № 11. С. 49-54. [Goldina I.A., Goldin B.G. Human endogenous retrovirus HERV – E λ 4 – 1 ENVELOPE gene expression at affective disorders. *Elektronnyy nauchno-obrazovatelnyy vestnik "Zdorovye i obrazovanie v XXI veke" = Electronic Scientific and Educational Bulletin "Health and Education in the XXI Century"*, 2016, Vol. 18, no. 11, pp. 49-54. (In Russ.)]
4. Гольдина И.А., Гольдин Б.Г., Маркова Е.В., Козлов В.А. Параметры цитокинового статуса у больных рассеянным склерозом с коморбидным депрессивным расстройством // Сибирский вестник психиатрии и наркологии, 2020. № 1 (106). С. 5-13. [Goldina I.A., Goldin B.G., Markova E.V., Kozlov V.A. Parameters of cytokine status at multiple sclerosis patients with comorbid depressive disorder. *Sibirskiy vestnik psikiatrii i narkologii = Siberian Bulletin of Psychiatry and Narcology*, 2020, no. 1 (106), pp. 5-13. (In Russ.)]
5. Гольдина И.А., Маркова Е.В. Влияние эндогенного ретровируса HERV-E λ 4-1 на функциональную активность клеток иммунной системы у больных рассеянным склерозом // Якутский медицинский журнал, 2019. № 4 (68). С. 32-34. [Goldina I.A., Markova E.V. Influence of human endogenous retrovirus HERV-E λ 4-1 on the functional activity of immune system cells at multiple sclerosis patients. *Yakutskiy meditsinskiy zhurnal = Yakut Medical Journal*, 2019, no. 4 (68), pp. 32-34. (In Russ.)]
6. Гольдина И.А., Сафронова И.В., Гайдуль К.В. Иммуностропные свойства эндогенного ретровируса HERV – E λ 4 – 1 // Российский иммунологический журнал, 2013. Т. 7, № 16. С. 231. [Goldina I.A., Safronova I.V., Gaidul K.V. Immunotropic properties of human endogenous retrovirus HERV – E λ 4 – 1. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7, no. 16, p. 231. (In Russ.)]
7. Маркова Е.В. Иммунокомпетентные клетки и регуляция поведенческих реакций в норме и патологии. Красноярск: Научно-инновационный центр, 2021. 184 с. [Markova E.V. Immune cells and regulation of behavioral reactions in health and disease]. Krasnoyarsk: Scientific and Innovation Center, 2021. 184 p.
8. Beurel E., Toups M., Nemeroff C.B. The bidirectional relationship of depression and inflammation: double trouble. *Neuron*, 2020, Vol. 107, no. 2, pp. 234-256.
9. Geis F.K., Goff S.P. Silencing and transcriptional regulation of endogenous retroviruses: an overview. *Viruses*, 2020, Vol. 12, no. 8, 884. doi: 10.3390/v12080884.

10. Idova G.V., Markova E.V., Gevorgyan M.M., Alperina E.L., Zhanaeva S.Y. Cytokine production by splenic cells in C57Bl/6J mice with depression-like behaviour depends on the duration of social stress. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2018, Vol. 164, no. 5, pp. 645-649.
11. Maes M., Yirmiya R., Noraberg J., Brene S., Hibbeln J., Perini G., Kubera M., Bob P., Lerer B., Maj M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab. Brain Dis.*, 2009, Vol. 24, no. 1, pp. 27-53.
12. Maske U.E., Buttery A.K., Beesdo-Baum K., Riedel-Heller S., Hapke U., Busch M.A. Prevalence and correlates of DSM-IV-TR Major Depressive Disorder, self-reported diagnosed depression and current depressive symptoms among adults in Germany. *J. Affect. Disord.*, 2016, Vol. 190, pp. 167-177.
13. Misiak B., Ricceri L., Sasiadek M.M. Transposable elements and their epigenetic regulation in mental disorders: current evidence in the field. *Front. Genet.*, 2019, Vol. 10, 580. doi: 10.3389/fgene.2019.00580.
14. Nelemans S.A., Boks M., Lin B., Oldehinkel T., van Lier P., Branje S., Meeus W. Polygenic risk for major depression interacts with parental criticism in predicting adolescent depressive symptom development. *J. Youth. Adolesc.*, 2021, Vol. 50, no. 1, pp. 159-176.
15. van Assche E., Moons T., Cinar O., Viechtbauer W., Oldehinkel A.J., van Leeuwen K., Verschueren K., Colpin H., Lambrechts D., van den Noortgate W., Goossens L., Claes S., van Winkel R. Gene-based interaction analysis shows GABAergic genes interacting with parenting in adolescent depressive symptoms. *J. Child. Psychol. Psychiatry*, 2017, Vol. 58, no. 12, pp. 1301-1309.

Авторы:

Гольдина И.А. — научный сотрудник лаборатории нейробиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Гольдин Б.Г. — к.м.н., доцент кафедры психиатрии, наркологии, психотерапии и клинической психологии ФГБОУ «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Маркова Е.В. — д.м.н., главный научный сотрудник и заведующая лабораторией нейробиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Goldina I.A., Research Associate, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Goldin B.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Psychiatry, Narcology, Psychotherapy and Clinical Psychology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Markova E.V., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 14.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 14.05.2022
Accepted 29.05.2022

ИССЛЕДОВАНИЕ НАРУШЕНИЯ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19

Добрынина М.А.¹, Зурочка А.В.^{1,2}, Комелькова М.В.^{1,2}, Ло Ш.³

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

² ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», г. Челябинск, Россия

³ Институт гематологии, Госпиталь Юнион, Медицинский колледж Тунизи, Хуачжунский университет науки и технологий, г. Ухань, Китай

Резюме. На сегодняшний день диагностике состояния иммунной системы у пациентов с постковидным синдромом уделяется недостаточно внимания. Влияние вируса SARS-CoV-2 на различные системы организма, в том числе и иммунную, могут способствовать развитию нарушений, приводящих к патологическим процессам. В то же время пациенты, страдающие от осложнений COVID-19, включая госпитализацию и изоляцию от членов своей семьи, испытывают сильный психологический и социальный стресс. Практически в каждом четвертом случае это приводит к развитию постковидного синдрома.

Целью исследования явилось изучить уровень NK-клеток, уровня кортизола и особенностей нарушений иммунной системы у пациентов, перенесших SARS-CoV-2 инфекцию.

Обследовано 78 пациентов через 6 месяцев после перенесенного COVID-19; изучено 25 параметров системы крови (общий анализ крови), 50 параметров иммунной системы, включая Т-лимфоциты, В-лимфоциты и их функциональные маркеры, NK, TNK-клетки, фагоцитарное звено иммунной системы, и гуморальные факторы, включая общие и специфические иммуноглобулины и фрагменты комплемента.

Наши исследования показали резкое, трехкратное снижение количества натуральных киллеров более чем у трети обследованных лиц. Это снижение сопровождается более высоким относительным уровнем Т-лимфоцитов и Т-хелперов, последнее, вероятно, связано с компенсаторным повышением Т-лимфоцитов и нарушением регуляции Т-клеточного звена иммунной системы, что требует более детального исследования и скорее всего изучения цитокинового профиля у таких пациентов. Более того, у части постковидных пациентов сохраняется высокий уровень кортизола, что свидетельствует о сохранении уровня напряженности хронического стресса. Также важным является выявленные изменения в тромбоцитарном звене кроветворения (повышение уровня тромбоцитов и тромбоцитокрита), которые могут приводить к поздним нарушениям системы свертывания крови и образования тромбозов.

Ключевые слова: NK-клетки, иммунная система, кортизол, общий анализ крови, SARS-CoV-2 инфекция, постковидные пациенты

Адрес для переписки:

Добрынина Мария Александровна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (982) 340-40-00.
E-mail: mzurochka@mail.ru

Address for correspondence:

Dobrynina Maria A.
Research Institute of Immunology and Physiology,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,
Pervomayskaya str., 106.
Phone: 7 (982) 340-40-00.
E-mail: mzurochka@mail.ru

Образец цитирования:

М.А. Добрынина, А.В. Зурочка, М.В. Комелькова,
Ш. Ло «Исследование нарушения натуральных киллеров
у пациентов, перенесших COVID-19» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 161-166.
doi: 10.46235/1028-7221-1132-ION

© Добрынина М.А. и соавт., 2022

For citation:

M.A. Dobrynina, A.V. Zurochka, M.V. Komelkova, S. Luo
“Impairment of natural killer populations in the patients
recovered from COVID-19”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2,
pp. 161-166. doi: 10.46235/1028-7221-1132-ION

DOI: 10.46235/1028-7221-1132-ION

IMPAIRMENT OF NATURAL KILLER POPULATIONS IN THE PATIENTS RECOVERED FROM COVID-19

Dobrynina M.A.^a, Zurochka A.V.^{a, b}, Komelkova M.V.^{a, b}, Luo S.^c

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

^b South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation

^c Institute of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

Abstract. To date, only minimal attention has been paid to assessment of immunity state in patients with post-COVID syndrome. Influence of the SARS-CoV-2 virus on various systems in the body, including the immune system, may contribute to the development of disorders causing different diseases. At the same time, the patients suffering from the COVID-19 complications, including hospitalization and isolation from their family members, experience severe psychological and social stress. In almost every fourth case, these factors lead to development of the s.c. post-COVID syndrome. The aim of the present study was to evaluate the numbers of NK cells, levels of cortisol and characteristics of immune system disorders in the patients who underwent SARS-CoV-2 infection.

78 patients were examined 6 months after suffering COVID-19. We have assessed 25 parameters of the blood system (general blood test), 50 parameters of immune system, i.e., counts of T lymphocytes, B lymphocytes and their functional markers, NK, T-NK cell subsets, phagocytic components of immune system, as well as factors of humoral immunity, including total and specific immunoglobulins and complement fragments.

Our studies showed a sharp, three-fold decrease in the number of natural killers in more than 1/3 of the examined individuals. This decrease is accompanied by higher relative contents of T lymphocytes and T helper cells. The latter finding may be associated with a compensatory increase in T lymphocytes and dysregulation of the T cell link of immune system, thus requiring a more detailed study and, most likely, evaluation of the cytokine profile in such patients. Moreover, in some post-COVID patients, high levels of cortisol still persist, thus suggesting maintenance of chronic stress in these patients. Some changes in platelet counts are also important (increased levels of blood platelets and thrombocytocrit), which may promote later disorders of blood clotting system and development of thrombosis.

Keywords: NK cells, immune system, cortisol, complete blood count, SARS-CoV-2 infection, post-COVID patients

Работа выполнена по теме гос. задания «Имунофизиологические и патофизиологические механизмы регуляции и коррекции функций организма» № гос. регистрации 122020900136-4 и поддержана грантом РФФИ и NSFC, 20-515-55003).

Введение

При развитии SARS-CoV-2 инфекции практически все компартменты иммунной системы вовлекаются в процесс противодействия инфекции и далеко не всегда успешно. Показано, что пациенты SARS-CoV-2 характеризуются целым рядом нарушений со стороны Т-клеток [6]. Несомненно, важную роль для протекания инфекции играет координация и оптимизация как врожденного, так и адаптивного иммунитета в ответ на вирусные инфекции. В этом очень динамичном сценарии натуральные киллеры (НК-клетки), вероятно, играют определяющую роль в формировании

выраженности ответа врожденного иммунитета у пациентов с COVID-19, способствуя сбалансированности прямого ответа на вирус — путем устранения инфицированных клеток (дендритных клеток, моноцитов и Т-клеток). Нарушение этого баланса оказывается критичным в случае SARS-CoV-2, поскольку сверхактивный цитокиновый ответ, типичный для тяжелых случаев заболевания, приводит к развитию системных осложнений, полиорганной недостаточности и, в конечном итоге, к смерти [5].

Различные популяции НК-клеток выступают первой линией защиты при COVID-19 [3]. При анализе крови пациентов COVID-19 с легкой и тяжелой формой болезни было показано, что SARS-CoV-2 также вызывает сильные нарушения регуляторных звеньев иммунной системы, характеризующейся относительной потерей лимфоидных клеток в сочетании с увеличением количества миелоидных клеток. При тяжелом течении заболевания отмечается увеличение коли-

чества НК, экспрессирующих KIR2DS4, CD158i, а также изменения со стороны В-клеток, проявляющиеся снижением CD19, CD20 и IgM⁺ [8].

У больных COVID-19 отмечается уменьшение количества CD3⁺CD4⁺Т-лимфоцитов, CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов, CD19⁺В-лимфоцитов и CD16⁺CD56⁺НК-клеток в периферической крови [11].

В то же время при особо тяжелом течении заболевания отмечается сверхактивация Т-клеток, повышение CCR4⁺, CCR6⁺, h17 и повышение активности и количества цитотоксических CD8⁺ Т-клеток в периферической крови [12].

Необходимо отметить, что описанные нарушения регуляции CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов, CD16⁺CD56⁺НК-клеток, C1q, а также повышение в крови IL-6, наряду с бактериальной коинфекцией, являются важными причинами развития бактериальной пневмонии, которая приводит к утяжелению состояния и зачастую — к смерти пациента [11].

Все эти исследования проводились в период развития острого COVID-19 у пациентов. Исследование же НК-клеток у постковидных пациентов практически не проводится. В то же время пациенты, страдающие от осложнений COVID-19, включая госпитализацию и изоляцию от членов своей семьи, испытывают сильный психологический и социальный стресс. Изоляция аналогична стрессу физической иммобилизации, который связан с резким повышением уровня кортизола и стероидов [9]. Экстремальные уровни стресса также повышают уровень цитокинов и способствуют медицинским осложнениям у пациентов с COVID-19, которые уже испытывают повреждение органов из-за цитокинового шторма [5]. Длительное стрессорное воздействие также способствует формированию иммунной недостаточности [4, 10]. Все это приводит к развитию постковидного синдрома у большого процента пациентов, перенесших COVID-19.

Отсутствие фундаментальных исследований состояния иммунной системы у таких пациентов и разработки мер их терапии может серьезно осложнить сроки реабилитации, а также ухудшить прогноз их дальнейшей выживаемости при последующих вирусных (в том числе и сезонных) заболеваниях.

Учитывая, что НК-клетки являются одними из ключевых клеток иммунной системы, участвующие в противовирусной защите, мы сочли необходимым изучить параметры иммунной системы, связанные с нарушением уровня НК-клеток у постковидных пациентов.

Цель исследования — изучить уровень НК-клеток, уровень кортизола и особенности нару-

шений иммунной системы у пациентов, перенесших SARS-CoV-2 инфекцию.

Материалы и методы

Было обследовано 78 пациентов, перенесших SARS-CoV-2 инфекцию. Критерием включения в группы исследований были: подтвержденный диагноз SARS-CoV-2 инфекции методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), наличие IgA, M, G к вирусу SARS-CoV-2 инфекции, данные компьютерной томографии о перенесенной пневмонии (варианты: КТ1 — поражение до 25% легких, КТ2 — поражение до 50% легких, КТ3 — поражением до 75% легких, КТ4 — поражение свыше 75% легких). Исследование проводилось не менее чем через 6 месяцев после перенесенной пневмонии вызванной SARS-CoV-2 инфекцией.

Все пациенты были предварительно обследованы врачом-терапевтом и иммунологом-аллергологом, для выявления сопутствующих заболеваний. Группы были рандомизированы по полу, возрасту, сопутствующим заболеваниям по критерию χ^2 . Пациенты были разделены на 2 группы сравнения: 1. Пациенты с уровнем НК-клеток ниже нормы. 2. Пациенты с нормальным уровнем НК-клеток. За норму НК-клеток были приняты данные, представленные в монографии Зурочка А.В. и соавт. (2018) [1]. Все исследования были одобрены Независимым локальным этическим комитетом при ГАУЗ ОТКЗ «Городская клиническая больница №1» г. Челябинска, протокол № 8 от 11.04.2022, на базе которой проводились данные исследования.

Иммунологические исследования

Общий анализ крови (исследовано 25 параметров: лейкоцитарный, эритроцитарный и тромбоцитарный ростки кроветворения), количественный и качественный состав ростков кроветворения проведен стандартизованным методом на гематологическом анализаторе Medonic M20 (Швеция).

Методом проточной цитометрии CD45⁺ (панлейкоцитарный маркер для гейтирования лимфоцитов), CD45⁺, CD3⁺ (Т-лимфоциты), CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺ (хелперы индукторы), CD45⁺, CD3⁺, CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD45⁺, CD3⁺ CD16⁺, CD56⁺ (ТНК-клетки) CD45⁺, CD3⁺, CD16⁺, CD56⁺ (натуральные киллеры), CD45⁺, CD3⁺, CD19⁺ CD5⁺ (В-лимфоциты), CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, CD127⁻ (Т-регуляторные клетки/супрессоры), CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺ (активированные хелперы, ранняя активация лимфоцитов), CD45⁺, CD3⁺, HLA-DR (активированные Т-лимфоциты — поздняя активация лимфоцитов), В-клеток памяти CD27⁺, Beckman Coulter, BioLegend (США). Оценку иммунного статуса осуществляют методом проточной цито-

метрии на цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter, США) по стандартизованной технологии оценки лимфоцитарного звена иммунитета [1, 2].

Оценка фагоцитарной активности частиц латекса диаметром 1,7 мкм нейтрофилами (активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число); спонтанная и индуцированная НСТ-активность нейтрофилов морфологическим методом (световая микроскопия с использованием микроскопов Olimpus (Япония). Исследование проводится общепринятыми методами оценки функциональной активности фагоцитов.

Уровни общих IgA, IgG, IgM, специфические IgM, IgG к коронавирусу COVID-19, С1-ингибитора, С3а- и С5а-компонентов комплемента методом иммуноферментного и иммунофлюоресцентного анализа на иммуноферментном анализаторе Multiscan FC Thermoscientific (Китай). Исследование проводилось общепринятыми стандартизованными методами иммуноферментного анализа (АО «Вектор-Бест», Россия).

Также у пациентов был определен уровень кортизола, как маркера стресса методом иммуноферментного анализа (АО «Вектор-Бест», Россия).

Обработка и анализ данных осуществлялись с помощью R 3.1.1 12 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия) и Microsoft Excel версии 14.0. Так как распределение в количественных данных было не нормальным (p-value теста Шапиро–Уилка < 0,05), то использованные статистические критерии были непараметрическими.

Результаты и обсуждение

При сравнении показателей между группами КТ 1, 2, 3, 4 через 6 месяцев после перенесенного заболевания мы не выявили достоверных различий между группами. Поэтому мы остановились на другом виде анализов, объединив различные группы пациентов по другому принципу – по нарушению в тех или иных компартментах иммунной системы. В этой части исследований мы предоставляем данные по пациентам, у которых были выявлены нарушения со стороны НК-клеток (критерии включения в группы нами описаны выше в материалах и методах).

Как показали наши исследования, нарушения уровня НК-клеток нами были выявлены у 29 пациентов (37,1%) из 78 обследованных. При этом снижение уровней натуральных киллеров у этой группы пациентов было резко, более чем

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И УРОВНЯ КОРТИЗОЛА У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ УРОВНЯ НК-КЛЕТОК, M±m

TABLE 1. IMMUNE AND CORTISOL SCORES IN POST-COVID PATIENTS WITH IMPAIRED NK CELL LEVELS, M±m

Показатели иммунной системы Immune system indicators	Группа 1. Постковидные пациенты со сниженным уровнем НК-клеток Group 1. Post-COVID patients with reduced levels of NK cells n = 29	Группа 2. Постковидные пациенты с нормальным уровнем НК-клеток Group 2. Post-COVID patients with normal levels of NK cells n = 49
НК-клетки (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) отн. (%) NK cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) rel. (%)	6,028±0,395*	16,071±0,803
НК-клетки (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) абс. (10 ⁹ кл/л) NK cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) abs. (10 ⁹ cell/L)	125,310±12,008*	371,694±33,265
Т-лимфоциты (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻) отн. (%) T lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻) rel. (%)	77,872±0,966*	68,173±1,015
Т-лимфоциты (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻) абс. (10 ⁹ кл/л) T lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻) abs. (10 ⁹ cells/L)	1656,897±127,242	1514,551±75,103
Т-хелперы (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺) отн. (%) T helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺) rel. (%)	51,324±1,801*	44,504±1,057
Т-хелперы (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺) абс. (10 ⁹ кл/л) T helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺) abs. (10 ⁹ cell/L)	1108,724±100,164	985,347±51,788
Кортизол Cortisol	604,974±49,812*	543,813±38,251

Примечание. * – достоверность различий между группами p < 0,05.

Note. *, significance of differences between groups p < 0.05.

в 3 раза, ниже, чем у постковидных пациентов, не имеющих такого нарушения. Очень важно, что это нарушение практически не связано с другими компартментами иммунной системы, за исключением относительного количества Т-лимфоцитов и Т-хелперов. Данные показатели были достоверно выше, чем у пациентов без нарушения уровня НК-клеток. Абсолютное количество этих клеток также повышалось, но не имело достоверных различий при сравнении групп.

Кроме того, отмечено, что у пациентов со сниженным уровнем НК-клеток сохраняется более высокий уровень кортизола (табл. 1.). Еще одной особенностью является тот факт, что у этих пациентов достоверно выше уровень тромбоцитов ($252,379 \pm 15,575$ против $206,327 \pm 6,576$, $p < 0,01$) и тромбоцитокрита ($0,199 \pm 0,011$ против $0,168 \pm 0,005$, $p < 0,01$).

Как показали наши исследования, более чем у трети обследованных лиц выявляется резкое, трехкратное снижение количества натуральных киллеров. Это снижение сопровождается более высоким относительным уровнем Т-лимфоцитов и Т-хелперов, последнее, вероятно, связано с компенсаторным повышением Т-лимфоцитов и

нарушением регуляции Т-клеточного звена иммунной системы, что требует более детального исследования и, скорее всего, изучения цитокинового профиля у таких пациентов. Более того, у части постковидных пациентов сохраняется высокий уровень кортизола, что свидетельствует о сохранении уровня напряженности хронического стресса. Также важным является выявленные изменения в тромбоцитарном звене кроветворения (повышение уровня тромбоцитов и тромбоцитокрита), которые могут приводить к поздним нарушениям системы свертывания крови и образованию тромбозов.

Выводы

1. У 37,1% постковидных пациентов выявляется значительное, более чем в 3 раза, снижение уровня НК-клеток.
2. Снижение уровня НК-клеток у постковидных пациентов сопровождается более высоким уровнем Т-лимфоцитов, Т-хелперов.
3. Низкий уровень НК-клеток у постковидных пациентов сопровождается более высоким уровнем кортизола, тромбоцитов и тромбоцитокрита.

Список литературы / References

1. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V. Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in biomedical research]. Ekaterinburg: RIO Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018. 720 p.
2. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 974-992. [Khaidukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. Standardized technology "Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytometer-analyzers". *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 974-992. (In Russ.)]
3. d'Alessandro M., Bergantini L., Cameli P., Curatola G., Remediani L., Sestini P., Bargagli E; Siena COVID Unit. Peripheral biomarkers' panel for severe COVID-19 patients. *J. Med. Virol.*, 2020, Vol. 93, no. 3, pp. 1230-1232.
4. Dos Santos R.M. Isolation, social stress, low socioeconomic status and its relationship to immune response in Covid-19 pandemic context. *Brain Behav. Immun. Health*, 2020, Vol. 7, 100103. doi: 10.1016/j.bbih.2020.100103.
5. Heffner K.L. Neuroendocrine effects of stress on immunity in the elderly: implications for inflammatory disease. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 2011, Vol. 31, pp. 95-108.
6. Jouan Y., Phenotypical and functional alteration of unconventional T cells in severe COVID-19 patients. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 12, e20200872. doi: 10.1084/jem.20200872.
7. Masselli E., Vaccarezza M., Carubbi C., Pozzi G., Presta V., Mirandola P., Vitale M. NK cells: A double edge sword against SARS-CoV-2. *Adv. Biol. Regul.*, 2020, Vol. 77, 100737. doi: 10.1016/j.jbior.2020.100737.
8. Rendeiro A.F., Casano J., Vorkas C.K., Singh H., Morales A., DeSimone R.A., Ellsworth G.B., Soave R., Kapadia S.N., Saito K., Brown C.D., Hsu J., Kyriakides C., Chui S., Cappelli L., Cacciapuoti M.T., Tam W., Galluzzi L., Simonson P.D., Elemento O., Salvatore M., Inghirami G. Longitudinal immune profiling of mild and severe COVID-19 reveals innate and adaptive immune dysfunction and provides an early prediction tool for clinical progression. *medRxiv [Preprint]*, 2020, Vol. 2020, 09.08.20189092. doi: 10.1101/2020.09.08.20189092.
9. Steenblock C., Todorov V., Kanczkowski W., Eisenhofer G., Schedl A., Wong M.-L., Licinio J., Bauer M., Young A.H., Gainetdinov R.R., Bornstein S.R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-cov-2) and the neuroendocrine stress axis. *Mol. Psychiatry*, 2020, Vol. 25, no. 8, pp. 1611-1617.
10. Vasile C. Mental health and immunity. *Exp. Ther. Med.*, 2020, Vol. 20, no. 6, 211. doi: 10.3892/etm.2020.9341.

11. Wu Y., Huang X., Sun J., Xie T., Lei Y., Muhammad J., Li X., Zeng X., Zhou F., Qin H., Shao L., Zhang Q. Clinical characteristics and immune injury mechanisms in 71 Patients with COVID-19. *mSphere*, 2020, Vol. 5, no. 4, e00362-20. doi: 10.1128/mSphere.00362-20.
12. Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C., Liu S., Zhao P., Liu H., Zhu L., Tai Y., Bai C., Gao T., Song J., Xia P., Dong J., Zhao J., Wang F.S. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.*, 2020, Vol. 8, no. 4, pp. 420-422.

Авторы:

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., профессор, заведующий лабораторией иммунобиотехнологии научно-образовательного Российско-китайского центра системной патологии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», г. Челябинск; ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Комелькова М.В. — к.б.н., заведующий лабораторией системной патологии и перспективных лекарственных средств научно-образовательного Российско-китайского центра системной патологии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», г. Челябинск; старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Ло Шаньшань — профессор, Институт гематологии, Госпиталь Юнион, Медицинский колледж Тунцзи, Хуачжунский университет науки и технологий, г. Ухань, Китай

Authors:

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

Zurochka A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immune Biotechnology, Russian-Chinese Educational Center at the South Ural State University, Chelyabinsk; Leading Research Associate, Research Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Komelkova M.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Systemic Pathology and Prospective Medical Drugs, Russian-Chinese Educational Center at the South Ural State University, Chelyabinsk; Senior Research Associate, Laboratory of Immune Physiology and Immunopharmacology, Research Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Luo Shanshan, Professor, Institute of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

Поступила 15.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 15.05.2022
Accepted 29.05.2022

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЛИПОАСПИРАТА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ

Желтова О.И., Шевела Е.Я., Меледина И.В., Черных Е.Р.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. Цирроз печени (ЦП) является серьезной проблемой в плане медикаментозного лечения. Определенные перспективы связывают с разработкой клеточных технологий, основанных на использовании стволовых клеток, в частности мезенхимальных стромальных клеток (МСК). В последние годы существенно возрос интерес к использованию МСК, выделенных из жировой ткани, которые обладают рядом преимуществ по сравнению с костномозговыми МСК. Целью настоящего исследования стала оценка безопасности и переносимости аутологичной трансплантации МСК, полученных из жировой ткани (липоасpirата), в комплексном лечении больных ЦП различного генеза. Исследуемую группу составили 12 пациентов (4 мужчин и 8 женщин), в возрасте от 33 до 67 лет. У 6 пациентов развитие ЦП было обусловлено вирусными гепатитами, у остальных – факторами невирусного генеза, включая токсические воздействия ($n = 3$), первичный билиарный цирроз ($n = 2$) и криптогенный ЦП ($n = 1$). Степень тяжести ЦП по шкале Child-Pugh соответствовала классу А – у 6 пациентов, классу В – у 6 пациентов. Балл по шкале MELD варьировал от 8 до 11. Всем пациентам однократно вводили аутологичные МСК ($12,94 \times 10^6$, $11,3-16,0 \times 10^6$), полученные в результате культивирования клеток липоасpirата в течение 14 дней. Проведение липоасpirации и введение МСК не сопровождалось развитием побочных эффектов и серьезных нежелательных явлений. Анализ клинической эффективности, проведенный через 6-12 мес. после терапии, позволил выделить две подгруппы: ответившие (подгруппа 1, $n = 6$) и неответившие (подгруппа 2, $n = 6$) на терапию. В подгруппе 1 у 4 пациентов балл по MELD снизился, у 2 – не изменился, у пациентов подгруппы 2 балл по MELD увеличился. Обе подгруппы не различались по этиологии и тяжести ЦП, сопутствующей патологии (COVID-19). Положительная динамика в подгруппе 1 выявлялась по синдромам печеночно-клеточной недостаточности ($n = 1$), цитолиза ($n = 2$), холестаза ($n = 1$). У двух пациентов со стабилизацией балла по MELD показатели стабилизировались в пределах референсных значений. После терапии МСК большинство пациентов (8/12) перенесли новую коронавирусную инфекцию, причем частота заболеваемости была одинаковой в группах с наличием или отсутствием ответа на терапию МСК (по 4 пациента в каждой группе). Результаты проведенного исследования свидетельствуют о безопасности применения МСК, выделенных из жировой ткани пациентов с циррозом печени, и перспективности данного подхода для стабилизации или улучшения функции печени.

Ключевые слова: цирроз печени, мезенхимальные стромальные клетки, липоасpirат

Адрес для переписки:

Шевела Екатерина Яковлевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630091, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел./факс: 8 (383) 228-21-01.
E-mail: shevelak@mail.ru

Address for correspondence:

Shevela Yekaterina Ya.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630091, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone/fax: 7 (383) 228-21-01.
E-mail: shevelak@mail.ru

Образец цитирования:

О.И. Желтова, Е.Я. Шевела, И.В. Меледина,
Е.Р. Черных «Первый опыт использования
мезенхимальных стромальных клеток липоасpirата
в комплексном лечении пациентов с циррозом печени»
// Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 2. С. 167-172. doi: 10.46235/1028-7221-1116-FEI
© Желтова О.И. и соавт., 2022

For citation:

O.I. Zheltova, E.Ya. Shevela, I.V. Meledina, E.R. Chernykh
“First experience in usage of lipoaspirate-derived mesenchymal
stromal cells in combined treatment of the patients with
liver cirrhosis”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 167-172.
doi: 10.46235/1028-7221-1116-FEI
DOI: 10.46235/1028-7221-1116-FEI

FIRST EXPERIENCE IN USAGE OF LIPOASPIRATE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN COMBINED TREATMENT OF THE PATIENTS WITH LIVER CIRRHOSIS

Zheltova O.I., Shevela E.Ya., Meledina I.V., Chernykh E.R.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Liver cirrhosis (LC) is a serious problem with respect to drug therapy. Certain promises are associated with development of stem cell-based technologies, in particular, mesenchymal stromal cells (MSCs). Over recent years, a significant interest was drawn to the usage of MSCs isolated from adipose tissue, which have a number of advantages over bone marrow MSCs. The aim of this study was to evaluate safety and tolerability of transplantation of autologous MSCs derived from adipose tissue (lipoaspirate) when treating the patients with LC of different origin. The study group consisted of 12 patients (4 men and 8 women), aged 33 to 67 years. In six patients, development of LC was due to viral hepatitis; in other subjects it was caused by non-viral factors, including toxic effects ($n = 3$), primary biliary cirrhosis ($n = 2$) and cryptogenic cirrhosis ($n = 1$). The LC severity assessed by the Child-Pugh scale corresponded to class A (6 cases) or class B (6 patients). The MELD scores varied from 8 to 11. All patients were injected once with autologous MSCs (a mean of 12.94×10^6 , 11.3 to 16.0×10^6) obtained by culturing the lipoaspirate cells for 14 days. Lipoaspiration and injection of MSCs were not accompanied by development of side effects, or serious adverse events. Analysis of clinical efficacy, carried out 6-12 months after therapy, made it possible to distinguish two subgroups: responders to the therapy (subgroup 1, $n = 6$) and non-responders (subgroup 2, $n = 6$). In subgroup 1, the MELD score was found to be decreased in 4 cases, and did not change in 2 patients. In contrast, the MELD score increased in the patients from subgroup 2. Both subgroups did not differ in etiology and severity of LC, or concomitant pathology (COVID-19). Positive dynamics in subgroup 1 was revealed for the signs of hepatocellular insufficiency ($n = 1$), cytolysis ($n = 2$) and cholestasis ($n = 1$). In two patients with MELD score stabilization, the scores reached the reference values. After MSC therapy, the majority of patients (8/12) underwent a new coronavirus infection, and the COVID incidence rate was similar in groups with or without response to MSC therapy (4 patients in each group). The results of the study suggest the safety of using MSCs isolated from the adipose tissue of patients with liver cirrhosis, and the perspectives of such approach in order to stabilize or improve liver function.

Keywords: liver cirrhosis, mesenchymal stem cells, lipoaspirate

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных и поисковых научных исследований (№ гос. регистрации в ЕГИСУ НИОКТР 122011800324-4 и 122012000367-6 соответственно).

Введение

Цирроз печени (ЦП) представляет исход хронических диффузных заболеваний печени и является серьезной проблемой в плане медикаментозного лечения. Единственным эффективным методом лечения декомпенсированных форм ЦП является трансплантация печени. Однако дефицит донорских органов, необходимость длительной иммуносупрессии и высокая стоимость лечения существенно ограничивают возможности данного подхода и побуждают искать альтернативные пути. В этом направлении большой интерес представляют клеточные технологии, основанные на использовании стволовых клеток, в частности мезенхимальных стромальных клеток (МСК), которые наряду со способностью к самоподдержанию и дифференцировке в клетки

мезенхимального направления, способны дифференцироваться в гепатоцитоподобные клетки *in vivo* и *in vitro* и оказывать стимулирующий эффект на регенерацию гепатоцитов [1, 12]. Кроме того, МСК подавляют активность воспалительного процесса в тканях, препятствуя тем самым прогрессии фиброза [3]. Терапевтическая эффективность костномозговых МСК у пациентов ЦП показана в ряде клинических испытаний [5, 6]. Проведенные нами клинические испытания также показали безопасность и эффективность клеточной терапии, включающей использование костномозговых МСК, в комплексном лечении больных ЦП [10].

Поскольку пролиферативный потенциал МСК костного мозга ограничен и снижается с возрастом [2], в последние годы наблюдается рост числа клинических исследований с использованием МСК, выделенных из жировой ткани. Подобно костномозговому аналогу, МСК жировой ткани характеризуются выраженным противовоспалительным и регенераторным потенциалом, при этом отличаются более высокой пролиферативной активностью, низким коэф-

фициентом старения и генетической стабильностью при культивировании *ex vivo* [11]. Использование жировой ткани в качестве источника МСК представляется более предпочтительным у пациентов с высоким индексом массы тела, а также при наличии тяжелых сопутствующих заболеваний (тяжелая сердечная недостаточность, некомпенсированный сахарный диабет).

Учитывая вышесказанное, нами было инициировано поисковое научное исследование, целью которого стала оценка безопасности и переносимости аутологичной трансплантации МСК, полученных из жировой ткани (липоаспираата), в комплексном лечении больных ЦП различного генеза.

Материалы и методы

В исследование последовательно отбирались пациенты с ЦП различной этиологии (обоих полов, в возрасте от 18 до 70 лет), проходившие обследование и лечение на базе иммунологического отделения клиники иммунопатологии НИИФКИ в период с начала 2020 г. по февраль 2022 г. Диагноз «ЦП» базировался на данных гистологического исследования, а также комплекса клинических, лабораторных и радиологических данных у пациентов с явными признаками портальной гипертензии. Критериями невключения являлось одновременное участие в другом клиническом исследовании, несоответствие критериям включения, активный алкоголизм и/или употребление наркотических средств, ВИЧ-инфекция, декомпенсированные заболевания легких и сердца, кровотечение из варикозно расширенных вен пищевода, наличие гепатоцеллюлярной карциномы или других онкологических заболеваний, в том числе в анамнезе, острые инфекции, тромбоцитопения ниже $50 \times 10^9/\text{л}$, психические нарушения, беременность, неспособность пациента подписать информированное согласие. Степень тяжести ЦП оценивали по шкалам Child-Pugh и MELD.

Жировую ткань (липоаспираат) получали при проведении операции липосакции под местной анестезией в условиях хирургической операционной. Липоаспираат подвергали ферментативной диссоциации с помощью 0,1% раствора коллагеназы 1А типа (Sigma-Aldrich) в течение 45 мин при 37°C с последующей инактивацией фермента физиологическим раствором. Нерасщепленные фрагменты жировой ткани удаляли фильтрованием через нейлоновые фильтры (размер пор $100\ \mu\text{m}$). Из полученных таким образом ядросодержащих клеток стромально-васкулярной фракции стандартно генерировали мезенхимальные стромальные клетки (МСК) в течение 14 дней. По достижении 80-90% слияния клетки аккуратно снимали с поверхности культурального флакона, используя стерильный апиrogenный скребок для культур клеток, отмывали и вводили

внутривенно капельно в 50 мл физиологического раствора.

Клинико-лабораторное обследование пациентов (включая общий и биохимический анализы крови, оценку по шкале Child-Pugh и MELD) проводили до начала терапии с мониторингом состояния больных через 6-12 месяцев после окончания лечения.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианных значений (Me) и квартильного диапазона ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Исследуемую группу составили 12 пациентов – 4 мужчины и 8 женщин, в возрасте от 33 до 67 лет (табл. 1). В половине случаев развитие ЦП было обусловлено вирусными гепатитами ($n = 6$), в половине – факторами невирусного генеза, включая токсические (преимущественно алкогольные) воздействия ($n = 3$), первичный билиарный цирроз (ПБЦ, $n = 2$) и криптогенный ЦП ($n = 1$). Степень тяжести ЦП, оцениваемая по шкале Child-Pugh, соответствовала прогностическому классу А – у 6 пациентов (50%), классу В – у 6 (50%) пациентов. Балл по шкале MELD составил 9,0 (Me; 8-11), причем у четырех пациентов балл MELD составлял 11 и более, что свидетельствовало о декомпенсированном ЦП. Две трети пациентов после лечения перенесли новую коронавирусную инфекцию разной степени тяжести.

Всем пациентам однократно вводили аутологичные мезенхимальные стромальные клетки (МСК, $12,94 \times 10^6$, $11,3$ - $16,0 \times 10^6$), полученные в результате культивирования ядросодержащих клеток липоаспираата пациента в течение 14 дней. Данная популяция содержала 85-95% клеток, экспрессирующих специфичные для МСК маркеры (CD73, CD90, CD105), и минимальное количество клеток, экспрессирующих «линейные» маркеры CD3 ($3,9 \pm 1,55\%$), CD20 ($5,3 \pm 1,30\%$), CD16 ($5,6 \pm 1,72\%$), CD14 ($5,6 \pm 2,28\%$), HLA-DR ($1,1 \pm 0,57\%$), а также маркер гемопоэтических клеток CD34 ($0,69 \pm 0,28\%$).

Ни проведение липоаспирации, ни введение МСК не сопровождалось развитием побочных эффектов и серьезных нежелательных явлений. Пациенты отмечали незначительную болезненность передней брюшной стенки после проведенной липоаспирации, а также кратковременные повышения температуры тела до субфебрильных цифр (не более $37,5$). Сравнительный анализ параметров периферической крови до и через 3 дня после введения клеток также не выявил статисти-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ, ВКЛЮЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS INCLUDED IN THE STUDY

Возраст, Ме (min-max), лет Age, Me (min-max), years	51,5 (33-67)
Пол (М/Ж) Sex (M/F)	4/8
Этиология ЦП: Etiology of CP: 1) вирусный, n (%) 1) viral, n (%): – HCV, n (%) – HBV ± HDV, n (%) 2) невирусный, n (%) 2) non-viral, n (%): – токсический, n (%) – первичный билиарный цирроз, n (%) – криптогенный, n (%)	6/12 (50%) 4/12 (33,3%) 2/12 (16,37%) 6/12 (50%) 3/12 (33,33%) 2/12 (16,67%) 1/12 (8,33%)
Child-Pugh, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}): – класс А, n (%) – class A, n (%) – класс В, n (%) – class B, n (%)	6/12 (50%) 6/12 (50%)
MELD, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})	9,0 (8,0-11,5)
COVID, n (%)	8/12 (66,67%)

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С НАЛИЧИЕМ / ОТСУТСТВИЕМ ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ

TABLE 2. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH / WITHOUT RESPONSE TO THERAPY

	Ответившие Responders (n = 6)	Неответившие Non-responders (n = 6)	Уровень значимости (p) p-value
Возраст, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}) Age, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	55,5 (52-59)	48 (44-51)	0,044
Пол (М/Ж) Sex (M/F)	3/3	1/5	0,22
Этиология (n, %): Etiology (n,%): – вирусные – viral – невирусные – non-viral	3/6 (50%) 3/6 (50 %)	3/6 (50%) 3/6 (50 %)	1,0 1,0
Класс А (n, %) Class A (n, %)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	1,0
Класс В (n, %) Class B (n, %)	3/6 (50%)	3/6 (50 %)	1,0
MELD, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}) – до лечения – before treatment – после лечения – after treatment	9 (8-11) 8,5 (7-9)	9,5 (8-13) 11,5 (9-16)	0,81 p = 0,055
COVID (n, %)	4/6	4/6	p = 1,0

ческих различий по большинству исследуемых показателей (данные не представлены).

Анализ клинической эффективности, проведенный через 6-12 мес. после терапии, позволил выделить две подгруппы: ответившие (подгруппа 1) и неответившие (подгруппа 2) на терапию (табл. 2). Критерием ответа являлось уменьшение/стабилизация прогностического балла по шкале MELD. В подгруппу 1 вошли 6 пациентов (у 4 балл по MELD снизился, у 2 – не изменился), подгруппу 2 составили 6 пациентов, у которых балл по MELD увеличился. Обе подгруппы не различались по этиологии и тяжести ЦП, сопутствующей патологии (COVID) ($p > 0,05$), в то же время ответившие на терапию пациенты были старше. Исходно пациенты не различались по показателю MELD, однако через 6-12 мес. после терапии у пациентов подгруппы 2 балл по шкале MELD был выше ($p = 0,055$).

У четырех ответивших на терапию пациентов этиологическими факторами ЦП были алкогольное поражение печени ($n = 1$), ПБЦ ($n = 1$), хронический вирусный гепатит С ($n = 2$). Положительная динамика в этой подгруппе выявлялась по синдромам печеночно-клеточной недостаточности ($n = 1$), цитолиза ($n = 2$), холестаза ($n = 1$). У двух пациентов со стабилизацией балла по MELD (генез ЦП – хронический вирусный гепатит В и ПБЦ) отмечалась стабилизация показателей в пределах референсных значений.

В группе пациентов, не ответивших на терапию, генез ЦП был вирусным (хронический вирусный гепатит С, $n = 2$, и В, $n = 1$), алкогольным ($n = 2$) и невыясненным (криптогенный ЦП, $n = 1$). Увеличение прогностического балла по MELD в этой подгруппе ассоциировалось с усилением синдрома холестаза ($n = 3$), цитолиза ($n = 3$) и печеночно-клеточной недостаточности ($n = 3$).

Отметим, что данное клиническое исследование проводилось в период пандемии COVID-19. После терапии МСК большинство рекрутированных пациентов (8/12) перенесли новую коронавирусную инфекцию разной степени тяжести, причем частота заболеваемости была совершенно одинаковой в группах с наличием или отсутствием ответа на терапию МСК (4/6 в каждой группе). Один пациент со стабилизацией состояния по ЦП умер впоследствии от осложнений COVID-19.

Первые сообщения об экспериментальном использовании МСК, выделенных из жировой ткани, в модели фиброза печени появились сравнительно недавно. В 2017 г. две группы исследователей сообщили о сравнимом противовоспалительном и антифибротическом эффекте МСК костного мозга и жировой ткани в модели CCl₄-индуцированного фиброза печени у мышей [7] и крыс [4], а также о более выраженном антипролиферативном и проапоптогенном эффекте

МСК жировой ткани в отношении звездчатых клеток печени [4].

В литературе имеются также единичные сообщения об использовании МСК жировой ткани у человека. Имеются результаты проведенного в 2017 г. исследования эффективности свежeweделенных стволовых клеток липоаспирата, выделенных с использованием системы Celution [8]. Авторы сообщают об отсутствии серьезных нежелательных явлений у четырех рекрутированных пациентов в течение месяца после терапии. У 3 из 4 пациентов концентрация сывороточного альбумина оставалась неизменной или повышалась в течение 6 мес., оставаясь на достигнутом уровне до 12 мес. у одного пациента. Через 24 часа после введения клеток повышался уровень факторов, связанных с регенерацией печени (фактор роста гепатоцитов и интерлейкин-6). В отличие от нашего подхода, в этом исследовании были использованы свежeweделенные клетки жировой ткани.

В 2021 году опубликованы результаты многоцентрового клинического испытания стволовых клеток, полученных из аутологичной жировой ткани, у 7 пациентов с неалкогольным стеатогепатитом и жировой дистрофией печени [9]. В отличие от используемого нами внутривенного введения генерированных МСК, в данном исследовании использовали свежeweделенные клетки, которые вводились через печеночную артерию. Авторы сообщили об отсутствии каких-либо нежелательных явлений. Через 24 недели у большинства пациентов улучшилась концентрация сывороточного альбумина (у 6/7) и протромбиновая активность (у 5/7).

Особенностью нашего исследования является его проведение в период пандемии COVID-19, и две трети пациентов после терапии МСК перенесли новую коронавирусную инфекцию разной степени тяжести. Важно, что такие пациенты были как в группе ответивших на терапию МСК, так и среди неответивших. Согласно последним данным, у пациентов с циррозом и хроническими заболеваниями печени общий уровень смертности может достигать 40% после заражения COVID-19, что значительно превышает показатели смертности при этом заболевании. В нашем исследовании зарегистрирован единственный летальный исход, что составляет 12,5%. Эти данные позволяют предположить, что новая коронавирусная инфекция не вызывает ухудшение функции печени при ЦП.

Заключение

Таким образом, результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что применение МСК, выделенных из жировой ткани пациентов с циррозом печени, является безопасным и потенциально перспективным для стабилизации или улучшения функции печени.

Список литературы / References

1. Alison M.R., Poulsom R., Jeffery R., Dhillon A.P., Quaglia A., Jacob J., Novelli M., Prentice G., Williamson J., Wright N.A. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, 2000, Vol. 406, no. 6793, 257. doi: 10.1038/35018642.
2. Beane O.S., Fonseca V.C., Cooper L.L., Koren G., Darling E.M. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 12, e115963. doi: 10.1371/journal.pone.0115963.
3. Christ B., Bruckner S., Winkler S. The therapeutic promise of mesenchymal stem cells for liver restoration. *Trends Mol. Med.*, 2015, Vol. 21, no. 11, pp. 673-686.
4. Hao T., Chen J., Zhi S., Zhang Q., Chen G., Yu F. Comparison of bone marrow vs. adipose tissue derived mesenchymal stem cells for attenuating liver fibrosis. *Exp. Ther. Med.*, 2017, Vol. 14, no. 6, pp. 5956-5964. doi: 10.3892/etm.2017.5333.
5. Jang Y.O., Kim Y.J., Baik S.K., Kim M.Y., Eom Y.W., Cho M.Y., Park H.J., Park S.Y., Kim B.R., Kim J.W., Kim H.S., Kwon S.O., Choi E.H., Kim Y.M. Histological improvement following administration of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: a pilot study. *Liver Int.*, 2014, Vol. 34, no. 1, pp. 33-41.
6. Mohamadnejad M., Alimoghaddam K., Mohyeddin-Bonab M., Bagheri M., Bashtar M., Ghanaati H., Baharvand H., Ghavamzadeh A., Malekzadeh R. Phase I trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch. Iran Med.*, 2007, Vol. 10, no. 4, pp. 459-466.
7. Nguyen N., Le T., Do H., Ngo D., Le H., Truong N. Comparative treatment efficiency of adipose and bone marrow derived allogenic mesenchymal stem cell transplantation in mouse models of liver fibrosis. *Biomed. Res. Ther.*, 2017, Vol. 4, no. 6, pp. 1374-1387.
8. Sakai Y., Takamura M., Seki A., Sunagozaka H., Terashima T., Komura T., Yamato M., Miyazawa M., Kawaguchi K., Nasti A., Mochida H., Usui S., Otani N., Ochiya T., Wada T., Honda M., Kaneko S. Phase I clinical study of liver regenerative therapy for cirrhosis by intrahepatic arterial infusion of freshly isolated autologous adipose tissue-derived stromal/stem (regenerative) cell. *Regen. Ther.*, 2017, Vol. 6, pp. 52-64.
9. Sakai Y., Fukunishi S., Takamura M., Kawaguchi K., Inoue O., Usui S., Takashima S., Seki A., Asai A., Tsuchimoto Y., Nasti A., Ho T.T.B., Imai Y., Yoshimura K., Murayama T., Yamashita T., Arai K., Yamashita T., Mizukoshi E., Honda M., Wada T., Harada K., Higuchi K., Kaneko S. Clinical trial of autologous adipose tissue-derived regenerative (stem) cells therapy for exploration of its safety and efficacy. *Regen. Ther.*, 2021, Vol. 18, pp. 97-101.
10. Shevela E.Y., Starostina N.M., Pal'tsev A.I., Shipunov M.V., Zheltova O.I., Meledina I.V., Khvan L.A., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kozlov V.A. Efficiency of cell therapy in liver cirrhosis. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, Vol. 160, no. 4, pp. 542-547.
11. Strioga M., Viswanathan S., Darinskas A., Slaby O., Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.*, 2012, Vol. 21, no. 14, pp. 2724-2752.
12. Terai S., Sakaida I., Yamamoto N., Omori K., Watanabe T., Ohata S., Katada T., Miyamoto K., Shinoda K., Nishina H., Okita K. An *in vivo* model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J. Biochem.*, 2003, Vol. 134, no. 4, pp. 551-558.

Авторы:

Желтова О.И. — к.м.н., врач — аллерголог-иммунолог иммунологического отделения клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Шевела Е.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Меледина И.В. — к.м.н., заведующая иммунологическим отделением клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Zheltova O.I., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Department of Immunopathology, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shevela E.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Meledina I.V., PhD (Medicine), Head, Department of Immunopathology, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 13.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 13.05.2022
Accepted 29.05.2022

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА И IL-6 КАК МАРКЕРОВ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Журавлева Ю.А.¹, Зотова Н.В.^{1,2}, Соломатина Л.В.¹

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

² ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. В настоящее время, несмотря на широкое употребление понятий «системное воспаление» (СВ) и «системная воспалительная реакция» (СВР), нет общепринятых критериев их верификации. Зачастую эти процессы отождествляют (что методологически неверно) и ассоциируют с повышением провоспалительных медиаторов в крови. Однако СВ — это сложный процесс, который требует интегральных критериев, включающих оценку выраженности СВР (уровней реактивности) и дополнительных феноменов СВ: микротромбообразования, системной альтерации и дистресс-реакции нейроэндокринной системы. При этом возникает необходимость в оценке отдельных показателей СВ в качестве более доступной для медицинской практики альтернативы использования более сложных интегральных показателей. Цель — оценить диагностическую эффективность уровней CRP и IL-6 как маркеров острого и хронического системного воспаления. Для изучения острого СВ были проанализированы данные пациентов с острыми критическими состояниями инфекционного и неинфекционного генеза, для изучения хронического СВ — данные пациентов с аутоиммунными заболеваниями, хронической органной недостаточностью и другими хроническими деструктивными заболеваниями. Выраженность СВР основывалась на расчете интегрального показателя — уровня реактивности (УР). Дифференциация воспалительного процесса на классическое (КВ) и системное воспаление проводилась с помощью ранее предложенной нами шкалы СВ, верификация хронического СВ (ХрСВ) — с помощью шкалы ХрСВ. СВ (или ХрСВ) выявлено во всех группах пациентов, при этом частота регистрации СВ у пациентов с острыми состояниями повышалась при развитии ПОН. Частота развития СВР во всех группах была выше, что подтверждает невозможность отождествления этих процессов. ROC-анализ показал, что уровень CRP обладает неудовлетворительной диагностической эффективностью в отношении развития СВ/ХрСВ (AUC < 0,6), а IL-6 — очень хорошей (AUC 0,8-0,9). Прогностическая ценность маркеров для регистрации феномена СВР была выше, при этом AUC_{IL-6} превышала AUC_{CRP}. Таким образом, IL-6 при многих острых и хронических патологиях по диагностической эффективности более близок к интегральным показателям, чем CRP, а динамика IL-6 в крови может использоваться для прогнозирования и оценки осложнений, связанных с острым и хроническим СВ, а также для назначения и мониторинга результатов антицитокиновой терапии.

Ключевые слова: системное воспаление, системная воспалительная реакция, С-реактивный белок, IL-6

Адрес для переписки:

Соломатина Лилия Владимировна
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: slv10@list.ru

Address for correspondence:

Solomatina Liliya V.
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: slv10@list.ru

Образец цитирования:

Ю.А. Журавлева, Н.В. Зотова, Л.В. Соломатина
«Диагностическая эффективность С-реактивного
белка и IL-6 как маркеров системного воспаления»
// Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 2. С. 173-180.
doi: 10.46235/1028-7221-1146-DEO
© Журавлева Ю.А. и соавт., 2022

For citation:

Yu.A. Zhuravleva, N.V. Zotova, L.V. Solomatina
“Diagnostic efficacy of C-reactive protein and IL-6 as markers
of systemic inflammation”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2,
pp. 173-180.
doi: 10.46235/1028-7221-1146-DEO
DOI: 10.46235/1028-7221-1146-DEO

DIAGNOSTIC EFFICACY OF C-REACTIVE PROTEIN AND IL-6 AS MARKERS OF SYSTEMIC INFLAMMATION

Zhuravleva Yu.A.^a, Zotova N.V.^{a, b}, Solomatina L.V.^a

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

^b B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Currently, despite widespread use of the terms “systemic inflammation” (SI) and “systemic inflammatory response” (SIR), there are no generally accepted criteria for their verification. These processes are often identified (which is methodologically incorrect) and associated with an increase in pro-inflammatory mediators in the blood. However, SI is a complex process that requires integral criteria including assessment of SIR as reactivity level, and additional SI phenomena, such as microthrombosis, systemic alteration, and distress of the neuroendocrine system. At the same time, there is a need to assess individual CB indicators as a more affordable alternative for medical practice than the use of complex integral indicators. Our objective was to evaluate diagnostic efficacy of CRP and IL-6 levels as markers of acute and chronic systemic inflammation.

The data of patients with acute critical conditions of infectious and non-infectious genesis were analyzed to study acute systemic inflammation (SI), data of patients with autoimmune diseases, chronic organ failure and other chronic destructive diseases were analyzed to study chronic systemic inflammation (ChrSI). SIR severity was evaluated by the calculation of an integral index – reactivity level (RL). Differentiation of the inflammatory process to either classical inflammation (CI), or systemic inflammation was carried out using the previously proposed scale of SI, verification of chronic systemic inflammation was performed by means of ChrSI scale. SI (or ChrSI) was revealed in all groups of patients, and the frequency of SI registration in patients with acute conditions increased with development of multi-organ failure. The frequency of SIR was higher in all groups, thus confirming inability to equate these disorders. ROC analysis showed that CRP level had poor diagnostic efficacy on the development of SI/ChrSI ($AUC < 0.6$), and IL-6 level had very good diagnostic value ($AUC 0.8-0.9$). The prognostic value of the markers for detecting the SIR was higher, with AUC_{IL-6} exceeding AUC_{CRP} . Thus, IL-6 in many acute and chronic pathologies is sufficiently closer to integral indices than C-reactive protein with respect to diagnostic efficiency, and the dynamics of IL-6 in blood may be used to predict and evaluate complications associated with acute and chronic SI, as well as to prescribe and monitor the results of anticytokine therapy.

Keywords: systemic inflammation, systemic inflammatory response, C-reactive protein, IL-6

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (№ гос. регистрации 122020900136-4).

Введение

Воспалительные механизмы являются основой патогенеза большинства острых и хронических заболеваний. При этом понятие «воспаление» выходит за рамки канонических представлений о развитии воспалительного процесса [3], и мы выделяем системное воспаление (СВ) в самостоятельный вид общепатологического процесса, не эквивалентный системной воспалительной реакции (СВР) и тем более отличающийся от классического воспаления (КВ) [3]. Фабула острого СВ имеет характерные клинические признаки: рефрактерный шок, коагулопатия по типу диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, быстро прогрессирующая полиорганная недостаточность (ПОН). Однако важной проблемой являются начальные, пограничные проявления СВ, которые необходимо своевременно диа-

гностировать и дифференцировать от системных признаков других провоспалительных процессов. Еще более сложной задачей является верификация и определение клинической и патогенетической значимости хронического СВ, которое не имеет четких клинических эквивалентов.

Наибольшую трудность представляет собой дифференциация СВ и СВР, которая заключается в накоплении в плазме крови провоспалительных медиаторов [14]. Мы рассматриваем СВР как основной, но не единственный феномен сложного процессоконтекста СВ, а по интенсивности СВР отделяем КВ от СВ, а также выделяем переходные фазы процесса СВ [14].

Анализ литературных источников продемонстрировал, что системное воспаление отождествляется с повышением сывороточных уровней основных провоспалительных маркеров – острофазных белков и цитокинов (что методологически неверно). При этом особое внимание уделяется двум показателям – С-реактивному белку (CRP) и IL-6.

Основная роль CRP – распознавание и элиминация чужеродных патогенов, однако он участвует и в элиминации продуктов распада собственных клеток, а его синтез гепатоцитами возрастает при воспалительных процессах как инфекционного, так и неинфекционного генеза. Значения CRP, предлагаемые различными исследователями в качестве критерия идентификации СВ, варьируют в широком диапазоне: от 3-5 мг/л [2] при хронических заболеваниях и до 200 мг/л и выше при острых состояниях (сепсисе) [7]. При критических состояниях его уровень может служить предиктором летального исхода [8]. Повышение концентрации сывороточного CRP у пациентов с аутоиммунными воспалительными заболеваниями рассматривается в качестве предиктора кардиоваскулярной патологии [11] и коррелирует с ухудшением состояния пациентов [12].

Другой популярный среди клиницистов прогностический маркер СВ – провоспалительный цитокин IL-6, за счет плейотропности вовлекаемый в воспалительный процесс при разных нозологиях. Уровень IL-6 используется как прогностический показатель исхода сепсиса [9], однако его повышение не специфично к инфекционному воспалению и наблюдается также и при остром стерильном воспалении [4], и при хронических заболеваниях неинфекционного генеза [5, 10].

Цель исследования заключалась в оценке диагностической эффективности уровней CRP и IL-6 как маркеров развития острого и хронического системного воспаления.

Материалы и методы

Пациенты

Для изучения острого СВ были проанализированы данные пациенты с острыми критическими состояниями инфекционного и неинфекционного генеза, для изучения хронического СВ – данные пациентов с аутоиммунными заболеваниями, хронической органной недостаточностью и другими хроническими деструктивными заболеваниями.

1. Глубокие флегмоны голени – III-IV уровень поражения мягких тканей у военнослужащих, с признаками ПОН у всех пациентов (диапазон баллов по шкале SOFA от 2 до 5 баллов, средний балл – 3,6), лечение в хирургическом отделении (не в отделении интенсивной терапии (ОИТ)). Исследование проводилось сразу после хирургического лечения воспалительного очага (основной этиологический фактор – *Staphylococcus aureus*), n = 40, возраст – 20,4±2,4 года. Согласно консенсусу Sepsis-3 (2016), группа соответствует определению «сепсис», однако, в связи с различием клинической картины в сравнении с паци-

ентами других групп с сепсисом, данная группа представлена отдельно.

2. Сепсис-2 (консенсус Sepsis-2 (2001), под сепсисом понимали развитие синдрома СВР и наличие/подозрение инфекции); без признаков ПОН, лечение в ОИТ, обследование на 1-2-е сут. после госпитализации, n = 31, возраст – 37,6±18,4 лет, мужчин 63,3%, средний балл по шкале SOFA – 1,1, диапазон – 0÷2 балла.

3. Сепсис (Sepsis-3) 1-2-е сут. после поступления в ОИТ, n = 46, возраст – 47,1±16,6 лет, мужчин 60,9%, средний балл по SOFA – 5,5, диапазон – 2÷10 баллов. Исходные заболевания для всех групп больных сепсисом: пневмония, перитониты, акушерский сепсис и другие; все пациенты этой и других групп (Sepsis-3) проходили интенсивную терапию в ОИТ. Летальные исходы в 23,9% случаев (n = 11).

4. То же + септический шок (СШ), n = 14, возраст 49,1±17,8 лет, мужчин 57,1%, шкала SOFA 6÷14, средний балл – 9,75. Летальные исходы в 71,4% случаев (n = 10).

5. Сепсис-2 на 5-7-е сут. наблюдения, n = 12, возраст 41,1±17,3 лет, мужчин 58,3%, диапазон SOFA – 0÷2, средний балл – 0,75.

6. Сепсис (Sepsis-3) 5-7-е сут. после поступления в ОИТ, n = 13, возраст 40,2±14,2 лет, мужчин 61,5%, диапазон SOFA – 3÷10, средний балл – 5,7. Летальные исходы в 30,7% случаев (n = 4).

7. Третичный перитонит с ПОН (ТП ПОН) и затяжным подострым септическим процессом – более 14 дней с момента госпитализации в ОИТ, n = 34, возраст – 51,5±16,6 года, мужчин 58,8%, SOFA балл не рассчитывался. Летальные исходы в 29,4% случаев (n = 10).

8. То же + развитие СШ (ТП СШ), n = 17, возраст – 50,2±15,6 лет, мужчин 64,7%, SOFA не рассчитывалась. Летальные исходы (n = 16) в 94,1% случаев.

9. Политравма – острые множественные повреждения двух и более различных областей тела, требующие интенсивной терапии в ОИТ, без ПОН, 1-2-е сут. госпитализации, n = 25, возраст – 38,28±12,1 лет, мужчин 68,0%, диапазон SOFA – 0÷2, средний балл – 0,92.

10. То же с ПОН, n = 51, возраст – 37,8±14,9 года, мужчин 67,4%, диапазон SOFA – 2÷12, средний – 4,96. Летальные исходы (n = 11) в 21,6% случаев.

11. Политравма без ПОН на 5-7-е сут. наблюдения, n = 42, возраст – 40,4±13,3 лет, мужчин 70,7%, SOFA – 0÷3, средний балл – 0,74.

12. То же с ПОН, n = 18, возраст – 39,4±15,1 года, мужчин 64,7%, SOFA – 2÷16, средний балл – 6,75. Летальные исходы (n = 9) в 50,0% случаев.

13. То же, 10-е сут. наблюдения, $n = 22$, 1 пациент с ПОН и летальным исходом (4,54%), возраст – $37,9 \pm 12,6$ года, мужчин 52,0%. SOFA – 0 ± 3 , средний балл – 0,81.

14. Системная красная волчанка – СКВ ($n = 49$, возраст – $43,7 \pm 13,3$ лет, мужчин 6,1%, длительность заболевания – $11,9 \pm 9,4$ лет). Все пациенты соответствовали критериям American College of Rheumatology (1982).

15. Ревматоидный артрит ($n = 42$, возраст – $53,1 \pm 14,3$ лет, мужчин 9,5%, длительность заболевания – $7,1 \pm 7,4$ лет). Пациенты соответствовали критериям American College of Rheumatology (1987). 90,5% пациентов были серопозитивны.

16. Реактивный артрит, вызванный *Chlamydia trachomatis* ($n = 30$, возраст – $42,4 \pm 14,3$ лет, мужчин 39,3%).

17. Анкилозирующий спондилит ($n = 27$, возраст – $41,0 \pm 13,1$ лет, мужчин 85,2%). Диагноз АС основывался на модифицированных критериях АС (Нью-Йорк, 1984).

18. Псориатический артрит ($n = 12$, возраст – $52,9 \pm 6,1$ лет, мужчин 50%). Все пациенты соответствовали классификационным критериям CASPAR.

19. Хроническая ревматическая болезнь сердца – РБС ($n = 15$, возраст – $55,3 \pm 13,0$ лет, мужчин 14,3%). Все пациенты соответствовали критериям World Heart Federation (2012).

20. Хроническая сердечная недостаточность – ХСН ($n = 49$, возраст – $80,7 \pm 4,3$ лет, мужчин 73,5%). В исследование включались пациенты не моложе 70 лет, относящиеся к II-IV функциональному классу (согласно критериям NYHA), клинически стабильные.

21. Терминальная почечная недостаточность – ТПН ($n = 42$, возраст $45,4 \pm 13,9$ лет, мужчин 47,6%), обусловленная хроническим гломерулонефритом ($n = 22$), хроническим пиелонефритом ($n = 12$) и диабетической нефропатией ($n = 8$). Диагноз ТПН основывался на критериях K/DOQI (2002). Все пациенты получали заместительную терапию программным гемодиализом продолжительностью 12 часов в неделю. Длительность диализного стажа составила $63,0 \pm 9,6$ месяцев. Забор крови производился непосредственно перед сеансом гемодиализа.

22. Хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК), обусловленная атеросклеротическим повреждением общей бедренной артерии ($n = 38$, возраст $65,8 \pm 9,1$ лет, мужчин 67,6%). Все пациенты по классификации Rutherford имели III степень ХИНК. Забор крови производился на этапе подготовки к высокой ампутации бедра.

23. Вялогранулирующая рана ($n = 42$, возраст $19,4 \pm 0,5$ лет, мужчин 100%) обусловленная хирургическим лечением флегмоны голени (50,5%

случаев), микротравмами (44,5%) и рожистым воспалением (5%). Продолжительность гнойного процесса у всех пациентов превышала 90 дней, площадь повреждения составила 10-25 см².

24. Летальные исходы (ЛИ) – все пациенты с летальными из описанных выше групп №№ 1-13, $n = 71$.

Контрольная группа – доноры крови ($n = 50$, возраст $34,1 \pm 10,4$ года, мужчин 52%).

Группа сравнения – пожилые, не имеющие острых и обострений хронических заболеваний, системных деструктивных заболеваний ($n = 22$, возраст $68,5 \pm 5,8$ лет, мужчин 59,1%).

Используемые методы

Оценка выраженности СВР основывалась на расчете интегрального показателя – уровня реактивности – УР (определялся на основании значений сывороточных концентраций IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , CRP) [14]. Дифференциация воспалительного процесса КВ и СВ проводилась с помощью ранее предложенной нами шкалы СВ [13], верификация ХрСВ – с помощью шкалы ХрСВ [1]. Расчет шкал основывался на определении значений УР и уровней D-димеров, миоглобина, тропонина I, кортизола. Уровни всех молекулярных маркеров в плазме крови измеряли иммунохемилюминесцентным методом (Immulite, Siemens Medical Solutions Diagnostics, США).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программных пакетов SPSS for Windows 15.0 (SPSS Inc., США) и Statistica 12.0 (Stat Soft, Inc., США). Описательная статистика представлена: M – среднее значение, SD – стандартное отклонение. Корреляционные связи анализировали с помощью критерия Спирмена (r). Диагностическая эффективность оценивалась с помощью ROC-анализа. При интерпретации показателя площади под кривой (AUC – Area Under Curve) использовали общепризнанную экспертную шкалу [6]. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Частота регистрации СВ у пациентов с острыми состояниями повышалась в группах критических больных при развитии ПОН (до 82,35% в группе ТП ПОН) и СШ (100%) (табл. 1); обратная закономерность прослеживалась в отношении выявления КВ. Это свидетельствует об ассоциации наиболее тяжелых состояний с развитием СВ, однако не абсолютной. При этом частный феномен СВР в указанных группах регистрировался практически у всех пациентов, но он не специфичен к конкретной нозологии и исходу.

ТАБЛИЦА 1. ОПИСАТЕЛЬНАЯ СТАТИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП (M±SD)

TABLE 1. DESCRIPTIVE STATISTICS OF THE GROUPS (M±SD)

Группы Groups	IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	CRP, мг/дл CRP, mg/dL	УР RL	Регистрация феномена СВР, % SIR, %	Регист- рация КВ, % CI, %	Регист- рация СВ/ ХрСВ, % SI/ ChrSI, %
Доноры Donors	2,02±0,45	2,56±2,40	0,00±0,00	0	0	0
Пожилые Eldery	2,32±1,19	5,23±5,25	0,18±0,39	0	0	0
Травма без ПОН 1-2 Trauma 1-2	97,69±218,21	11,13±16,29	2,32±0,85	100	28,00	29,03
Травма ПОН 1-2 Trauma with MOD 1-2	322,14±540,18	83,22±165,51	3,10±0,90	100	1,96	76,47
Травма без ПОН 5-7 Trauma 5-7	68,79±114,91	20,92±16,76	2,14±0,72	100	57,14	7,14
Травма ПОН 5-7 Trauma with MOD 5-7	810,54±1751,68	254,89±244,73	2,72±0,96	100	0	55,56
Травма 10 Trauma 10	138,20±562,98	12,14±8,48	1,73±0,98	90,91	72,73	2,94
Сепсис-2 без ПОН 1-2 Sepsis-2 without MOD 1-2	621,34±1278,16	40,41±29,87	2,93±0,63	100	19,35	29,03
Сепсис-3 1-2 Sepsis-3 1-2	1680,48±3776,95	28,64±30,57	3,37±0,99	100	4,35	73,91
Сепсис-2 без ПОН 5-7 Sepsis-2 without MOD 5-7	24,92±19,05	13,66±17,39	1,83±0,72	100	58,33	0
Сепсис-3 5-7 Sepsis-3 5-7	322,35±510,42	19,62±13,04	3,38±0,65	100	0	100
Септический шок Septic Shock (SS)	4168,86±5289,08	25,34±16,44	4,14±0,77	100	0	100
Третичный перитонит ПОН Tertiary sepsis MODS	254,58±446,88	24,53±20,63	3,09±0,67	100	0	82,35
Третичный перитонит шок Septic shock tertiary sepsis	410,06±1376,55	20,62±20,57	2,71±0,59	100	0	100
Летальные Lethal outcomes	1636,64±3357,43	21,814±20,530	3,55±0,82	100	0	95,77
СКВ Systemic lupus erythematosus	548,63±1929,33	0,70±0,99	2,94±1,27	91,8	не опре- делялось not determined	75,5
Ревматоидный артрит Rheumatoid arthritis	14,61±18,22	2,07±2,65	0,93±0,78	69,0	не опре- делялось not determined	31,0

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Группы Groups	IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	CRP, мг/дл CRP, mg/dL	УР RL	Регистрация феномена СВР, % SIR, %	Регист- рация КВ, % CI, %	Регист- рация СВ/ ХрСВ, % SI/ ChrSI, %
Реактивный артрит Reactive arthritis	7,54±11,65	1,54±2,00	0,73±0,79	53,3	не опре- делялось not determined	20,0
Анкилозирующий спондилит Ankylosing spondylitis	5,47±5,46	1,82±1,96	0,78±0,80	55,5	не опре- делялось not determined	11,1
Псориатический артрит Psoriatic arthritis	8,88±7,55	1,64±1,58	0,83±0,72	66,7	не опре- делялось not determined	8,3
РБС Chronic rheumatic valvular heart disease	3,29±1,57	0,56±0,61	0,60±0,74	46,7	не опре- делялось not determined	13,3
ХСН Chronic heart failure	6,61±7,08	1,49±2,41	0,57±0,68	46,9	не опре- делялось not determined	2,0
ТПН End-stage renal disease	8,52±11,48	0,86±1,04	2,00±0,83	95,2	не опре- делялось not determined	88,1
ХИНК Chronic limb threatening ischaemia	16,89±17,29	5,91±4,68	1,68±0,74	94,7	не опре- делялось not determined	57,9
Вялогранулирующая рана Chronic nonhealing wounds	3,56±1,93	1,01±1,29	0,83±0,44	81,0	не опре- делялось not determined	9,5

Поэтому не корректно рассматривать СВР как аналог СВ, это один из его феноменов, что еще раз подтверждает необходимость интегральной оценки СВ как сложного процессокомплекса. ХрСВ регистрировалось в каждой из групп хронических пациентов, но с разной частотой (табл. 1).

Уровень CRP в среднем превышал норму (1 мг/дл) во всех группах больных с острыми состояниями (в 11-254 раза), пациенты с хроническими нозологиями, напротив, характеризовались нормальными значениями CRP или его незначительным повышением (до 6 раз в группе ХИНК). Особо можно выделить группу СКВ, в

которой выявлена максимальная частота развития ХрСВ при референсных средних значениях CRP.

Средние значения IL-6 также существенно превышали ПДЗ (5 пг/мл) во всех группах острых состояний (до 830 раз при септическом шоке), для хронических заболеваний характерно незначительное его повышение (до 3 раз) или нормальный уровень. Исключение составила СКВ, при которой уровень IL-6 достигал значений, характерных для острых критических состояний, а в некоторых случаях даже превышал их.

Кроме того, проведенный корреляционный анализ в объединенных группах «все острые» и

ТАБЛИЦА 2. ЗНАЧЕНИЯ ПЛОЩАДИ ПОД ROC-КРИВЫМИ ДЛЯ CRP И IL-6 ПРИ РЕГИСТРАЦИИ ВАРИАНТОВ СВ, СВР И ИСХОДОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 2. VALUES OF THE AREA UNDER THE ROC-CURVES FOR CRP AND IL-6 FOR SI, SIR, AND OUTCOMES IN THE GROUPS

Медиатор Mediator	Регистрируемый исход Recorded outcome	Острые Acute (n = 365)	Хронические Chronic (n = 346)	Все All patients (n = 711)
CRP	СВ/ХрСВ SI/ChrSI	0,581±0,030 (0,522-0,641) p = 0,007	0,599±0,033 (0,534-0,664) p = 0,002	0,603±0,022 (0,561-0,646) p < 0,0001
	СВР SIR	0,857±0,018 (0,821-0,893) p = 0,021	0,739±0,026 (0,687-0,790) p < 0,0001	0,857±0,014 (0,829-0,855) p < 0,0001
	Летальный исход Lethal outcomes	0,583±0,039 (0,507-0,659) p = 0,030	нет no	
IL-6	СВ/ХрСВ SI/ChrSI	0,863±0,019 (0,826-0,899) p < 0,0001	0,822±0,024 (0,775-0,868) p < 0,0001	0,808±0,017 (0,776-0,841) p < 0,0001
	СВР SIR	0,975±0,008 (0,958-0,991) p = 0,021	0,869±0,019 (0,832-0,905) p < 0,0001	0,940±0,009 (0,923-0,957) p < 0,0001
	Летальный исход Lethal outcomes	0,774±0,027 (0,724-0,827) p < 0,0001	нет no	

Примечание. Данные представлены как AUC±SD (min-max), p – статистическая значимость отличия AUC от 0,5.

Note. Data are presented as AUC±SD (min-max); p, statistical significance of difference in AUC from 0.5.

«все хронические» показал слабую связь как исследуемых показателей между собой ($r = 0,35$ и $r = 0,41$ соответственно, $p < 0,05$), так и взаимосвязь CRP с УР ($r < 0,4$, $p < 0,05$). Напротив, IL-6 хорошо отражает выраженность СВР по УР в обеих группах ($r = 0,82$ для «острых» и $r = 0,71$ для «хронических», $p < 0,05$).

Выявленные разнонаправленные изменения воспалительных маркеров ставят под сомнение возможность верификации СВ (особенно, хронического варианта) с помощью отдельных показателей. Для подтверждения данного вывода мы оценили диагностическую эффективность CRP и IL-6 в отношении развития острого и хронического вариантов СВ по значениям площадей под ROC-кривыми (AUC). В целом, диагностическая эффективность указанных маркеров схожа (табл. 2). Так, уровень CRP характеризовался неудовлетворительной диагностической эффективностью (AUC < 0,6), а IL-6 – очень хорошей (AUC 0,8-0,9). В отношении развития отдельного феномена СВР прогностическая ценность маркеров была выше, при этом AUC_{IL-6} (max. 0,975 в группе «острых») превышала AUC_{CRP}. При объединении пациентов с острыми и хроническими

нозологиями в одну группу тенденция сохранялась. Отметим, что прогностическая ценность CRP в отношении летальных исходов была неудовлетворительной, а IL-6 – хорошей (табл. 2).

Заключение

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии прогностической ценности CRP для верификации СВ и летальных исходов и довольно высокой диагностической эффективности IL-6, наиболее близкой к интегральным показателям, поэтому динамика IL-6 в крови может использоваться для прогнозирования и оценки осложнений, связанных с острым и хроническим СВ, а также для назначения и мониторинга результатов антицитокиновой терапии. Однако, учитывая сложность и динамику развития воспалительного процесса, наличие переходных и сложно трактуемых состояний между СВ и СВР как при острых, так и при хронических заболеваниях, для более подробного анализа процесса СВ требуется интегральная оценка всей феноменологической структуры СВ.

Список литературы / References

1. Гусев Е.Ю., Журавлева Ю.А., Зотова Н.В., Соломатина Л.В., Зубова Т.Э., Бражников А.Ю., Паньшина Е.В., Лазарева М.А. Острое и хроническое системное воспаление: сравнительный анализ // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2013. № 2. С. 98-103. [Gusev E.Yu., Zhuravleva J.A., Zotova N.V., Solomatina L.V., Zubova T.E., Brazhnikov A.Yu., Panshina E.V., Lazareva M.A. Acute and chronic systemic inflammation: comparative analysis. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2013, no. 2, pp. 98-103. (In Russ.)]
2. Dimitroulas T., Hodson J., Sandoo A., Smith J., Kitas G.D. Endothelial injury in rheumatoid arthritis: a crosstalk between dimethylarginines and systemic inflammation. *Arthritis Res Ther.*, 2017, Vol. 19, no. 1, 32. doi: 10.1186/s13075-017-1232-1.
3. Gusev E., Zhuravleva Y. Inflammation: A new look at an old problem. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 9, 4596. doi: 10.3390/ijms23094596.
4. Lasek-Bal A., Jedrzejowska-Szypulka H., Student S., Warsz-Wianecka A., Zareba K., Puz P., Bal W., Pawletko K., Lewin-Kowalik J. The importance of selected markers of inflammation and blood-brain barrier damage for short-term ischemic stroke prognosis. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2019, Vol. 70, no. 2. doi: 10.26402/jpp.2019.2.04.
5. Markoulaki D., Kostikas K., Papatheodorou G., Koutsokera A., Alchanatis M., Bakakos P., Gourgoulis K.I., Roussos C., Koulouris N.G., Loukides S. Hemoglobin, erythropoietin and systemic inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. J. Intern. Med.*, 2011, Vol. 22, no. 1, pp. 103-107.
6. Metz C.E. Fundamental ROC Analysis. Handbook of Medical Imaging, Volume 1. Physics and Psychophysics. Ed. Richard L. van Metter, Jacob Beutel, Harold L. Kundel., 2000, pp. 751-770.
7. Póvoa P., Coelho L., Almeida E., Fernandes A., Mealha R., Moreira P., Sabino H. C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2005, Vol. 11, no. 2, pp.101-108.
8. Qu R., Hu L., Ling Y., Hou Y., Fang H., Zhang H., Liang S., He Z., Fang M., Li J., Li X., Chen C. C-reactive protein concentration as a risk predictor of mortality in intensive care unit: a multicenter, prospective, observational study. *BMC Anesthesiol.*, 2020, Vol. 20, no. 1, 292. doi: 10.1186/s12871-020-01207-3.
9. Smok B., Domagalski K., Pawłowska M. Diagnostic and prognostic value of IL-6 and sTREM-1 in SIRS and sepsis in children. *Mediators Inflamm.*, 2020, Vol. 2020, 8201585. doi: 10.1155/2020/8201585.
10. Solus J.F., Chung C.P., Oeser A., Li C., Rho Y.H., Bradley K.M., Kawai V.K., Smith J.R., Stein C.M. Genetics of serum concentration of IL-6 and TNF α in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a candidate gene analysis. *Clin. Rheumatol.*, 2015, Vol. 34, no. 8, pp. 1375-1382.
11. Zhang J., Chen L., Delzell E., Muntner P., Hillegass W.B., Safford M.M., Millan I.Y., Crowson C.S., Curtis J.R. The association between inflammatory markers, serum lipids and the risk of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2014, Vol. 73, no. 7, pp. 1301-1308.
12. Zhang W., Tang Z., Shi Y., Ji L., Chen X., Chen Y., Wang X., Wang M., Wang W., Li D. Association between gamma-glutamyl transferase, total bilirubin and systemic lupus erythematosus in chinese women. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 682400. doi: 10.3389/fimmu.2021.682400.
13. Zotova N.V., Chereshev V.A., Gusev E.Yu. Systemic inflammation: methodological approaches to identification of the common pathological process. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 5, e0155138. doi: 10.1371/journal.pone.0155138.
14. Zotova N.V., Zhuravleva Y.A., Zubova T.E., Gusev E.Y. Integral estimation of systemic inflammatory response under sepsis. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2020, Vol. 39, no. 1, pp. 13-26.

Авторы:

Журавлева Ю.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Зотова Н.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Соломатина Л.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Zhuravleva Yu.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Zotova N.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Solomatina L.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 16.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 16.05.2022
Accepted 29.05.2022

ИНТЕРФЕРОНЫ III ТИПА ПРИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ДЕТЕЙ

Изюрова Н.В., Савочкина А.Ю., Узунова А.Н., Никушкина К.В.

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

Резюме. Актуальность внебольничной пневмонии обусловлена широкой распространенностью в детской практике в связи с высоким уровнем заболеваемости и смертности от данной патологии. Большое значение в развитии внебольничной пневмонии играет противoinфекционная защита, в первую очередь состояние врожденного иммунитета, в том числе клеточного и гуморального. Среди факторов врожденного иммунитета важную роль занимают цитокины, являющиеся важнейшими медиаторами, которые контролируют и регулируют иммунные и воспалительные реакции через сложные сети и служат биомаркерами многих заболеваний. Один цитокин может секретироваться различными клетками и обладать как провоспалительной, так и противовоспалительной активностью в зависимости от контекста, вызывая множественные иммунные ответы. Среди цитокинов значимая роль принадлежит интерферонам, которые являются одними из факторов врожденного иммунитета. В работе проведено определение уровня интерферонов III типа (IFN- λ 2 (IL-28A) и IFN- λ 3 (IL-28B)) в сыворотке крови у 117 детей с внебольничной пневмонией в возрасте от 1 года до 18 лет с рентгенологически подтвержденным диагнозом внебольничной пневмонии, госпитализированные в отделения респираторных инфекций МБУЗ ДГКБ № 7 и МАУЗ ДГКБ № 8 в г. Челябинска. Все дети были представлены 3 возрастными группами согласно общепринятым критическим периодам развития иммунной системы: дети с 1 года до 3 лет, с 4 до 7 лет и с 8 до 18 лет. Группа сравнения была сформирована при плановой диспансеризации здоровых детей и составила 28 детей, не имеющих на момент обследования признаков острой респираторной вирусной инфекции и не состоящих на диспансерном учете по поводу хронической патологии. Целью данного исследования явилось определение концентрации интерферонов III типа в сыворотке крови у детей разного возраста с внебольничной пневмонией и оценка изменения показателей в зависимости от тяжести заболевания.

По результатам исследования было выявлено, что у детей с ВП концентрация интерферонов III типа, в частности IFN λ 2 (IL-28A) и IFN λ 3 (IL-28B), была достоверно выше в группе детей с тяжелой пневмонией. Выявлены существенные отличия в концентрации интерферонов III типа у детей в разных возрастных группах, что, возможно, связано с особенностью активации иммунной системы в разные возрастные периоды и незрелостью иммунной системы у детей.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, дети, врожденный иммунитет, цитокины, интерфероны III типа, IFN λ .

Адрес для переписки:

Изюрова Наталья Владимировна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (963) 081-46-78.
E-mail: Natusaz@live.ru

Address for correspondence:

Iziurova Natalia V.
South Ural Medical State University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (963) 081-46-78.
E-mail: Natusaz@live.ru

Образец цитирования:

Н.В. Изюрова, А.Ю. Савочкина, А.Н. Узунова,
К.В. Никушкина «Интерфероны III типа при
внебольничной пневмонии у детей» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 181-186.
doi: 10.46235/1028-7221-1118-ТII
© Изюрова Н.В. и соавт., 2022

For citation:

N.V. Iziurova, A.Yu. Savochkina, A.N. Uzunova,
K.V. Nikushkina "Type III interferons in community-acquired
pneumonia in children", Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2,
pp. 181-186. doi: 10.46235/1028-7221-1118-TII
DOI: 10.46235/1028-7221-1118-TII

TYPE III INTERFERONS IN COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN CHILDREN

Iziurova N.V., Savochkina A.Yu., Uzunova A.N., Nikushkina K.V.

South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. The relevance of community-acquired pneumonia is due to its widespread prevalence in pediatric practice, due to high level of morbidity and mortality in this pathological condition. Anti-infectious protection is of great importance in prevention of community-acquired pneumonia, primarily, the state of innate immunity, including cellular and humoral immune response. Among the factors of innate immunity, cytokines play an important role, being the most important mediators that control and regulate immune and inflammatory responses *via* complex networks and serve as biomarkers of many diseases. A single cytokine may be secreted by different cells and exhibit both pro-inflammatory and anti-inflammatory activity, depending on its context, thus causing multiple immune responses. Among cytokines, interferons play a significant role, being among sufficient factors of innate immunity. The study determined the level of type III interferons (IFN λ 2 (IL-28A) and IFN λ 3 (IL-28B)) in blood serum of 117 children with community-acquired pneumonia aged 1 to 18 years with an X-ray confirmed diagnosis of community-acquired pneumonia, hospitalized at the Departments of Respiratory Infections at the Pediatric Clinical Hospitals No.7 and 8 in Chelyabinsk. All children were represented by 3 age groups, according to the generally accepted critical periods of immune system maturation, i.e., 1 to 3 years old; 4 to 7, and 8 to 18 years old. The comparison group was recruited during routine medical examination of healthy children and consisted of 28 subjects who did not show any signs of acute respiratory viral infection at the time of examination, and had no detectable chronic diseases. The purpose of this study was to determine the concentration of type III interferons in blood serum of children with community-acquired pneumonia at different ages, and to assess changes in indices, depending on the severity of the disease. According to the results of the study, we have revealed that the serum concentrations of type III interferons, in particular, IFN λ 2 (IL-28A) and IFN λ 3 (IL-28B) among the children with community-acquired pneumonia, were significantly higher in the subgroup of children with severe pneumonia. Significant differences in concentrations of type III interferons were shown for the children in different age groups, which may be due to peculiar features of immune system activation at different age periods and immaturity of immune system in children.

Keywords: community-acquired pneumonia, children, immunity, innate, cytokines, type III interferon, IFN λ .

Введение

Внебольничная пневмония (ВП) у детей представляет собой весьма актуальную проблему педиатрии в связи с высоким уровнем заболеваемости и смертности. До настоящего времени ВП считается одной из наиболее частых причин смерти детей в возрасте до 5 лет повсеместно [1, 3].

Внебольничная пневмония является инфекционным заболеванием и в большинстве случаев имеет вирусно-бактериальную природу [10]. Имеется большое количество исследований, посвященных изучению влияния факторов иммунной защиты, участвующих в патогенезе развития воспаления в легочной ткани. Одними из значи-

мых факторов врожденного иммунитета у детей являются интерфероны, участвующие наряду с другими цитокинами в защите от вирусной и бактериальной инфекции [5, 8].

Интерфероны – это широкий класс цитокинов, которые вырабатываются в организме человека при проникновении различных патогенов. Разделенные на три класса: тип I, тип II и тип III, все интерфероны имеют общую способность вызывать противовирусную активность, инициируемую взаимодействием с их родственными рецепторами [8].

В литературе имеются сведения о влиянии интерферонов I, II типа на клиническое течение и тяжесть состояния у детей с ВП [5, 7, 8]. В по-

следние годы придается значение интерферонам III типа как факторам, влияющим на тяжесть течения инфекционного процесса. Интерфероны типа III (IFN λ 1, IFN λ 2 и IFN λ 3) производятся эпителиальными клетками дыхательных путей в ответ на вирусную инфекцию и играют роль в устранении вирусной инфекции и обеспечивает защиту дыхательных путей [4].

Однако исследований по изучению интерферонов III типа у детей разного возраста с ВП в доступной литературе недостаточно. Также отсутствуют работы, отражающие изменения показателей IFN λ 2, IFN λ 3 при ВП различной степени тяжести в детском возрасте. Учитывая роль интерферонов в противомикробной защите, нами была определена концентрация IFN λ в сыворотке крови у детей с внебольничной пневмонией различной степени тяжести.

Цель – определить концентрацию интерферонов III типа в сыворотке крови у детей разного возраста с внебольничной пневмонией и оценить изменения показателей в зависимости от тяжести заболевания.

Материалы и методы

Работа проведена на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии, клинической лабораторной диагностики, кафедре пропедевтики детских болезней и педиатрии и в НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральского государственного медицинского университета» Министерства здравоохранения Российской Федерации. В исследование вошли 117 детей в возрасте от 1 года до 18 лет с рентгенологически подтвержденным диагнозом внебольничной пневмонии, госпитализированные в отделения респираторных инфекций МБУЗ ДГКБ № 7 и МАУЗ ДГКБ № 8 в г. Челябинска. Все дети были представлены 3 возрастными группами согласно общепринятым критическим периодам развития иммунной системы: дети с 1 года до 3 лет, с 4 до 7 лет и с 8 до 18 лет [2].

Группа сравнения сформирована при плановой диспансеризации здоровых детей и составила 28 детей, не имеющих на момент обследования признаков острой респираторной вирусной инфекции и не состоящих на диспансерном учете по поводу хронической патологии. Все дети были сопоставимы по полу и возрасту.

В ходе статистического анализа дети были разделены на 2 клинические группы: дети с ВП нетя-

желой (88 детей) и дети с тяжелой ВП (29 детей). Для оценки тяжести пациентов с ВП использованы критерии степени тяжести у детей с внебольничной пневмонией, представленные в клинических рекомендациях 2022 года, утвержденные Союзом педиатров России. Критериями тяжести ВП считаются: дыхательная недостаточность II и более степени, центральный цианоз или SpO₂ < 90%, системные опасные признаки, наличие осложнений [1].

По данным нашего исследования среди детей с тяжелой пневмонией 86,2% имели признаки дыхательной недостаточности. Медиана насыщения периферических капилляров кислородом (SpO₂) составила 92% (80-97%). Медиана прокальцитонина у детей с тяжелой ВП составила 4,0 нг/мл (1,2-8), 16 детей (55,2%) имели СРБ \geq 40 мг/л и 6 детей (20,7%) имели СРБ \geq 80 мг/л.

Для определения уровня цитокинов IFN λ 2 (IL-28A) и IFN λ 3 (IL-28B) в сыворотке крови использована тест система OmniKine™ ELISA Kit (Assay Biotechnology Company, Inc. Fremont, США). Исследование проводилось по методикам, приложенным к тест-системам. Эти тест-системы основаны на «сэндвич»-методе твердофазного ИФА с применением пероксидазы в качестве индикаторного фермента. Учет результатов проводили на ИФА анализаторе. Результаты выражались в пг/мл.

Обработка полученных результатов выполнена с помощью статистических программ в пакете IBM SPSS (v. 23). В ходе статистической обработки рассчитывали медианы и квартили, сравнение групп проводили с помощью критерия Краскела–Уоллиса. Для апостериорных групп использовали критерий Данна с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали эффекты при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты сравнительного анализа концентрации интерферонов в сыворотке крови у детей с ВП и в группе сравнения представлены в таблице 1.

При сравнении показателей концентрации IFN λ 2 (IL-28A) и IFN λ 3 (IL-28B) выявлено, что показатели были достоверно увеличены независимо от степени тяжести пневмонии ($p_{A-B, C}$). При сравнении групп детей с нетяжелой и тяжелой пневмонией мы обнаружили, что концентрации IFN λ 2 (IL-28A) и IFN λ 3 (IL-28B) достоверно от-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ (пг/мл) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ДЕТЕЙ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ И В ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATION OF CYTOKINES (pg/mL) IN THE BLOOD SERUM OF CHILDREN WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA AND IN THE COMPARISON GROUP, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокины (пг/мл) Cytokines (pg/mL)	Группа сравнения (А) Comparison group (A) (n = 28)	Нетяжелая пневмония (В) Non-Severe Pneumonia (B) (n = 88)	Тяжелая пневмония (С) Severe Pneumonia (C) (n = 29)
IFN-λ2 (IL-28A)	12,8 (6,7-379,9)	494,9 (5,4-8218,6) (p_{A-B, C} < 0,001)	1061,2 (4,05-3152,60) (p_{B-C} = 0,012)
IFN-λ3 (IL-28B)	13,6 (5,4-21,6)	20,4 (10,1-2090,5) (p_{A-B, C} < 0,001)	26,3 (3,9-70,7) (p_{B-C} = 0,004)

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия. p_{A-B, C} – различия между исследуемыми показателями группы А и группы В, С; p_{B-C} – различия между исследуемыми показателями группы В и группы С.

Note. Statistically significant differences are highlighted in bold. p_{A-B, C}, differences between the studied indicators of group A from group B, C; p_{B-C}, differences between the studied indicators of group B from group C.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ (пг/мл) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ДЕТЕЙ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ И В ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ В РАЗЛИЧНЫЕ ВОЗРАСТНЫЕ ПЕРИОДЫ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CONCENTRATION OF CYTOKINES (pg/mL) IN THE BLOOD SERUM OF CHILDREN WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA AND IN THE COMPARISON GROUP AT DIFFERENT AGE PERIODS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Возрастная группа, лет Age of children, years	Группа сравнения (А) Comparison group (A) (n = 6, 9, 13)	Нетяжелая пневмония (В) Non-Severe Pneumonia (B) (n = 29, 21, 38)	Тяжелая пневмония (С) Severe Pneumonia (C) (n = 12, 10, 7)
IFN-λ2 (IL-28A)			
1-3	12,8 (6,7-12,8)	506,7 (14,1-1506,7) (p_{A-B, C} < 0,001)	1025,1 (24,3-3152,6)
4-7	9,797 (6,70-12,73)	473,03 (12,8-8218,6) (p_{A-B, C} < 0,001)	1061,2 (240,9-2572,5)
8-18	379,9 (6,7-379,9)	463,6 (5,4-4550,6) (p_{A-B, C} < 0,001)	2332,06 (148,3-2637,4) (p_{B-C} = 0,042)
IFN-λ3 (IL-28B)			
1-3	5,4 (5,4-15,4)	22,8 (10,1-2090,5) (p_{A-B, C} < 0,001)	25,6 (15,8-36,9)
4-7	5,4 (5,4-15,4)	22,2 (12,3-410,9) (p_{A-B, C} < 0,001)	29,1 (22,8-53,7) (p_{B-C} = 0,024)
8-18	21,6 (5,4-21,6)	19,5 (13,4-1722,6)	22,07 (5,4-70,7)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for table 1.

личаются (p_{B-C}), что может отражать тяжесть течения инфекционного процесса и согласуется с другими исследованиями при пневмонии [7].

Далее был проведен анализ между показателями концентрации цитокинов у детей с ВП и в группе сравнения в различные возрастные периоды (табл. 2).

В возрастной группе детей с 1 года до 3 лет и с 4 до 7 лет с ВП независимо от степени тяжести концентрация IFN λ 2 (IL-28A) и IFN λ 3 (IL-28B) имели гораздо более высокие показатели, тогда как у детей старшего возраста с 8 до 18 лет изменялась концентрация IFN λ 2 (IL-28A) ($p_{A-B, C}$). При рассмотрении показателей концентрации интерферонов в зависимости от тяжести заболевания было установлено, что достоверные различия имеются в группе детей с 4 до 7 лет по IFN λ 3 и в группе детей с 8 до 18 лет по показателю IFN λ 2 (IL-28A) (p_{B-C}).

Проблемами в интерпретации концентраций интерферонов у детей являются отсутствие установленных нормальных диапазонов и ограниченные знания о возрастных различиях. По данным некоторых исследований, имеются существенные отличия в концентрации цитокинов в плазме крови детей раннего возраста и старшей возрастной группы, что может быть связано с особенностью активации иммунной системы в разные возрастные периоды и незрелостью иммунной системы у детей раннего возраста [6].

В литературе имеются сведения, что IFN λ ограничивает распространение вируса внутри организма и является мощным регулятором адаптивных иммунных реакций, которые инициируются в тканях слизистой оболочки. IFN λ , по-видимому, играет такую же важную роль в защите от патогенов, как и интерфероны I и II типа, и функционирует избирательно на поверхности слизистых оболочек дыхательных путей. В этих местах IFN λ обеспечивает врожденный иммунитет и регулирует активность адаптивного звена иммунной системы [9].

Выводы

Таким образом, по результатам нашего исследования выявлено, что концентрация в сыворотке крови интерферонов III типа, в частности, IFN λ 2 (IL-28A) и IFN λ 3 (IL-28B), увеличивается при внебольничной пневмонии у детей более выражено при тяжелой форме данной патологии. Существенное нарастание концентрации интерферонов III типа зависит от возраста пациентов. Отмечено отсутствие увеличения концентрации IFN λ 2 (IL-28A) и IFN λ 3 (IL-28B) в сыворотке крови у детей в возрастной группе с 1 года до 3 лет, что, по-видимому, связано с незрелостью иммунной системы у детей раннего возраста по сравнению с детьми из старшей возрастной группы.

Список литературы / References

1. Пневмония (внебольничная). Оригинал-макет, 2022. 82 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/714_1. [Pneumonia (community-acquired). Original layout, 2022, 82 p. [Electronic resource]. Access mode: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/714_1.
2. Хаитов Р.М. Иммунология: учебник. 4-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. 520 с. [Khaitov R.M. Immunology. 4th edition, rev. and suppl.]. Moscow: GEOTAR-Media, 2021. 520 p.
3. Global Health Observatory. Proportions of child death by cause. WHO, Geneva Accessed on 24 July 2014. Available at: http://www.who.int/gho/child_health/en/index.html.
4. Fukuda Y., Homma T., Inoue H., Onitsuka C., Ikeda H., Goto Y., Sato Y., Kimura T., Hirai K., Ohta S., Yamamoto M., Kusumoto S., Suzuki S., Tanaka A., Sagara H. Downregulation of type III interferons in patients with severe COVID-19. *J. Med. Virol.*, 2021, Vol. 93, no. 7, pp. 4559-4563.
5. Haugen J., Chandyo R.K., Brokstad K.A., Mathisen M., Ulak M., Basnet S., Valentiner-Branth P., Strand T.A. Cytokine concentrations in plasma from children with severe and non-severe community acquired pneumonia. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 9, e0138978. doi: 10.1371/journal.pone.0138978.
6. 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.
7. Major J., Crotta S., Llorian M., McCabe T.M., Gad H.H., Priestnall S.L., Hartmann R., Wack A. Type I and III interferons disrupt lung epithelial repair during recovery from viral infection. *Science*, 2020, Vol. 369, no. 6504, pp. 712-717.

8. Negishi H., Taniguchi T., Yanai H. The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2018, Vol. 10, no. 11, a028423. doi: 10.1101/cshperspect. a028423.
9. Ye L., Schnepf D., Staeheli P. Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2019, Vol. 19, no. 10, pp. 614-625.
10. Yun K.W., Wallihan R., Juergensen A., Mejias A., Ramilo O. Community-acquired pneumonia in children: myths and facts. *Am. J. Perinatol.*, 2019, Vol. 36, no. S 02, pp. S54-S57.

Авторы:

Изюрова Н.В. — ассистент кафедры пропедевтики детских болезней и педиатрии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Савочкина А.Ю. — д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Узунова А.Н. — д.м.н., профессор кафедры пропедевтики детских болезней и педиатрии 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

Authors:

Iziurova N.V., Assistant Professor, Department of Propaedeutics of Children's Diseases and Pediatrics, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Savochkina A. Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Uzunova A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Propaedeutics of Children's Diseases and Pediatrics, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

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

Поступила 13.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 13.05.2022
Accepted 29.05.2022

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ НЕГО

**Каримов И.Ф., Корнеев А.Г., Борисов С.Д., Носырева С.Ю.,
Ушакова А.А., Панькова А.А., Паньков А.С.**

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

Резюме. Формирование специфического гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 обусловлено образованием нейтрализующих IgG, способных в первую очередь блокировать рецептор-связывающий домен S-белка вируса. К тому же важную роль играет длительность сохранения постинфекционного иммунитета, а также avidность циркулирующих антител. Целью данной работы стала оценка количества антител к S-белку SARS-CoV-2, их avidности и нейтрализующей активности в исследуемой выборке переболевших и вакцинированных серопозитивных лиц.

Была изучена выборка из 113 лиц, сформировавшие три экспериментальные группы: переболевшие, вакцинированные, переболевшие и вакцинированные. Сыворотка крови респондентов была изучена на наличие специфических IgG к SARS-CoV-2 с определением их количества (в BAU/мл) с использованием наборов АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия). Индекс avidности определяли с помощью набора производства «МедипалТех» (г. Дубна, Россия). Оценку нейтрализующей способности антител проводили иммуноферментным методом с помощью набора производства «МедипалТех» (г. Дубна, Россия), результатом которого является процент нейтрализованных S-белков, специфичных к RBD.

Средние значения количества IgG в группах «переболевшие» и «вакцинированные» не продемонстрировали значимых отличий, однако оба показателя были достоверно ниже, чем аналогичный показатель группы «переболевшие и вакцинированные». Наблюдалась цикличность изменения количества антител, при этом наиболее интенсивное падение уровня иммуноглобулинов было зарегистрировано за первые четыре месяца после болезни или вакцинации. При изначально равных уровнях показателей в обеих группах, темпы снижения этого показателя в группе «вакцинированные» значительно выше, чем в группе «переболевшие», что позволяет сделать вывод о снижении количества специфических антител в этой группе до нулевых величин уже к 10-му месяцу. В группе «переболевшие и вакцинированные» показатель IgG оставался неизменным за весь срок сбора анамнеза. Индекс avidности антител у вакцинированных лиц был выше, чем у переболевших лиц, при этом в обеих группах данный показатель характеризовался стабильным ростом в рассматриваемом временном интервале от 7 до 11 месяцев. Отмечены наиболее высокие показатели уровня антител и индекса

Адрес для переписки:

Каримов Ильшат Файзелгаянович
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
460048, Россия, г. Оренбург, Шарлыкское шоссе, 5.
Тел.: 8 (912) 842-15-23.
E-mail: ifkarimov@yandex.ru

Address for correspondence:

Karimov Ilshat F.
Orenburg State Medical University
460048, Russian Federation, Orenburg, Sharlyk highway, 5.
Phone: 7 (912) 842-15-23.
E-mail: ifkarimov@yandex.ru

Образец цитирования:

И.Ф. Каримов, А.Г. Корнеев, С.Д. Борисов, С.Ю. Носырева, А.А. Ушакова, А.А. Панькова, А.С. Паньков «Сравнительная оценка основных показателей гуморального иммунного ответа лиц, перенесших COVID-19 и вакцинированных против него» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 187-194. doi: 10.46235/1028-7221-1105-III
© Каримов И.Ф. и соавт., 2022

For citation:

I.F. Karimov, A.G. Korneev, S.D. Borisov, S.Yu. Nosyreva, A.A. Ushakova, A.A. Pankova, A.S. Pankov "Humoral immunity in reconvalescents and persons vaccinated against COVID-19: A comparative assessment of the main indices of the humoral immune response", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 187-194. doi: 10.46235/1028-7221-1105-III
DOI: 10.46235/1028-7221-1105-III

их avidности в группе переболевших и вакцинированных лиц, что определяется наиболее полной активацией иммунной системы. Выявлена прямолинейная тенденция динамики снижения показателя нейтрализующей активности за рассматриваемый временной промежуток. Общая картина полученных результатов свидетельствует о том, что нейтрализующая активность антител в большей степени определяется количеством специфичных к SARS-CoV-2 иммуноглобулинов. Таким образом, выявлена динамика изменения уровня антител к SARS-CoV-2 в различных группах обследуемых лиц, установлена прямая взаимосвязь между нейтрализующей активностью и количеством иммуноглобулинов, а также роль вакцинации в повышении avidности антител.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, гуморальный ответ, антитела, avidность, нейтрализующая активность, вакцина, SARS-CoV-2, COVID-19

HUMORAL IMMUNITY IN RECONVALESCENTS AND PERSONS VACCINATED AGAINST COVID-19: A COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE MAIN INDICES OF THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE

Karimov I.F., Korneev A.G., Borisov S.D., Nosyreva S.Yu.,
Ushakova A.A., Pankova A.A., Pankov A.S.

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Abstract. Specific humoral immunity to SARS-CoV-2 develops due to the formation of neutralizing IgG, which can primarily block the receptor-binding domain of the viral S-protein. The duration of post-infection immunity, as well as avidity of circulating antibodies, play an important role in this process. The aim of this work was to evaluate the amounts of antibodies to SARS-CoV-2 S-protein, their avidity and neutralizing activity in the studied samples of the post-COVID patients versus vaccinated seropositive individuals. Materials and methods. A sample of 113 individuals was studied, which consisted of three experimental groups, i.e.: recovered, vaccinated, as well as recovered and vaccinated persons. Blood serum specimens of the individuals were studied for specific IgG to SARS-CoV-2, along with determination of their quantities (BAU/mL) using Vector-Best kits (Novosibirsk, Russia). The avidity index was determined using a kit manufactured by MedipalTech (Dubna, Russia). Neutralizing ability of the antibodies was assayed by means of ELISA with diagnostic kits from MedipalTech (Dubna, Russia), which resulted into percentage of neutralized S-proteins to RBD. Results. The average levels of IgG did not show significant differences between convalescents and vaccinated persons. However, both indicators were significantly lower than those from the groups who recovered from the disease and were vaccinated. A cyclic change in the numbers of antibodies was observed, along with most intensive drop in the level of immunoglobulins over first four months after the illness or vaccination. Despite initially similar levels of immune parameters in both groups, the decline of this index in “vaccinated” group was significantly higher than in the “recovered” group, thus allowing us to conclude that the amounts of specific antibodies in this group was shown to be decreased to zero levels as soon as by the 10th month. IgG index among the «recovered and vaccinated» groups remained unchanged for the entire anamnestic period. Avidity index of the antibodies in vaccinated individuals was higher than in recovered individuals. Meanwhile, this index in both groups was characterized by stable increase over the observation period of 7 to 11 months. The highest levels of antibodies and their avidity were noted in the group of recovered and vaccinated individuals, due to the most complete activation of the immune system. A straight-line trend was revealed for the decreasing index of neutralizing activity during the considered time period. The overall pattern of these results shows that the neutralizing activity of antibodies is largely determined by the amounts of SARS-CoV-2-specific immunoglobulins. Thus, the time dynamics of antibodies to SARS-CoV-2 in various groups of examined individuals was revealed. Direct correlation was established between the neutralizing activity and amounts of immunoglobulins, as well as the role of vaccination for increased avidity of antibodies.

Keywords: coronavirus infection, humoral immunity, antibodies, avidity, neutralizing activity, vaccine, SARS-CoV-2, COVID-19

Введение

Распространение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в мире потребовало значительных усилий по созданию и развитию диагностических систем. При этом наиболее распространенными методами исследования данного заболевания в рутинной лабораторной практике остаются ПЦР-исследование в режиме реального времени и оценка гуморального звена иммунитета [1, 6]. Согласно отчету ВОЗ от 29 марта 2022 года, было обнаружено пять подтипов вируса SARS-CoV-2, характеризующихся изменениями в структуре рецептор-связывающего домена (receptor-binding domain, RBD), повышающих родство к ангиотензинпревращающему ферменту 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) (КФ:3.4.17.23): альфа (B.1.1.7), бета (B.1.351), гамма (P.1), дельта (B.1.167.2), омикрон (B.1.1529), а также восемь подтипов с усиленной вирулентностью или трансмиссивностью, уменьшенной чувствительностью к нейтрализующим антителам и иными свойствами [4].

В ответ на поступление вируса в организм, иммунная система отвечает выработкой антител к различным антигенам и эпитопам SARS-CoV-2, включая нуклеокапсидный (N) белок, белки оболочки (E) и мембраны (M), а также шиповидный (S) белок (в том числе рецептор-связывающий домен, RBD) [15]. Последний считается ключевой мишенью для нейтрализации вируса, в связи с чем многие тест-системы оценивают уровень антител к рецептор-связывающему домену [12]. Картина продукции антител при COVID-19 характеризуется практически в одновременном образовании IgM и IgG на 5-10 день заболевания [14]. Длительность постинфекционного иммунитета по разным оценкам варьирует от 6 до 8 месяцев [5]. Формирование искусственного иммунитета к SARS-CoV-2 оказалось возможным с использованием инактивированных цельновирионных, векторных, субъединичных, РНК-вакцин и других типов [9]. Оценка количества IgG, специфичных к S-белку коронавируса, свидетельствует о формировании специфического гуморального поствакцинального иммунитета [7].

Одними из ключевых критериев эффективности работы иммуноглобулинов против вирусных частиц являются показатели авидности и нейтрализующей активности. В случае с SARS-CoV-2, они отражают способность антител надежно связываться с рецептор-связывающим доменом S-белка и блокировать проникновение вируса в клетку [2]. Было показано, что даже при наличии высокого уровня анти-RBD антител возможно развитие тяжелых поражений организма, вплоть до летального исхода [13], однако при этом сто-

ит учитывать роль сопутствующих заболеваний и внешних факторов. Авидность повышается в первые двадцать дней после контакта с возбудителем, а высокий уровень данного показателя коррелирует с выраженной нейтрализующей активностью антител, однако для диапазона средних значений подобная зависимость не столь очевидна [3].

Целью данной работы стала оценка количества антител к S-белку SARS-CoV2, их авидности и нейтрализующей активности в исследуемой выборке переболевших и вакцинированных серопозитивных лиц.

Материалы и методы

Материалом для исследования являлась сыворотка крови от 113 лиц, сформировавших три группы: I группа – «переболевшие» (n = 52), II группа – «вакцинированные» (n = 28), III группа – «переболевшие и вакцинированные» (n = 33). Последнюю группу составили лица, на момент вакцинации уже имеющие в анамнезе перенесенное заболевание (COVID-19), а срок наблюдения в этой группе исчислялся с момента перенесенного заболевания.

Все три группы составили лица мужского и женского пола. Средний возраст исследуемого контингента – $45,7 \pm 2,0$ лет (от 18 до 79 лет). Значимых различий в оценке среднего возраста между группами выявлено не было ($p > 0,05$). Все лица имели в анамнезе либо заболевание (COVID-19), либо профилактическую двухкомпонентную вакцину «Спутник V». Давность этих событий колебалась от 1 до 11 месяцев. Исследование проводилось в октябре 2021 года.

Формирование выборки серопозитивных лиц осуществляли путем оценки количества специфических IgG к SARS-CoV-2 иммуноферментным методом с помощью набора «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия) по инструкции производителя с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора PST-60HL-4 (BioSan, Латвия), промывателя планшетов HydroFlex (Tecan, Австрия) и фотометра Infinite 50 (Tecan, Австрия). Результат исследования выражался в ВАУ/мл (binding antibody units). Определение индекса авидности антител осуществляли иммуноферментным методом с использованием набора производства «МедипалТех» (г. Дубна, Россия), рассчитываемый как соотношение оптических плотностей в лунках с добавлением дестабилизирующего агента и без него. Оценка нейтрализующей способности антител проводили иммуноферментным методом с помощью набора производства «МедипалТех» (г. Дубна, Россия), результатом которого является процент нейтрализованных S-белков, специфичных к RBD.

Для оцениваемых показателей рассчитывались средние арифметические значения и ошибка ($M \pm m$). Достоверность различия показателей (ДРП) проводилась с помощью *t*-критерия Стьюдента. Проводился регрессионный анализ ($y = bx + a$), а также рассчитывался темп прироста тенденции (Тпр, %) с последующей оценкой ее достоверности.

Результаты и обсуждение

На первом этапе сравнительная оценка показателей проводилась за срок 7 месяцев, поскольку в сравниваемых группах максимальная давность перенесенного заболевания составила 11 месяцев, а вакцинации – семь месяцев.

Средние значения количества IgG в группах «переболевшие» и «вакцинированные» не продемонстрировали значимых отличий, однако оба показателя были достоверно ниже, чем аналогичный показатель группы «переболевшие и вакцинированные». Во всех трех группах в течение первого месяца показатель определялся примерно на одном уровне ($p > 0,05$ во всех парах сравнения), но по исходу седьмого месяца показатели I и II групп были значительно ниже ($p < 0,05$ во всех парах сравнения) показателей группы «переболевшие и вакцинированные».

Распределение значений IgG за изучаемый срок (7 месяцев) в группе «переболевшие» было неравномерным и колебалось от $303,2 \pm 36,2$ ВАУ/мл до $120,1 \pm 14,5$ ВАУ/мл (рис. 1). Интересно, что в первые четыре месяца отмечалось 2,5-кратное снижение показателя, соизмеримое с минимальными значениями 7-го месяца – $120,9 \pm 21,1$ ВАУ/мл (Тпр = -17,9%; $t = 4,35$; $p < 0,05$), но с последующим подъемом и пиком на 6 месяце ($216,5 \pm 28,8$ ВАУ/мл; $p > 0,05$). За семь месяцев в целом отмечалась достоверная тенденция к снижению уровня антител (Тпр = -7,1%; $t = 2,88$; $p < 0,05$).

За максимальный наблюдаемый срок (11 месяцев) в этой группе также наблюдалось неравномерность динамики показателя, которая характеризовалась строгой цикличностью – 2 полных цикла с периодичностью в 5,5 мес. Интересно, что минимальные показатели в нисходящей фазе циклов колебались в пределах $120,1$ – $126,5$ ВАУ/мл и не составили достоверных различий между собой ($p > 0,05$), при том, что пиковые значения восходящей фазы за весь срок наблюдения снижались соответственно определенной линейной регрессии (Тпр = -4,4%; $p < 0,05$).

Распределение уровня IgG за изучаемый срок (7 месяцев) среди вакцинированных было также неравномерным, как и в группе переболевших, и колебалось от $306,9 \pm 23,2$ ВАУ/мл (1-й месяц после вакцинации) до $78,2 \pm 52,4$ ВАУ/мл

(7-й месяц). Интересно, что в этой группе резкое снижение количества специфических антител отмечалось не в первые четыре месяца, как в группе переболевших, а в первые три месяца. Поскольку период «спада» антител в этой группе оказался короче, то нами не было обнаружено достоверных различий между показателями 1-го и 3-го месяца ($t = 1,70$; $p > 0,05$). Однако темп прироста тенденции составил значение соизмеримое с темпом прироста среди вакцинированных (Тпр = -15,7%). Последующий наблюдаемый подъем 4-го и 5-го месяца также колебался в пределах доверительных интервалов сравниваемых показателей ($p > 0,05$). При этом за 7 месяцев в целом отмечалась достоверная тенденция к снижению концентрации иммуноглобулинов (Тпр = -9,4%; $t = 4,44$; $p < 0,05$).

Уровень антител за 7 месяцев в группе «переболевшие и вакцинированные» ($n = 33$) не имел достоверных отличий между ежемесячными показателями (табл. 1; $p > 0,05$) при среднем $318,2 \pm 8,2$ ВАУ/мл (Тпр = -3,3%; $p > 0,05$; $y = -0,1056x + 318,6$).

С учетом того, что случаи болезни выявлялись значительно раньше, чем была разработана вакцина, расхождения в сроках регистрируемых событий (факт болезни для группы «переболевшие» и вакцинация для «вакцинированные») выглядят закономерно. Имеющиеся данные за 11 месяцев для группы «переболевшие» ($y = -10,848x + 244,04$; Тпр = -4,4; $p < 0,05$) и данные, рассчитанные на основе прямолинейной тенденции для группы «вакцинированные» ($y = -32,565x + 344,66$; см. выше), позволили сделать предположение о возможном снижении количества IgG в группе «вакцинированные» до значений близких к нулевым на исходе 10-го месяца с момента вакцинации, при том, что уровень антител в группе «переболевшие» к 11 месяцу по нашим данным сократился лишь на 46,5%.

Таким образом, динамика IgG в обеих группах демонстрирует волнообразные колебания с общей тенденцией к достоверному снижению. Подобная характеристика является вполне типичной с пиком концентрации антител в первый месяц после контакта и последующим четырехкратным снижением в течение полугода, причем зависимость от половой принадлежности не просматривается [11]. При изначально равных уровнях показателей в обеих группах, темпы снижения этого показателя в группе «вакцинированные» значительно выше, чем в группе «переболевшие», что позволяет сделать вывод о снижении количества специфических антител в этой группе до нулевых величин уже к 10-му месяцу. В группе «переболевшие и вакцинированные»

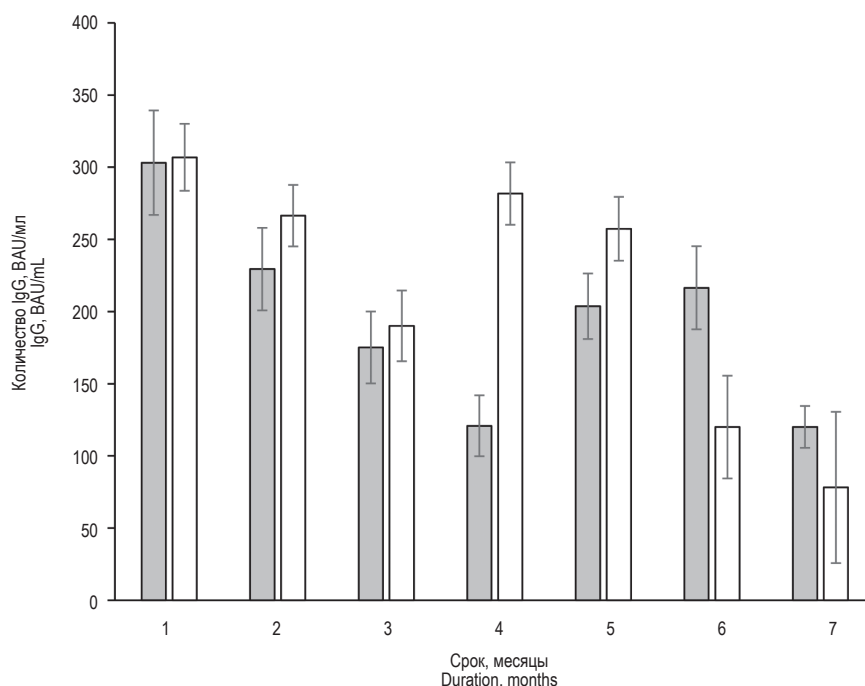


Рисунок 1. Зависимость уровня IgG к SARS-CoV-2 от срока давности перенесенного заболевания

Примечание. Группа «переболевшие» – серые столбцы, группа «вакцинированные» – белые столбцы.

Figure 1. Dependence of the level of IgG to SARS-CoV-2 on the duration of the disease

Note. Group “recovered”, gray bars; group “vaccinated”, white bars.

показатель IgG оставался неизменным за весь срок сбора анамнеза.

Оценка avidности в изучаемых группах первоначально проводилась также за 7 месяцев. Средние значения индекса avidности во всех трех группах составили достоверные различия в парных сравнениях между собой, при этом наивыс-

ший показатель ($0,95 \pm 0,03$) был отмечен в группе «переболевшие и вакцинированные», а наименьший ($0,72 \pm 0,02$) – в группе «вакцинированные». Показатели avidности в группах «переболевшие» и «вакцинированные» не обнаружили различий, однако были достоверно ниже avidности IgG группы «переболевшие и вакцинированные»

ТАБЛИЦА 1. НЕЙТРАЛИЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ IgG (%) В ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ

TABLE 1. NEUTRALIZING IgG ACTIVITY (%) IN STUDIED GROUPS

	Группы / Groups		
	Переболевшие (1) / Recovered (1)	Вакцинированные (2) / Vaccinated (2)	Переболевшие и вакцинированные (3) / Recovered and vaccinated (3)
Среднее / Average	54,3±5,0	61,1±7,0	96,1±4,0* **
1-й месяц / 1 st month	85,4±6,0	87,8±4,1	96,3±4,4
7-й месяц / 7 th month	36,6±9,4	29,7±6,3	95,9±5,2* **
Максимум / Maximum	85,4±6,0 (1-й месяц) (1 st month)	87,8±4,1 (1-й месяц) (1 st month)	98,8±5,4* (2-й месяц) (2 nd month)

Примечание. * – наличие достоверных отличий между ($p < 0,05$) 1-й и 3-й группами; ** – наличие достоверных отличий между ($p < 0,05$) 2-й и 3-й группами.

Note. *, there are significant differences between ($p < 0.05$) 1st and 3rd group; **, there are significant differences between ($p < 0.05$) 2nd and 3rd group.

($p < 0,05$). Поскольку максимальные показатели avidности во всех трех группах пришлось на разные месяцы, более подробное описание соотношения искомым показателям будет описано ниже в динамике.

Распределение показателя avidности в группе «переболевших» характеризовалось выраженной цикличностью. Выявленная прямолинейная тенденция динамики показателя за 7 месяцев ($y = -0,0071x + 0,749$) не показала достоверных изменений ($p > 0,05$), однако за более длительный срок наблюдения (11 месяцев) определялась достоверная тенденция к росту ($Tpr = 2,0\%$; $p < 0,05$). За этот же срок выявлялись 3 полных цикла с периодичностью в 3-4 месяца. Интересно, что начальный период (1-4-й месяцы) характеризовался видимым снижением показателя до минимальных значений ($0,64 \pm 0,01$) с последующим волнообразным нарастанием показателя с максимальным значением в 11 месяце ($0,69 \pm 0,2$).

В группе «вакцинированные» начальный период (1-2-й месяцы) отличался резким нарастанием величины индекса avidности с последующим резким снижением до минимального уровня, приходящимся на 3-й месяц. Дальнейшее волнообразное нарастание avidности достигало максимальных значений на 6-м месяце ($Tpr = 1,8\%$; $p < 0,05$).

За 7 месяцев значения индекса avidности антител в группе «переболевшие и вакцинированные» не нашли достоверных отличий между ($p > 0,05$) при среднем $0,95 \pm 0,03$ ($Tpr = 0,8\%$; $p > 0,05$; $y = 0,0079x + 0,9353$).

Имеющиеся данные по avidности антител за 11 месяцев для группы «переболевшие» и прогностические данные, рассчитанные на основе прямолинейных тенденций для двух других групп позволили выявить однонаправленное увеличение показателей с взаимными коэффициентами корреляций в пределах $0,91-0,96$ ($p < 0,05$).

Таким образом, нами отмечен более высокий уровень антител у пациентов после вакцинации по сравнению с переболевшими лицами. В то же время, темпы элиминации специфических антител также выше у группы вакцинированных респондентов, вероятно, являющиеся следствием особенностей используемых аденовирусных векторов и переносимой ими информации о рецептор-связывающем фрагменте S-белка. С другой стороны, индекс avidности антител у вакцинированных лиц был выше, чем у переболевших лиц, при этом в обеих группах данный показатель характеризовался стабильным ростом в рассматриваемом временном интервале от 7 до 11 месяцев. Показатель avidности имеет большее значение на ранних сроках перенесенного заболевания (15-30 дней) [13], но его различия у переболевших и привитых лиц свидетельствует об эффективности

работы вакцины как инструмента направленного отбора специфичных к RBD клонов лимфоцитов. Интересным является наблюдение в группе переболевших и вакцинированных лиц, для которых показатели уровня антител и индекса их avidности были наиболее высокими, что определяется наиболее полной активацией иммунной системы комплексом различных антигенов, присущих вирусу SARS-CoV-2.

Распределение нейтрализующей активности в группе «переболевших» так же характеризовалось выраженной цикличностью (табл. 1). Выявлена прямолинейная тенденция динамики снижения показателя за семь и за одиннадцать месяцев (5,6 и 2,1% соответственно). За этот же срок выявлялись более двух полных циклов с периодичностью в 4-5 месяцев. Начальный период так же, как и количество антител, характеризовался достоверным снижением показателя до минимальных значений ($23,9 \pm 0,2$) с последующим волнообразным нарастанием показателя с максимальным значением на 6-м и 10-м месяце ($67,6-68,2$), поскольку данные показатели имеют прямую зависимость друг с другом ($r = 0,92$, $p < 0,05$), что было показано также и в других работах [10].

Распределение нейтрализующей активности антител за 7 месяцев среди вакцинированных было так же неравномерным, как и в группе переболевших, и колебалось от $87,8 \pm 4,1$ (1-й месяц после вакцинации) до $25,0 \pm 8,9$ (на шестой месяц). Отрицательный темп прироста тенденции составил значение $-9,8\%$ ($t = 7,81$; $p < 0,05$). Амплитуда нейтрализующей активности антител в динамике за 7 месяцев в последней группе была не так выражена, как в двух предыдущих, и не составила достоверной тенденции к снижению.

Таким образом, общая картина полученных результатов свидетельствует о том, что нейтрализующая активность антител в большей степени определяется количеством специфичных к SARS-CoV-2 иммуноглобулинов. При этом стоит отметить, что для нейтрализации не менее 90% рецептор-связывающих доменов S-белка необходимо присутствие в крови количества антител в среднем $327,2 \pm 6,5$ BAU/мл. Тем не менее единичные случаи свидетельствуют о том, что наличие высокого уровня антител не всегда определяет нейтрализующую активность и наоборот, что требует мониторинга данных показателей среди доноров плазмы [8].

Заключение

Проведенная оценка взаимосвязи количества антител к S-белку SARS-CoV-2 с их avidностью и нейтрализующей активностью среди серопозитивных переболевших или вакцинированных лиц показала, что имеются качественные и ко-

личественные различия данных показателей в рассмотренных группах. Уровень антител во этих группах со временем снижается, и, несмотря на некоторую флуктуацию концентрации иммуноглобулинов, за семь месяцев достигает уровня, при котором их нейтрализующая активность оказывается недостаточно низкой для формирования протекторного иммунитета. Тем не менее группа переболевших и затем вакцинированных лиц демонстрирует более стойкий иммунитет, сохраняющийся продолжительное время, сыворотка которых способна более чем на 95% нейтрализовать RBD спустя шесть месяцев. С другой стороны, авидность антител за рассматриваемый временной интервал у переболевших лиц снижается незначительно, а в группе получивших

вакцину даже несколько увеличивается, что свидетельствует о селекции более специфичных лимфоцитов. Стоит отметить, что в группе вакцинированных в первый месяц после введения второго компонента вакцины уровень антител в среднем выше, чем у переболевших лиц, однако остаточный уровень спустя полгода оказывается более низким в сравнении с этой же группой.

Таким образом, выявлена динамика изменения уровня антител к SARS-CoV-2 в различных группах обследуемых лиц, установлена прямая взаимосвязь между нейтрализующей активностью и количеством иммуноглобулинов, а также роль вакцинации в повышении авидности антител.

Список литературы / References

1. Носырева С.Ю., Паньков А.С., Корнеев А.Г. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) у детей: клинико-лабораторные и диагностические аспекты // *Детские инфекции*, 2021. Т. 20, № 3. С. 23-28. [Nosyryeva S.Yu., Pankov A.S., Korneev A.G. New coronavirus infection (COVID-19) in children: clinical, laboratory and diagnostic aspects. *Detskiye infekcii = Children's Infections*, 2021, Vol. 20, no. 3, pp. 23-28. (In Russ.)]
2. Bauer G. The potential significance of high avidity immunoglobulin G (IgG) for protective immunity towards SARS-CoV-2. *Int. J. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 106, pp. 61-64.
3. Benner S.E., Patel E.U., Laeyendecker O., Pekosz A., Littlefield K., Eby Y., Fernandez R.E., Miller J., Kirby C.S., Keruly M., Klock E., Baker O.R., Schmidt H.A., Shrestha R., Burgess I., Bonny T.S., Clarke W., Caturegli P., Sullivan D., Shoham S., Quinn T.C., Bloch E.M., Casadevall A., Tobian A.A.R., Redd A.D. SARS-CoV-2 antibody avidity responses in COVID-19 patients and convalescent plasma donors. *J. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 222, no. 12, pp. 1974-1984.
4. Cascella M., Rajnik M., Aleem A., Dulebohn S.C., di Napoli R. Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19) [Updated 2022 Feb 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.
5. Dan J.M., Mateus J., Kato Y., Hastie K.M., Yu E.D., Faliti C.E., Grifoni A., Ramirez S.I., Haupt S., Frazier A., Nakao C., Rayaprolu V., Rawlings S.A., Peters B., Krammer F., Simon V., Saphire E.O., Smith D.M., Weiskopf D., Sette A., Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, 2021, Vol. 371, no. 6529, eabf4063. doi: 10.1126/science.abf4063.
6. Esakandari H., Nabi-Afjadi M., Fakkari-Afjadi J., Farahmandian N., Miresmaeili S.M., Bahreini E. A comprehensive review of COVID-19 characteristics. *Biol. Proced. Online*, 2020, Vol. 22, 19. doi: 10.1186/s12575-020-00128-2.
7. Grigoryan L., Pulendran B. The immunology of SARS-CoV-2 infections and vaccines. *Semin. Immunol.*, 2020, Vol. 50, 101422. doi: 10.1016/j.smim.2020.101422.
8. Jain R., Mallya M.V., Amoncar S., Palyekar S., Adsul H.P., Kumar R., Chawla S. Seroprevalence of SARS-CoV-2 among potential convalescent plasma donors and analysis of their deferral pattern: Experience from tertiary care hospital in western India. *Transfus. Clin. Biol.*, 2022, Vol. 29, no. 1, pp. 60-64.
9. Kaur S.P., Gupta V. COVID-19 Vaccine: A comprehensive status report. *Virus Res.*, 2020, Vol. 288, 198114. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198114.
10. Longueira Y., Polo M.L.; InViV working group; Biobanco de Enfermedades Infecciosas Colección COVID19 working group, Turk G, Laufer N. Dynamics of SARS-CoV-2-specific antibodies among COVID19 biobank donors in Argentina. *Heliyon*, 2021, Vol. 7, no. 10, e08140. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08140.
11. Luo C., Liu M., Li Q., Zheng X., Ai W., Gong F., Fan J., Liu S., Wang X., Luo J. Dynamic changes and prevalence of SARS-CoV-2 IgG/IgM antibodies: Analysis of multiple factors. *Int. J. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 108, pp. 57-62.
12. Mahajan A., Manchikanti L. Value and validity of coronavirus antibody testing. *Pain Physician*, 2020, Vol. 23, no. 4S, pp. S381-S390.
13. Moura A.D., da Costa H.H.M., Correa V.A., de S Lima A.K., Lindoso J.A.L., De Gaspari E., Hong M.A., Cunha-Junior J.P., Prudencio C.R. Assessment of avidity related to IgG subclasses in SARS-CoV-2 Brazilian infected patients. *Sci. Rep.*, 2021, Vol. 11, no. 1, 17642. doi: 10.1038/s41598-021-95045-z.

14. Sun B., Feng Y., Mo X., Zheng P., Wang Q., Li P., Peng P., Liu X., Chen Z., Huang H., Zhang F., Luo W., Niu X., Hu P., Wang L., Peng H., Huang Z., Feng L., Li F., Zhang F., Chen L. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, Vol. 9, no. 1, pp. 940-948.

15. Wu C., Liu Y., Yang Y., Zhang P., Zhong W., Wang Y., Wang Q., Xu Y., Li M., Li X., Zheng M., Chen L., Li H. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm. Sin. B.*, 2020, Vol. 10, no. 5, pp. 766-788.

Авторы:

Каримов И.Ф. — к.б.н., биолог микробиологической лаборатории научно-исследовательского центра, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии федерального ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Корнеев А.Г. — к.б.н., доцент кафедры эпидемиологии и инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Борисов С.Д. — к.м.н., заслуженный врач Российской Федерации, заведующий микробиологической лабораторией научно-исследовательского центра, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Носырева С.Ю. — к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и инфекционных болезней, врач-вирусолог научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Ушакова А.А. — ассистент кафедры эпидемиологии и инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Панькова А.А. — студент лечебного факультета ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Паньков А.С. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой эпидемиологии и инфекционных болезней, директор научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Authors:

Karimov I.F., PhD (Biology), Laboratory of Microbiology, Research Center, Associate Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Korneev A.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Epidemiology and Infectious Diseases, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Borisov S.D., PhD (Medicine), Honored Doctor of the Russian Federation, Head, Laboratory of Microbiology, Research Center, Associate Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Nosyreva S.Yu., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology and Infectious Diseases; Clinical Virologist, Research Center, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Ushakova A.A., Assistant Professor, Department of Epidemiology and Infectious Diseases, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Pankova A.A., Student, Medical Faculty, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Pankov A.S., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Epidemiology and Infectious Diseases; Director, Research Center, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

ЭКСПРЕССИЯ РЕГУЛЯТОРОВ ХЕМОТАКСИСА В ТКАНЯХ ЭКССУДАТИВНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПРОСТРАНСТВА РЕЙНКЕ

Ковалев М.А.¹, Давыдова Е.В.²

¹ Филиал № 3 ФГБУ «3 Центральный военный клинический госпиталь имени А.А. Вишневецкого», г. Одинцово, Московская обл., Россия

² ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Резюме. Экссудативные опухолеподобные новообразования пространства Рейнке голосовых складок достаточно широко распространены в популяции, чаще среди представителей вокальных профессий: актеров, певцов, преподавателей, дикторов и представляют собой серьезную медико-социальную проблему. В патогенезе новообразований ключевую роль играет хроническая фонотравма, интоксикация при табакокурении на фоне практически полного отсутствия лимфатического дренажа в пространстве Рейнке. Важное значение в морфогенезе патологии придается клеточным факторам тканевого и иммунного гомеостаза. Включение реакций иммунного реагирования, направленное на сохранение тканевого гомеостаза сопровождается усилением продукции не только провоспалительных цитокинов, но и регуляторов хемотаксиса, факторов роста. Цель работы — изучение уровня хемокинов MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , фракталкина, IL-8, I-TAC в тканях экссудативных поражений пространства Рейнке (ЭППР).

Материалом для исследования послужили 40 образцов тканей экссудативных поражений пространства Рейнке, в частности полипов голосовых складок, голосовых узелков и новообразований в виде отека Рейнке. Забор материала осуществлялся интраоперационно при удалении новообразования с помощью фибробронхоскопа Olympus TYPE 150 (Германия) с применением интегрированного CO₂ лазера Lumenis Acu Pulse (Израиль). Содержание хемокинов определяли в супернатанте гомогената тканей при помощи мультиплексного анализа на иммуноанализаторе MAGPIX-100 (BioRad, США). Статистическая обработка проводилась с помощью пакета программ Statistica 10.0 for Windows, результаты представлены в Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}).

Хроническая фонотравма, воздействие токсических факторов, приводит к повышению проницаемости сосудистого эндотелия, тканевому отеку и активации клеток, участвующих в тканевом и иммунном гомеостазе, таких как фибробласты, моноциты, эндотелиоциты. Изучение экспрессии хемокинов в тканях различных экссудативных поражений пространства Рейнке позволило установить следующие особенности: в тканях «плотных» новообразований показано преобладание содержания СХС — хемокинов, продуцируемых преимущественно фибробластами, что отражает участие последних в генезе данной патологии, а в тканях «мягких» новообразований, содержащих большую долю жидкостного компонента, зафиксировано повышение концентрации СС — хемокинов и фракталкина, продуцируемых преимущественно макрофагами и эндотелиоцитами, что может отражать преобладающее значение данных клеток в формировании миксоидных полипов и отека Рейнке.

Ключевые слова: экссудативные поражения пространства Рейнке, хемокины, фибробласты

Адрес для переписки:

Давыдова Евгения Валерьевна
ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница»
454048, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 70.
Тел.: 8 (351) 232-73-71.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

Address for correspondence:

Davydova Evgeniya V.
Chelyabinsk Regional Clinical Hospital
620049, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 70.
Phone: 7 (351) 232-73-71.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

Образец цитирования:

М.А. Ковалев, Е.В. Давыдова «Экспрессия регуляторов хемотаксиса в тканях экссудативных поражений пространства Рейнке» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 195-200.
doi: 10.46235/1028-7221-1120-ЕОС

© Ковалев М.А., Давыдова Е.В., 2022

For citation:

M.A. Kovalev, E.V. Davydova "Expression of chemotaxis in regulators of tissues of exudative lesions of Reinke's space", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 195-200.
doi: 10.46235/1028-7221-1120-EOC

DOI: 10.46235/1028-7221-1120-EOC

EXPRESSION OF CHEMOTAXIS IN REGULATORS OF TISSUES OF EXUDATIVE LESIONS OF REINKE'S SPACE

Kovalev M.A.^a, Davydova E.V.^b

^a A. Vishnevsky Central Military Clinical Hospital (Branch 3), Odintsovo, Moscow Region, Russian Federation

^b Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Exudative tumor-like neoplasms of the Reinke space in vocal folds are widespread in the population, more often among representatives of vocal professions, e.g., actors, singers, teachers, lecturers and represent a serious medical and social problem. In pathogenesis of such neoplasms, a key role is given to chronic phonotrauma, intoxication during smoking against the background of the nearly complete absence of lymphatic drainage in the Reinke space. Cellular factors of tissue and immune homeostasis are of great importance in morphogenesis of this disorder. Switching of immune responses aimed at maintaining tissue homeostasis is accompanied by increased production of pro-inflammatory cytokines, as well as chemotaxis regulators and growth factors. The aim of our work was to study the levels of chemokines (MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , fractalkine, IL-8, I-TAC) in the tissues of exudative lesions from the Reinke's space (EPPR).

Forty tissue samples of exudative lesions from Reinke's space, in particular, vocal fold polyps, vocal nodules and neoplasms presenting as Reinke's edema were taken as biological material for the study. The samples were taken intraoperatively when the neoplasm was removed, using an Olympus TYPE 150 fiber bronchoscope (Germany) using an integrated Lumenis Acu Pulse CO₂ laser (Israel). The content of chemokines was determined in the supernatants of the tissues homogenates, using multiplex analysis with MAGPIX-100 immunoanalyzer (Bio-Rad, USA). Statistical processing was carried out using Statistica 10.0 for Windows software package. The results are presented as medians (Q_{0.25}-Q_{0.75}).

Chronic phonotrauma and/or exposure to toxic factors leads to increased permeability of the vascular endothelium, tissue edema and activation of cells involved in tissue and immune homeostasis, e.g., fibroblasts, monocytes, endotheliocytes. The study of the chemokine expression in the tissues of various exudative lesions of Reinke's space enabled us to reveal the following features: (1) predominance of the CXC-chemokine content produced mainly by fibroblasts in "dense" neoplastic tissues, thus reflecting participation of the latter in the genesis of this pathology. (2) In the tissues of "soft" neoplasms with large proportion of liquid component, we have revealed increased concentrations of SS-chemokines and fractalkine. The latter are produced mainly by macrophages and endotheliocytes, thus, probably, reflecting a predominant role of these cells in development of myxoid polyps and Reinke's edema.

Keywords: exudative lesions, Reinke's space, chemokines, fibroblasts

Введение

Экссудативные опухолеподобные новообразования голосовых складок достаточно широко распространены в популяции, чаще среди представителей голосо-речевых профессий: актеров, певцов, преподавателей, дикторов и представляют собой серьезную медико-социальную проблему. Согласно оценкам специалистов заболеваемость данной патологией составляет от 55 до 68% среди профессионалов голоса [1]. Основными клиническими формами патологии являются полипы голосовых складок, голосовые узелки, отек Рейнке. Ведущими причинами развития патологии принято считать интенсивное, длительное перенапряжение голосовых складок, связанное с форсированным голосообразованием, так называемой «твердой атакой», и воздействие агрессивного табачного дыма на голосовые складки [1].

Кроме механического компонента в качестве иных этиологических факторов рассматривают вдыхание токсичных аэрозолей (например газового аэрозоля при проведении сварочных работ, химических реагентов, дыма), фаринголарингальный рефлюкс [1]. В основе патогенеза лежат микроциркуляторные расстройства, обусловленные недостаточностью лимфатического дренажа и сопровождающиеся скоплением отечной жидкости в пространстве Рейнке. Интенсивные голосовые нагрузки приводят к перенапряжению голосового аппарата, повреждению микрососудов, повышению проницаемости последних и выходу плазмы в интерстициальное пространство. Особенности дренажной системы голосовых складок препятствуют своевременному оттоку жидкости в региональные лимфоколлекторы. Формирование на этом фоне ишемически-гипоксических

расстройств приводит к активации локальных факторов иммунной системы, входящих в состав гортань-ассоциированной лимфоидной ткани – LALT (Larynx-Associated Lymphoid Tissue) [6]. Включение реакций иммунного реагирования сопровождается усилением продукции провоспалительных цитокинов, регуляторов хемотаксиса, факторов роста, что способствует прогрессированию патологии. Хемокины участвуют не только в координации движения лейкоцитов при воспалительных процессах, но также важны во многих физиологических и патологических процессах.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение уровня хемокинов MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , фракталкина, IL-8, I-TAC в тканях экссудативных поражений пространства Рейнке.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 40 образцов тканей новообразований голосовых складок отобранных интраоперационно у пациентов с диагнозом по МКБ-10 J38.1 Полип голосовой складки и гортани и поступивших на оперативное лечение. Удаление новообразований осуществлялось с помощью фибробронхоскопа Olympus TYPE150 (Германия) под эндотрахеальным наркозом под контролем операционного микроскопа Haag-Streit Surgical Miller Wedel MV-500 (Германия) с применением интегрированного CO₂-лазера Lumenis Acu Pulse (Израиль) по методу Hirano. Образцы тканей распределялись следующим образом: 1-я группа – 10 образцов тканей с ангиоматозным типом полипов, 2-я группа – 9 полипов миксоидного типа, 3-я группа – узелки голосовых складок (n = 7), 4-я группа – отек Рейнке (n = 14).

Определение хемокинов

Определение хемокинов проводили в супернатанте тканей ЭППР. Для получения супернатанта, гомогенаты тканей центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин, полученный супернатант хранили до исследования при температуре -20 °C. Количественное содержание хемокинов в полученных супернатантах оценивали при помощи мультиплексного анализа на иммуноанализаторе MAGPIX-100 с использованием системы мультиплексного анализа Bio-Plex (Bio-Rad, США) для определения фракталкина, IL-8, I-TAC, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α (реагенты Merck, Германия) в соответствии с инструкцией фирмы. С целью стандартизации в гомогенате определяли количество белка биуретовым методом с использованием набора реагентов «ОБЩИЙ БЕЛОК-ОЛЬВЕКС» (Санкт-Петербург, Россия). Расчетные показате-

ли концентрации цитокинов представлены в пг/мг белка.

Статистическая обработка

Обработка материала проводилась с помощью пакета программ Statistica 10.0 for Windows. Значения показателей представлены в виде Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), где Me – медиана, Q_{0,25} и Q_{0,75} – интерквартильный интервал. Сравнение групп производили, используя непараметрический критерий Манна–Уитни, с учетом поправки Бонферрони, значимыми считали различия при p ≤ 0,02.

Результаты и обсуждение

Представленные результаты свидетельствуют об изменении соотношения различных хемокинов в изучаемых образцах (табл. 1).

Ткани так называемых «плотных» полипов, к которым относятся ангиоматозный тип полипов и голосовые узелки, а в морфогенезе преобладают пролиферация фибробластов, дилатация капиллярного русла, гиалиноз стромы с выраженным утолщением суббазальной мембраны, диффузное отложение фибронектина, явления неангиогенеза, содержат наибольшую концентрацию хемокинов, представителей α -хемокинов (СХС-семейство), в частности IL-8 и интерфероном- γ индуцируемый Т-клеточный альфа-хемоаттрактант (I-TAC; семейство CXCL11).

IL-8 и I-TAC, принадлежащие к семейству α -хемокинов (СХС-хемокинов) и вырабатываемые преимущественно фибробластами, моноцитами, клетками эндотелия, принимают активное участие в активации, миграции и хемотаксисе клеток, способны определять вид клеток, проникающих в ткань из кровотока через эндотелий, а также направление миграции [2, 3]. Наибольшая плотность рецепторов к IL-8 обнаружена на нейтрофилах, моноцитах/макрофагах и активированных Т-лимфоцитах, после взаимодействия с которыми происходит связывание CXCR1 с G-белком, приводящее к фосфоинозитидному гидролизу, внутриклеточной мобилизации Ca²⁺ и хемотаксису клетки [3].

Рецепторы к I-TAC экспрессируются преимущественно на активированных Th1-лимфоцитах, эндотелиоцитах. Активатором и основным регулятором продукции I-TAC является IFN γ , отрицательный контроль осуществляется противовоспалительными цитокинами IL-4 и IL-10.

I-TAC способствует рекрутингу активированных Th1-лимфоцитов в зону формирования патологии. Имеются данные об ангиостатическом эффекте I-TAC, который проявляет ангиостатический эффект путем секреции CXCR3 на эндотелиальных клетках [3, 5].

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ХЕМОКИНОВ В ТКАНЯХ ЭКССУДАТИВНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПРОСТРАНСТВА РЕЙНКЕ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATION OF CHEMOKINES IN THE TISSUES OF EXUDATIVE LESIONS OF REINKE'S SPACE, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель, пг/мг белка Index, pg/mg protein	ЭППР Exudative lesions of Reinke's space			
	Полипы голосовых складок Vocal cord polyps		Группа 3 Узелки голосовых складок Group 3 Nodules of the vocal folds (n = 7)	Группа 4 Отек Рейнке Group 4 Reinke's edema (n = 14)
	Группа 1 Ангиоматозный тип Group 1 Angiomatous type (n = 10)	Группа 2 Миксоидный тип Group 2 Mixoid type (n = 9)		
Фракталкин Fractalkin	3,1 (2,2-3,8)*	8,3 (4,6-10,1)	4,7 (3,3-7,3)*	12,5 (8,4-14,4)
IL-8	13,6 (10,5-16,2)*	5,2 (3,8-7,2)	21,3 (12,5-23,2)*	7,2 (5,6-10,4)
I-TAC	15,6 (12,1-17,1)*	4,2 (2,1-6,5)	11,2 (10,5-13,6)*	3,7 (2,6-6,7)
MIP-1α	2,2 (1,8-6,4)*	12,6 (8,4-14,3)	6,0 (4,8-8,8)*	14,3 (12,8-18,6)
MIP-1β	6,5 (4,4-9,1)*	17,3 (15,1-20,4)	5,5 (4,3-10,9)*	14,1 (12,8-23,5)
MIP-3α	3,3 (1,8-3,2)*	10,2 (8,5-16,1)	6,9 (4,3-8,7)*	14,3 (9,8-18,2)

Примечание. * – значимые, согласно критерию Манна–Уитни (p ≤ 0,02), различия с группой 2 и 4.

Note. *, significant, according to the Mann–Whitney test (p ≤ 0.02) differences with group 2 and 4.

В то же время в образцах тканей миксоидных полипов и при отеке Рейнке, характеризующихся наличием избыточного жидкостного компонента в интерстиции, утолщением и расширением стенок кровеносных сосудов, истончением и фенестрацией эндотелиальной выстилки, наблюдалось повышение уровня β-хемокинов (CC – хемокинов): MIP-1α (CCL3), MIP-1β (CCL4) и MIP-3α (CCL20) и δ-хемокинов (CX3C-хемокинов) – фракталкина (CX3CL1) [7, 12].

Известно, что все представители β-ХК являются хемоаттрактантами и активаторами клеток как врожденного (моноцитов, дендритных клеток, НК-клеток), так и адаптивного (Т-лимфоцитов) иммунитета. При этом профиль рецепторов к CC-хемокинам на клетках может избирательно меняться, в зависимости от степени дифференцировки клетки. Так, все Т-лимфоциты экспрессируют CCR1, Th1-лимфоциты – CCR5 и CXCR3, Th2-лимфоциты – преимущественно CCR3 [12].

Макрофагальные воспалительные белки – MIP (1α; 1β; 3α; 3β), экспрессируясь в основном на активированных моноцитах/макрофагах, реже

на фибробластах, клетках эпителия, гладкомышечных клетках сосудов, проявляют свой эффект путем связывания с внеклеточными протеогликанами и лигирования хемокиновых рецепторов CCR1 (лиганд CCL3) и CCR5 (лиганды CCL3 и CCL4). Рецепторы к белкам семейства MIP (1α; 1β; 3α; 3β) имеются также на дендритных клетках и тромбоцитах [7, 11].

Фракталкин – единственный представитель семейства CX3C-хемокинов представлен на моноцитах, эндотелиоцитах как в растворимой, так и в мембраносвязанной с муцинами форме и играет важную роль в хемотаксисе клеток врожденного (моноциты, НК-клетки) и адаптивного (Т-лимфоциты) иммунитета [4].

Хроническое перенапряжение голосовых складок либо воздействие токсических факторов, компонентов желчи и соляной кислоты при рефлюксе приводит не только к повышению проницаемости сосудистого эндотелия, накоплению жидкостного компонента в интерстиции и строме голосовых складок, но и активации клеток, участвующих в тканевом и иммунном гомеостазе, например фибробластов, моноцитов,

эндотелиоцитов. В строме голосовых складок популяция фибробластов, относящихся к факторам врожденного иммунитета, достаточно многочисленна, способна при активации изменять свой фенотип на воспалительный и увеличивать секреторную активность [8]. Имеются данные о способности фибробластов модулировать паракринную сигнализацию макрофагов во время ранней экспрессии провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-6, IL-12) и последующей экспрессии хемокинов и факторов роста (IL-8, I-TAC, MCP-1, TGF- β) [10]. Именно фибробласты могут детерминировать степень и продолжительность ответа макрофагов. Морфометрическими исследованиями, выполненными нами ранее, показано, что представительство фибробластов в тканях «плотных» новообразований, в частности в ангиоматозных типах полипов и голосовых узелках наибольшее среди всех форм экссудативных поражений пространства Рейнке, вероятно, именно поэтому в данных новообразованиях выявлена наибольшая концентрация указанных выше хемокинов. При этом нельзя исключать определенную роль в стимуляции фибробластов взаимодействия TLR последних с молекулярными паттернами бактериальной стенки, поскольку гортань расположена на пересечении дыхательной системы и желудочно-кишечного тракта и микрофлора на просветной поверхности голосовой складки может при повреждении (например фонотравме) проникать в эпителий и активировать врожденные механизмы защиты в собственной пластинке. Фибробласты одними из первых встречаются с инфекционными агентами, поскольку конститутивно экспрессируют TLR 1, TLR 2, TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 6, TLR 9 [10]. В литературе описана гипотеза об изменении фенотипа фибробластов на воспалительный при повреждении микрососудов и воздействии первичных медиаторов воспаления, таких как циклооксигеназа-2, NIF-1 α , протеазы (MMP-2, MMP-9), белки (фибронектин, декорин), способных менять сигнализацию и активировать

факторы врожденного иммунитета, например дендритные клетки, макрофаги, NK-клетки [8, 9]. Подобный механизм описан также и при «мягких» полипах (миксоидный) и отеке Рейнке, в супернатанте которых нами зафиксировано повышение концентрации СС-хемокинов (MIP 1 α ; 1 β ; 3 α ; 3 β) и фракталкина, которые продуцируются преимущественно моноцитами, эндотелиоцитами, что отражает включение реакций иммунного реагирования при формировании данной патологии [5, 9].

Изучение секреторной активности основных представителей стромы голосовых складок, в частности представителей дифферона фибробластов, важно также с точки зрения участия последних в процессах регенерации и ремоделирования тканей, как при формировании самой патологии, так и после оперативного удаления новообразований, поскольку избыточное образование внеклеточного матрикса при повышенной стимуляции коллагенообразующей функции фибробластов, например, факторами роста TGF- α , TGF- β может привести к стойкому нарушению голосообразующей функции и впоследствии профессиональной непригодности.

Заключение

Таким образом, при изучении экспрессии хемокинов в тканях экссудативных поражений пространства Рейнке зафиксированы особенности, заключающиеся в преобладании содержания СХС-хемокинов в тканях «плотных» новообразований и повышение концентрации СС-хемокинов и СХЗС-хемокинов в тканях «мягких» новообразований, содержащих большую долю жидкостного компонента в строме. При этом следует учесть, что концентрация цитокинов стандартизирована и пересчитана на 1 мг белка. Подобное распределение содержания хемокинов может свидетельствовать о преобладающем значении клеток-продуцентов при формировании отдельных видов новообразований голосовых складок.

Список литературы / References

1. Дайхес Н.А., Быкова В.П., Пономарев А.Б., Давудов Х.Ш. Клиническая патология гортани. Руководство-атлас. М.: Медицинское информационное агентство, 2009. 160 с. [Daihes N.A., Bykova V.P., Ponomarev A.B., Davudov Kh.Sh. Clinical pathology of the larynx. Atlas guide]. Moscow: Medical Information Agency, 2009. 160 p.
2. Зорина А.И., Бозо И.Я., Зорин В.Л., Черкасов В.Р., Деев Р.В. Фибробласты дермы: особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности клинического применения // Гены и клетки, 2011. Т. 6, № 2. С. 15-26. [Zorina A.I., Bozo I.Ya., Zorin V.L., Cherkasov V.R., Deev R.V. Dermal fibroblasts: features of cytogenesis, cytophysiology and clinical applications. *Geny i kletki = Genes and Cells*, 2011, Vol. 6, no. 2, pp. 15-26. (In Russ.)]
3. Меняйло М.Е., Малащенко В.В., Шмаров В.А., Газатова Н.Д., Мелашченко О.Б., Гончаров А.Г., Селедцова Г.В., Селедцов В.И. Роль интерлейкина-8 в непосредственной регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 529-536. [Meniailo M.E., Malashchenko V.V., Shmarov V.A., Gazatova N.D., Melashchenko O.B., Goncharov A.G., Seledtsova G.V., Seledtsov V.I. Role for

interleukin-8 in direct regulation of T cell functional activity. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 5. pp. 529-536. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-529-536.

4. Меснянкина О.А., Янчевская Е.Ю., Бен М. Фракталин: патогенетическая роль и диагностические возможности // Кубанский научный медицинский вестник, 2017. № 1 (2). С. 148-151. [Mesnyankina O.A., Yanchevskaya E.Yu., Ben M. Fractalkin: pathogenetic role and diagnostic possibilities. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2017, no. 1 (2), pp. 148-151. (In Russ.)]

5. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Аюшинова Н.И., Каня О.В. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани // Сибирский медицинский журнал, 2012. Т. 12, № 3. С.8-12. [Shurygina I.A., Shurygin M.G., Ayushinova N.I., Kanya O.V. Fibroblasts and their role in the development of connective tissue. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2012, Vol. 12, no. 3, pp. 8-12. (In Russ.)]

6. Dietrich C., Jecker P., Tschernig T., Mann W.J. Presence of dendritic cells, T lymphocytes, macrophages, B lymphocytes and glandular tissue in the human fetal larynx. *Acta Otolaryngol.*, 2004, Vol. 124, no. 19, pp. 833-838.

7. Hauser M.A., Legler D.F. Common and biased signaling pathways of the chemokine receptor CCR7 elicited by its ligands CCL19 and CCL21 in leukocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 2016, no. 99, pp. 869-882.

8. Jafarnejad M., Zawieja D.C., Brook B.S., Nibbs R.J.B., Moore J.E. A novel computational model predicts key regulators of chemokine gradient formation in lymph nodes and site-specific roles for CCL19 and ACKR4. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 199, no. 7, pp. 2291-2304.

9. Jette M.E., Hayer S.D., Thibeault S.L. Characterization of human vocal fold fibroblasts derived from chronic scar. *Laryngoscope*, 2013, Vol. 123, no. 3, pp. 738-745.

10. King S.N., Berchtold C.M., Thibeault S.L. Lipopolysaccharide responsiveness in vocal fold fibroblasts. *J. Inflamm.*, 2014, Vol. 11, no. 1, 42. doi: 10.1186/s12950-014-0042-3.

11. King S.N., Chen F., Jetté M.E., Thibeault S.L. Vocal fold fibroblasts immunoregulate activated macrophage phenotype. *Cytokine*, 2013, Vol. 61, no. 1, pp. 228-236.

12. Lu C., Chen S., Xu F., Chen Y., Zhang Q., Li Y. Expressions of CCR7 and CXCR4 are associated with differentiation in gastrointestinal cancer. *J. Cancer Ther.*, 2013, Vol. 4, no. 1A, pp. 49-53.

Авторы:

Ковалев М.А. — заведующий отделением оториноларингологии Филиала № 3 ФГБУ «3 Центральный военный клинический госпиталь имени А.А. Вишневого», г. Одинцово, Московская обл., Россия

Давыдова Е.В. — д.м.н., заведующий отделением реабилитации ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Authors:

Kovalev M.A., Head, Department of Otorhinolaryngology, A. Vishnevsky Central Military Clinical Hospital (Branch 3), Odintsovo, Moscow Region, Russian Federation

Davydova E.V., PhD, MD (Medicine), Head, Rehabilitation Department, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 13.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 13.05.2022
Accepted 29.05.2022

ОТДЕЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ АЛЬТЕРАЦИИ ЛОР-ОРГАНОВ

Коркмазов М.Ю., Дубинец И.Д., Ленгина М.А., Коркмазов А.М., Корнова Н.В., Рябенко Ю.И.

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

Резюме. Приводятся сведения по изучению и применению оптического излучения в различных спектральных диапазонах при лечении заболеваний ЛОР-органов. Рассматриваются отдельные вопросы иммунологических преобразований слизистой оболочки полости носа в ответ на хирургическую альтерацию в ранних сроках послеоперационного периода. С целью повышения эффективности послеоперационной реабилитации пациентов, перенесших ринохирургические вмешательства, в комплексной терапии использована низкочастотная ультразвуковая кавитация в сочетании с фотохромотерапией. Проведена оценка клинично-иммунологической эффективности лечения пациентов, основанная на изучении клинично-функциональной картины, на ранних сроках послеоперационного периода и стабилизации цитокинового профиля. В результате обоснована возможность использования оптического излучения в различных спектральных диапазонах, на основе изучения физических характеристик светового излучения с разъяснением механизмов воздействия на поврежденную слизистую оболочку, для реализации воспалительного ответа на хирургическую травму и восстановления иммунологических отклонений. Работа проведена с целью привлечения научного интереса к немедикаментозным методам ранней реабилитации лиц, перенесших ринохирургические вмешательства.

Ключевые слова: цитокины, средний отит, риносептопластика, оптическое излучение, фотохромотерапия, низкочастотная ультразвуковая кавитация, регенерация

DISTINCT INDEXES OF IMMUNOLOGICAL REACTIVITY IN SURGICAL ALTERATION OF ORL ORGANS

Korkmazov M.Yu., Dubinets I.D., Lengina M.A., Korkmazov A.M., Kornova N.V., Ryabenko Yu.I.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. The data are provided on applications of optical radiation at various spectral ranges in the treatment of disorders of ORL organs. Some issues of pathophysiological and immune changes of nasal mucosa in

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.М. Коркмазов, Н.В. Корнова, Ю.И. Рябенко
«Отдельные показатели иммунологической
реактивности при хирургической альтерации
ЛОР-органов» // Российский иммунологический
журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 201–206.
doi: 10.46235/1028-7221-1121-DIO
© Коркмазов М.Ю. и соавт., 2022

For citation:

M. Yu. Korkmazov, I. D. Dubinets, M. A. Lengina,
A. M. Korkmazov, N. V. Kornova, Yu. I. Ryabenko
“Distinct indexes of immunological reactivity in surgical alteration
of ORL organs”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 201–206.
doi: 10.46235/1028-7221-1121-DIO
DOI: 10.46235/1028-7221-1121-DIO

response to surgical alteration are considered for the early postoperative period. In order to increase efficiency of postoperative rehabilitation in the patients subjected to rhinosurgical interventions, we have used low-frequency ultrasonic cavitation in combination with photochromotherapy in complex treatment schedules. Assessment of clinical and immunological effects of this treatment was performed as based on the study of clinical and functional pattern at the early stages of postoperative period and stabilization of the cytokine profile. In general, an opportunity of using optical radiation at different wavelength was confirmed, as shown by studies of physical characteristics of light irradiation, explaining the mechanisms of action on the damaged mucous membrane, to apply inflammatory response to surgical trauma and restore immunological abnormalities. The work was carried out in order to draw attention to the non-drug methods of early rehabilitation of persons subjected to rhinosurgical interventions.

Keywords: cytokines, otitis media, rhinoseptoplasty, optical radiation, photochromotherapy, ultrasonic cavitation, regeneration

Введение

В настоящее время неуклонный рост числа пациентов, нуждающихся в ЛОР-хирургии, с расширением показаний и объемов оперативного вмешательства влечет значительные социально-экономические, спортивные и производственные проблемы для регионов [12, 14]. Так, например, девиация носовой перегородки и сопряженные заболевания носа и околоносовых пазух составляют более 30% от всех плановых госпитализированных больных в оториноларингологические отделения для оперативного вмешательства. В этом контексте, послеоперационное пособие после ринохирургических вмешательств предполагает совершенствование медикаментозной и немедикаментозной лечебной тактики [1]. По медикаментозной терапии накоплен значительный опыт, выпущены методические рекомендации и учебные пособия, преподаются на курсах повышения квалификации оториноларингологов, аспирантам и ординаторам [5, 11]. В то же время недостаточно литературных источников относительно физиотерапевтических технологий, и поэтому требуется дополнительное изучение вопроса.

Одним из старейших и безопасных лечебно-профилактических направлений медицины является физиотерапия. Применяется как самостоятельно, так и в совокупности с другими методами лечения и особенно эффективна в составе комплексной терапии. Механизмы воздействия физиотерапии направлены на снятие воспаления, иммуномодуляцию, обезболивание, противоаллергический и бактерицидный эффект, борьбу с гипоксией и т. д. [4]. Для послеоперационного лечения оториноларингологических больных, особый интерес в последние десятилетия стали приобретать высокоэффективные физиотерапевтические низкочастотные ультразвуковые и биорезонансные технологии, низкоинтенсивная фотохромотерапия в различных оптических диапазонах и т. д. [6]. Данные литературы свидетельствуют о возможности использования видимого оптического излучения в комплексной терапии пациентов на ранних стадиях послеоперацион-

ного периода у лиц, перенесших ринохирургические вмешательства.

Предпосылкой к изучению возможности использования у пациентов немедикаментозной терапии явились литературные данные, свидетельствующие о получении положительных биологических эффектов в раннем послеоперационном периоде, вследствие преобразования энергии фотонов при взаимодействии с тканями на другие виды энергии (механическую, тепловую, химическую и т. д.), которые в свою очередь запускают физико-химические и биологические реакции [3, 7, 13, 15]. Для полного понимания механизмов действия электромагнитных колебаний на больной орган и получаемом при этом эффекте необходимо изучить историю, физические характеристики, оказываемое влияние на больной орган и область применения. Описание целительного воздействия солнечных инсоляций на больной организм встречается в трудах Гиппократа (460–377 до н. э.). Результатом изучения, начиная с тех исторических времен, явилось целое направление, получившее в медицине название фототерапия (от греч. *photos* – свет). К настоящему времени весь спектр электромагнитных излучений, начиная от инфразвуковых волн и заканчивая космическими лучами, изучен физиками. В медицине актуальны для изучения оптические диапазоны, включающие 10% ультрафиолетовых лучей, 40% видимого спектра и 50% инфракрасных лучей.

В хронологическом порядке, наибольший интерес ученых к фотохромотерапии, как разновидности физиотерапии, был проявлен в первой половине прошлого столетия. Так, лауреат Нобелевской премии Finsen N. (1901) выпустил первую книгу «Светолечение» и спустя один год французские ученые Rieder H. и Marcuse J. дополнили и переиздали эту книгу. Через четыре года доктор Vie V. (1906), написал учебно-методическое пособие «Применение света в медицине», Кондрашов В.И. (2001), опираясь на работы Hausmann W. (1929) в работе «Руководство по светолечению» отразил основные успехи, достигнутые Европейскими специалистами [4].

В настоящее время световое излучение рассматривается в трех основных спектральных диапазонах: видимое световое (760-410 нм), ультрафиолетовое (400-180 нм) и инфракрасное (760-400). Таким образом, на пораженный участок при проведении физиотерапевтических процедур воздействуют две силы: свет как поток частиц (квантов) и свет как волна. Длина волны определяет глубину проникновения в ткани, например, инфракрасные проникают на 250 мм, видимый свет (наибольшее у красного цвета) от 9 до 12 мм, а ультрафиолетовые на 5-6 мм. Поток частиц зависит от длины волны и становится больше, чем меньше длина волны по закону Гротгуса–Дрейпера. При попадании излучения в ткани, молекулы переходят в возбужденное состояние за счет переноса энергии световых квантов с получением электролитической диссоциации с ионизацией молекул облучаемой ткани, объясняя воздействие инфракрасного спектра, где энергии квантов хватает для усиления колебаний молекул тканей. Энергия квантов ультрафиолетового спектра ионизирует и разрушает ковалентные связи молекулы тканей. Таким образом, излучение видимого светового спектра способно передавать энергию молекулам поврежденного органа и тем самым стимулировать биохимические реакции на этапе регенерации тканей. Как правило, в зависимости от выбранного светового излучения проявляется фототерапевтический эффект с первичной фотоакцепцией энергии световых квантов с последующими механизмами перехода на другие физиологические процессы, проявляющиеся синдромами адаптации к энергии светового излучения. На тканевом уровне, в области хирургической альтерации, как правило наблюдается улучшение показателей регионарного кровообращения и стабилизация гемодинамики, нормализация трофики в тканях, повышение синтеза структурных белков и ферментов, восстановление цитокинового дисбаланса, иммуномодуляция и т. д. [2, 8, 9, 10]. Как видим, получаемые эффекты предопределяют целенаправленное воздействие на течение репаративных процессов на всех его уровнях. Детальное изучение вышеуказанных процессов привело к разработке и выпуску самых востребованных, светодиодных аппаратов, создающих световые волны красного, желтого, зеленого, синего спектра. Востребованность определяется возможностью аппаратов излучать так называемый «чистый» монохромный свет, полностью исключая инфракрасные компоненты для достижения лечебного эффекта. В литературе имеются сведения о поглощении красного (длина волны 760-620 нм) спектра излучения молекулами ферментов антиоксидантной системы, цитохромоксидазы, супероксиддисмутазы и индукторами репаративной регенерации. Изменения активности молекул приводят к стимуляции фибробластов

образованию соединительной ткани и усилению регенерации. В то же время выработка цитокинов регулирует фагоцитарную активность, производство арахидоновой кислоты, тонус сосудов, ПОЛ. Клиническая эффективность красного излучения заключается в изменении болевой чувствительности, снижении импульсной активности нервов, снижении воспалительных реакций за счет повышения фагоцитоза и успешно применяется при миозитах, невралгиях, плохо заживающих ранах, трофических язвах и т. д. В то же время ограничено количество литературных источников, по изучению воздействия фототерапии на процессы репарации и регенерации поврежденной слизистой оболочки и поэтому, дальнейшее изучение терапевтического воздействия светового излучения в различных спектрах оптического диапазона, что и явилось целью исследования для повышения результативности послеоперационной реабилитации.

Цель исследования – изучение влияния НУЗ кавитационного орошения с фототерапией в ранние сроки послеоперационного периода у ринохирургических больных по содержанию цитокинов.

Материалы и методы

В соответствии с поставленной целью, работа выполнена за период с 2021 по 2022 год на клиникских базах кафедры оториноларингологии. Всего обследовано и подверглись ринохирургическим вмешательствам 68 пациентов с различными деформациями перегородки носа (ДПН). Проведенный статистический анализ отчетных документов показал, что из общего количества пациентов 37,1% составили лица, обратившиеся за хирургической помощью в ЛОР-стационары ЛПУ Челябинска с верифицированным диагнозом «ДПН». Все пациенты контрольной группы и группы исследования жаловались на назальную обструкцию, быструю утомляемость, ринорею, цефалгии боли, чувство заложенности и шум в ушах. Кроме того, частыми жалобами были простудные заболевания, дизосмии, нарушение сна, храп и синдром СОАС, понижение слуха, артериальные гипертензии. Группу исследования составили 35 пациентов, и 33 пациента составили контрольную группу. Исследование проводилось с соблюдением критериев включения и исключения. В стационарных условиях, всем пациентам выполнены внутриносые хирургические вмешательства – риносептопластика, септопластика по методике M.N. Cottle с подслизистой остеоконхотомией или деструкцией высокоэнергетическим лазером. Операция завершалась двусторонней тампонадой носа, на одни сутки тампонами Tamprograss (Германия) для профилактики возможных гематом и кровотечений с давлением, не превышающим 42 мм рт. ст. Основной

задачей послеоперационном ведении пациентов было максимально щадящее отношение к оперированным поверхностям. Для этого проводили анемизацию оперированных полостей два раза в день, элиминировали сгустки крови, раневое отделяемое промыванием физиологическим раствором 0,9%-ного хлорида натрия. Закапывали масляные капли при наличии геморрагических корок, применяли противоотечные, секретомоторные, секретолитические препараты для профилактики синехий, в течении 5-7 дней применяли альфа-адреномиметики, НПВС, препараты, восстанавливающие кислотно-щелочной баланс, нормализующие обмен веществ, уменьшающие отек тканей и т. д.

В дополнение, пациентам группы исследования проводили низкочастотное ультразвуковое кавитационное орошение (НУЗ) оперированных полостей аппаратом «УЗОЛ-01 “Ч” КАВИТАР Фотохром» с частотой 29 кГц и амплитудой 5-25 мкм. При этом температура подачи раствора составляла 37 °С, а плотность мощности излучения 50 мВт с экспозицией по 3 минуты с каждой стороны. Поскольку аппарат снабжен для проведения светолечения встроенным светодиодным комплексом АФС, то одновременно по завершении процедуры НУЗ терапии проводили фотохромотерапию 3-5 минут с длиной волны 450 ± 10 нм (синий свет) и дозой излучения 3 Дж/см² ежедневно в течении 7-8 дней.

Характер и особенности воспалительного ответа на ринохирургическую альтерацию определяли по локальному высвобождению цитокинов (IL-1 β , IL-10, IL-8, TNF α) в центрифугированных промывных смывах назального секрета в группах пациентов. Весь полученный материал подвергался статистической обработке программным обеспечением Statistica 6.0 for Windows. Проверку на нормальность распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Колмогорова—Смирнова. Определяли среднее арифметическое (M), ошибку среднего арифметического (m). Достоверность различий при отсутствии нормального распределения определяли с применением критерия Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

Общеизвестно, что ведущими медиаторами в развитии локальной воспалительной реакции на хирургическую альтерацию ответственны цитокины IL-1: IL-1 α , IL-1 β . Основным механизмом действия указанных цитокинов направлен на регуляцию воспалительных трансформаций слизистой оболочки оперированных полостей носа, повышение функциональной активации тучных и эндотелиальных клеток, фагоцитов, фибробластов. Так, у всех обследуемых не выявлено значимых изменений содержания IL-1 β у пациентов

до хирургического вмешательства, в то время как значимое повышение на ранних сроках послеоперационного периода уровня IL-1 β приходится на 7-е сутки лечения. В цифровых выражениях содержание IL-1 β до ринохирургического вмешательства в контрольной группе составило $1,58 \pm 0,02$ пг/мл, в то время как в основной группе показатель составил $1,88 \pm 0,04$ пг/мл. Уже через одни сутки содержание IL-1 β в контрольной группе повысилось в 2,28 раза, а в основной — в 1,77 раза. В течение последующих дней наблюдалась тенденция к увеличению, и уже через неделю в основной группе показатели уровня IL-1 β пришли в норму.

Касательно содержания IL-8 к концу первых суток после удаления тампонов отмечено повышение в основной группе. Данный показатель характеризует, что высвобождение выполняющих еще и хемоаттрактантную функцию цитокинов IL-1 β и TNF α потенцирует повышение синтеза IL-8. Подтверждением является относительное снижение уровня IL-8 у ринохирургических больных на 7-е сутки в основной группе до $0,90 \pm 0,01$ пг/мл, что практически не отличалось от показателей контрольной группы ($p \geq 0,05$). По-видимому, прослеживаемое к концу первых суток (после удаления тампонов) повышение уровня провоспалительных цитокинов связано с рекрутированием большого количества клеток-продуцентов провоспалительных цитокинов — нейтрофильных гранулоцитов, макрофагов, которые участвуют в репаративных и защитных процессах. Относительно содержания IL-10 у ринохирургических больных отмечено снижение ниже пороговых значений с момента удаления тампонов до конца третьих суток (72 часа), что подтверждает недостаточность иммунного ответа на постхирургический альтеративный стресс, что в свою очередь провоцирует процессы нарушения репарации. В этом контексте положительное воздействие на репаративные процессы НУЗ кавитации в сочетании с фотохромотерапией подтверждается нормализацией содержания IL-10 к 7-м суткам от начала лечения. Познавательны показатели содержания одного из регуляторов иммунного гомеостаза IFN γ , через 24, 48 часов у ринохирургических больных после удаления тампонов, которые снизились в контрольной группе на $1,81 \pm 0,34$ и в основной группе на $1,71 \pm 0,18$ раза. По-видимому, снижение уровня IFN γ в первые сутки после удаления тампонов является показателем, вследствие снижения продуцентов IFN γ -Th1 после оперативного вмешательства, недостаточности иммунного ответа. И в этом случае достоверная нормализация уровня IFN γ на 7-е сутки отмечена у пациентов основной группы.

Показатели содержания IL-2 через одни сутки после удаления тампонов снизились в контрольной группе в 1,81 раза, а в основной группе на 1,47 раза. В данном случае, усиление индукции

растворимого рецептора для IL-2 (IL-2R), может быть одной из причин падения концентрации IL-2. Как правило, появляющийся в первые сутки IL-2R уже на третьи сутки после удаления тампонов достигает своего пика и к этому сроку отмечается и максимальное снижение способности лимфоцитов продуцировать IL-2.

Выводы

Таким образом, НУЗ кавитационное орошение оперированных полостей в сочетании с фо-

тохромотерапией с оптической длиной волны 450 ± 10 нм на ранних сроках послеоперационного периода у ринохирургических больных потенцирует процессы нормализации содержания цитокинов и прежде всего существенному увеличению содержания IL-2, IL-10, IFN γ , снижению содержания IL-1 β , IL-10, IL-8, TNF α . Полученные результаты могут служить показанием использования НУЗ кавитационного орошения оперированных полостей в сочетании с фотохромотерапией у ринохирургических больных.

Список литературы / References

1. Воробьев А.А., Моренко В.М. Особенности течения послеоперационного ринита // Российская ринология, 2007. № 2. С. 87. [Vorobyov A.A., Morenko V.M. Features of the course of postoperative rhinitis. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2007, no. 2, p. 87. (In Russ.)]
2. Дубинец И.Д., Синицкий А.И., Коркмазов М.Ю., Черных Е.И., Кухтик С.Ю. Окислительная модификация белков ткани височной кости при хронических средних отитах // Казанский медицинский журнал, 2019. Т. 100, № 2. С. 226-231. [Dubinets I.D., Sinitsky A.I., Korkmazov M.Yu., Chernykh E.I., Kukhtik S.Yu. Oxidative modification of temporal bone tissue proteins in chronic otitis media. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2019, Vol. 100, no. 2, pp. 226-231. (In Russ.)]
3. Извекова Т.О. О терапевтической эффективности узкополостого излучения синего цвета при хирургическом лечении повреждений периферических нервов // Нелекарственная медицина, 2006. № 3. С. 16-20. [Izvekova T.O. On the therapeutic effectiveness of radiation skopalova blue in the surgical treatment of damages of peripheral nerves. *Nelekarstvennaya meditsina = Non-drug Medicine*, 2006, no. 3, pp. 16-20. (In Russ.)]
4. Кандрашов В.И. Физиотерапия (светолечение): руководство для врачей. Под ред. Н.Р. Палева. М.: Медицина, 2001. [Kandrashov V.I. *Physiotherapy (light therapy): a guide for doctors*. Ed. N.R. Palev]. Moscow: Medicine, 2001.
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. 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.)]
7. 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 immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12, Iss. 21, no. 3, pp. 325-328. (In Russ.)]
8. 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., Lengina 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.)]
9. Коркмазов М.Ю., Коркмазов А.М., Дубинец И.Д., Смирнов А.А., Корнова Н.В. Влияние немедикаментозной терапии на сроки реабилитации и занятие стендовой стрельбой после перенесенных ринохирургических вмешательств // Человек. Спорт. Медицина, 2020. Т. 20, № S1. С. 136-144. [Korkmazov M.Yu., Korkmazov A.M., Dubinets I.D., Smirnov A.A., Kornova N.V. Influence of non-drug therapy on the terms of rehabilitation and clay shooting after rhinosurgical interventions. *Chelovek. Sport. Meditsina = Man. Sport. The Medicine*, 2020, Vol. 20, no. S1, pp. 136-144. (In Russ.)]
10. Коркмазов М.Ю., Дубинец И.Д., Ленгина М.А., Солодовник А.В. 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. [Korkmazov M.Yu., Dubinets I.D., Lengina M.A., Solodovnik A.V. Local concentrations of secretory immunoglobulin A in patients with adenoiditis, rhinosinusitis and exacerbation of chronic suppurative otitis media against the background of the use of physical

methods of exposure in complex therapy. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 297-304. (In Russ.)]

11. 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.)]

12. Талибов А.Х., Коркмазов М.Ю., Ленгина М.А., Кривопапов А.А., Гришаев Н.В. Персонализированный подход к повышению качества жизни и психофизической готовности спортсменов-гиревиков коррекцией сенсорных и вазомоторных расстройств ЛОР-органов // Человек. Спорт. Медицина, 2021. Т. 21, № 4. С. 29-41. [Talibov A.Kh., Korkmazov M.Yu., Lengina M.A., Krivopalov A.A., Grishaev N.V. A personalized approach to improving the quality of life and psychophysical readiness of kettlebell lifters by correcting sensory and vasomotor disorders of the ORL organs. *Chelovek. Sport. Meditsina = Man. Sport. The Medicine*, 2021, Vol. 21, no. 4, pp. 29-41. (In Russ.)]

13. Ушаков А.А. Практическая физиотерапия. М.: Медицинское информационное агентство, 2009. С. 230-231. [Ushakov A.A. *Prakticheskaya fizioterapiya*]. Moscow: Medical News Agency, 2009, pp. 230-231.

14. Шишева А.К., Коркмазов 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.)]

15. Щетинин С.А., Гизингер О.А., Коркмазов 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 immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 3-1, pp. 255-257. (In Russ.)]

Авторы:

Коркмазов 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

Ленгина М.А. — 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

Корнова Н.В. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Рябенко Ю.И. — старший лаборант, медицинский психолог 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 Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Dubinets I.D., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Lengina M.A., PhD (Medicine), Associate Professor Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Korkmazov A.M., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Kornova N.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Ryabenko Yu.I., Senior Laboratory Assistant, Medical Psychologist, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ МИТОХОНДРИЙ CD4⁺T- ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИИ

Королевская Л.Б., Сайдакова Е.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. Митохондрии играют ключевую роль в жизненно важных функциях клетки: производстве энергии, метаболизме, клеточном дыхании, продукции активных форм кислорода, делении и гибели. Нарушение функций этих органелл ассоциировано с развитием различных заболеваний. Важными показателями состояния митохондрий являются их масса и мембранный потенциал. Для оценки этих параметров используют различные флуорохром-меченые зонды, которые можно детектировать методом проточной цитометрии. Возможность использования флуоресцентных митохондриальных красителей совместно с мечеными моноклональными антителами открывает широкие перспективы для изучения метаболических параметров разнообразных клеток иммунной системы. Целью данного исследования была оценка состояния митохондрий CD4⁺T-лимфоцитов методом проточной цитофлюориметрии. Для демонстрации различий параметров митохондрий в качестве групп сравнения были взяты ВИЧ-инфицированные пациенты, получающие антиретровирусную терапию (n = 21), и относительно здоровые добровольцы (n = 23). Объектом исследования служили мононуклеарные клетки, выделенные из периферической крови. Методом проточной цитометрии с использованием коммерческих митохондриально-селективных красителей MitoTracker Green и MitoTracker Orange были определены, соответственно, масса и заряд мембраны митохондрий в общем пуле CD4⁺T-лимфоцитов, а также в субпопуляциях наивных клеток и клеток памяти. Показано, что как у ВИЧ-инфицированных, так и неинфицированных субъектов масса и заряд митохондрий в наивных CD4⁺T-лимфоцитах ниже, чем в клетках памяти. Установлено, что по сравнению со здоровыми донорами у ВИЧ-инфицированных больных повышена масса митохондрий в общем пуле CD4⁺T-лимфоцитов и в субпопуляции клеток памяти, что, однако, не сопровождается ростом заряда мембраны органелл. Таким образом, цитофлюориметрическое определение массы и мембранного потенциала митохондрий с использованием красителей MitoTracker Green и MitoTracker Orange является относительно легким, быстрым и информативным способом предварительной оценки состояния органелл в клетках.

Ключевые слова: митохондрии, CD4⁺T-лимфоциты, проточная цитометрия

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 Genetic 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, К.В. Шмагель
«Оценка параметров митохондрий CD4⁺T-лимфоцитов
периферической крови методом проточной
цитофлюориметрии» // Российский иммунологический
журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 207-212.
doi: 10.46235/1028-7221-1106-FCA
© Королевская Л.Б. и соавт., 2022

For citation:

L.B. Korolevskaya, E.V. Saidakova, K.V. Shmagel "Flow
cytometry assessment of mitochondrial indices in CD4⁺T cells
from peripheral blood", Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2,
pp. 207-212.
doi: 10.46235/1028-7221-1106-FCA
DOI: 10.46235/1028-7221-1106-FCA

FLOW CYTOMETRY ASSESSMENT OF MITOCHONDRIAL INDICES IN CD4⁺T CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD

Korolevskaya L.B., Saidakova E.V., Shmagel K.V.

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

Abstract. Mitochondria play a key role in the vital functions of the cell, i.e., energy production, metabolism, respiration, generation of reactive oxygen species, cell division and death. Impairment of these mitochondrial functions is associated with emergence of various diseases. Their amounts and membrane potential are important indices of the mitochondrial condition. To assess these parameters, various fluorochrome-labeled probes are used, which are detectable by flow cytometry. The opportunity of using fluorescent mitochondrial dyes, together with labeled monoclonal antibodies, opens up new prospects for studying the metabolic parameters in various immune cells. The aim of the present study was to assess the mitochondrial state in CD4⁺T lymphocytes by flow cytometry. To search for the differences in mitochondrial indexes, a group of HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy (n = 21) and healthy volunteers (n = 23) were compared. Mononuclear cells isolated from peripheral blood were under the study. Using flow cytometry and commercial mitochondria-selective dyes MitoTracker Green and MitoTracker Orange, we determined, respectively, the mitochondrial mass and membrane charge in the total CD4⁺T lymphocyte pool, as well as in the naive and memory cell subsets. It has been shown that the mitochondrial mass and charge in naive CD4⁺T lymphocytes are lower than in memory cells, both in HIV-infected and uninfected subjects. Moreover, we have established that the HIV-infected patients have an increased mitochondrial mass in total CD4⁺T lymphocyte pool and in their memory cell subset, as compared with healthy donors. That increase, however, was not accompanied by the higher membrane charge. Thus, the analysis of mitochondrial mass and membrane potential using flow cytometry and MitoTracker Green/MitoTracker Orange dyes is relatively easy, fast, and informative for preliminary assessment of the mitochondrial state.

Keywords: mitochondria, CD4⁺T lymphocytes, flow cytometry

Работа выполнена в рамках государственного задания «Механизмы регуляции иммунной системы» (номер гос. регистрации АААА-А19-119112290007-7).

Введение

Митохондрии являются древнейшими органеллами клетки, участвующими в ее жизненно важных функциях, в том числе производстве энергии, обмене веществ, клеточном дыхании, продукции активных форм кислорода, пролиферации и гибели [2]. Необходимость удовлетворять метаболические и энергетические потребности клетки делает митохондрии динамичными: они способны к модификации формы и размера, в ходе чего могут изменяться масса и число органелл в клетке [2, 9]. Объем митохондрий может составлять до 20-25% от общего объема клетки. Важным показателем функционального состояния митохондрий является их трансмембранный потенциал. Он возникает при переносе протонов через комплексы электрон-транспортной цепи в межмембранное пространство и служит промежуточной формой хранения энергии, используемой аденозинтрифосфат (АТФ)-синтазой для

образования АТФ [10]. Нарушение функции митохондрий ассоциировано с воспалением, нейродегенеративными расстройствами, злокачественными заболеваниями, диабетом, старением [1].

Для исследования заряда и массы митохондрий используются флюорохром-меченые зонды, способные спонтанно проникать в клетку [4, 10]. Так, для оценки мембранного потенциала митохондрий применяют катионные липофильные красители [4]. Катионы притягиваются к отрицательному потенциалу, формируемому вдоль внутренней мембраны митохондрий, и, таким образом, предпочтительно накапливаются в функционально активных митохондриях [6, 10]. Как следствие, более поляризованные митохондрии будут содержать больше красителя [12]. С другой стороны, для определения массы митохондрий важно использовать красители, чувствительность которых не зависит от поляризационного статуса органелл [4]. Флюоресценция клеток, окрашенных таким типом реагентов, прямо пропорциональна содержанию в них митохондрий (массе органелл), что обеспечивается за счет ковалентного связывания красителя с белками митохондрий [4, 11].

Одним из методов детекции сигналов от флюорохром-меченых зондов, окрасивших митохондрии, является проточная цитометрия. Этот высокочувствительный, относительно легкий и быстрый метод позволяет исследовать суспензии клеток в режиме «поштучного» анализа. Кроме того, сочетание флюорохром-меченых зондов с окрашиванием поверхностных маркеров дает возможность оценить статус митохондрий в различных популяциях клеток, например Т-лимфоцитах различной степени зрелости. Это особенно актуально при изучении метаболических параметров клеток иммунной системы при ВИЧ-инфекции, аутоиммунных, онкологических заболеваниях. Для демонстрации различий параметров митохондрий в качестве групп сравнения были взяты ВИЧ-инфицированные и неинфицированные субъекты.

Целью данной работы было исследование состояния митохондрий CD4⁺T-лимфоцитов методом проточной цитометрии.

Материалы и методы

Объектом исследования были мононуклеарные клетки, полученные из периферической крови ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих противовирусные препараты (ВИЧ⁺; n = 21), и относительно здоровых добровольцев (ВИЧ⁻; n = 23). Каждый участник подписал информированное согласие. План работы был одобрен этическим комитетом Пермского краевого центра по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (рег. № IRB00008964). Забор крови проводили в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА (Weihai Hongyu Medical Devices Co Ltd, Китай). Уровень вирусной нагрузки ВИЧ в плазме крови определяли набором Versant HIV-1 RNA 3,0 assay b на анализаторе Versant 440 (Siemens, Германия). Мононуклеарные клетки выделяли центрифугированием двукратно разведенной крови (раствор фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS); Gibco, США) в градиенте плотности Диаколл (1,077 г/мл; Диаэм, Россия). Выделенные клетки помещали в термоинактивированную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС; Biowest, Колумбия), содержащую 10% диметилсульфоксида (AppliChem, Германия), и подвергали контролируемому замораживанию в жидком азоте. Перед проведением исследования клетки размораживали.

Идентификацию жизнеспособных Т-лимфоцитов проводили на проточном цитофлюориметре Fortessa (Becton Dickinson, США) с применением моноклональных антител анти-CD3-AF700 (Becton Dickinson, США), анти-CD45RA-BV650 (Biolegend, США), анти-CD4-Qdot605 и витального красителя LIVE/DEAD®

Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, США). Субпопуляции CD45RA⁺ и CD45RA⁻CD4⁺T-лимфоцитов относили, соответственно, к наивным элементам и клеткам памяти.

С использованием митохондриально-селективных красителей MitoTracker™ Green FM и MitoTracker™ Orange CM-H2TMRos (Invitrogen, США) устанавливали массу и трансмембранный потенциал митохондрий соответственно. Краситель MT Green в виде нефлуоресцентного в водных растворах соединения спонтанно входит в клетку через поверхностную мембрану и избирательно накапливается в митохондриях. Оказавшись под внутренней мембраной митохондрий, реагент взаимодействует с остатками цистеина в составе митохондриальных белков, в результате чего переходит во флуоресцентную форму с максимумом эмиссии в зеленой области спектра [11]. Флуоресценция MT Green не зависит от трансмембранного потенциала митохондрий и прямо пропорциональна массе органелл [11]. Липофильный катионный краситель MT Orange (нефлуоресцентная восстановленная форма тетраметилрозамина) также спонтанно проникает через билипидные мембраны, в том числе поверхностную мембрану клетки, наружную и внутреннюю мембрану митохондрий; накапливается в зоне с высокой концентрацией протонов (под внутренней мембраной митохондрий), где окисляется до флуоресцентной формы [4]. Этот эффект сопровождается изменением свечения клетки: при снижении концентрации протонов (понижение мембранного потенциала) уменьшается накопление красителя и, как следствие, снижается интенсивность свечения. Растворы реагентов готовили согласно инструкциям производителя. К мононуклеарным клеткам вносили MT Green и MT Orange в конечных концентрациях 25 нМ и 500 нМ соответственно. После инкубации проб (+37 °С, 30 мин) клетки отмывали центрифугированием в DPBS. Осадок ресуспендировали в DPBS и окрашивали клетки поверхностными флюорохром-мечеными антителами и витальным красителем. После инкубации (30 мин, комнатная температура, защищенное от света место) клетки отмывали центрифугированием в избыточном объеме раствора DPBS/2% ЭТС. Осадок ресуспендировали в растворе DPBS/2% ЭТС и проводили цитофлюориметрический анализ.

Математическую обработку данных выполняли в программе FlowJo VX (FlowJo LLC, США). Статистический анализ осуществляли с использованием непараметрических методов. В выборке рассчитывали медиану (Me) и интерквартильный размах (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Достоверность различий определяли методом Манна-Уитни. Статистиче-

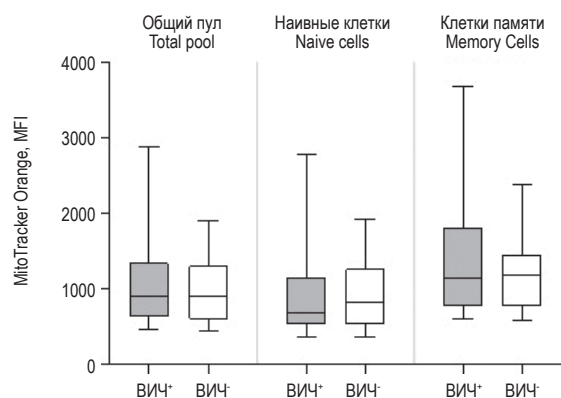


Рисунок 1. Оценка трансмембранного потенциала митохондрий CD4⁺Т-лимфоцитов с использованием красителя MitoTracker Orange

Примечание. По оси абсцисс указаны группы сравнения: ВИЧ-инфицированные (ВИЧ⁺) и неинфицированные (ВИЧ⁻) субъекты. По оси ординат показана медиана яркости флюоресценции (MFI: Median Fluorescence Intensity) MitoTracker Orange в клетках с функционально активными митохондриями. Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные интервалы (прямоугольники) и 10-90%-ные размахи (вертикальные отрезки). Статистические расчеты выполнены по методу Манна–Уитни.

Figure 1. Assessment of mitochondrial transmembrane potential in CD4⁺T cells using the MitoTracker Orange dye

Note. The x-axis shows the comparison groups: HIV-infected (HIV⁺) and uninfected (HIV⁻) subjects. The y-axis shows the median fluorescence intensity (MFI: Median Fluorescence Intensity) of MitoTracker Orange in cells with functionally active mitochondria. Medians (horizontal lines within boxes), interquartile ranges (boxes), and 10-90% ranges (vertical bars) are shown. Statistical calculations were made using the Mann–Whitney method.

ские расчеты и построение графиков выполняли с использованием программы Statistica 6.

Результаты и обсуждение

ВИЧ-инфицированные пациенты более 3 лет получали антиретровирусную терапию (АРТ), эффективность которой подтверждалась подавлением репликации вируса: вирусная нагрузка ВИЧ в крови < 50 копий/мл (предел чувствительности тест-системы). Группы ВИЧ⁺ и ВИЧ⁻ были сопоставимы по возрасту и полу ($p > 0,05$). Численность CD4⁺Т-лимфоцитов у ВИЧ⁺ была существенно ниже, чем у здоровых лиц: 534 (438-656) мкл⁻¹ и 885 (772-1262) мкл⁻¹ ($p < 0,001$).

При исследовании трансмембранного потенциала и массы митохондрий CD4⁺Т-лимфоцитов было установлено следующее. Медиана интенсивности свечения потенциал-чувствительного

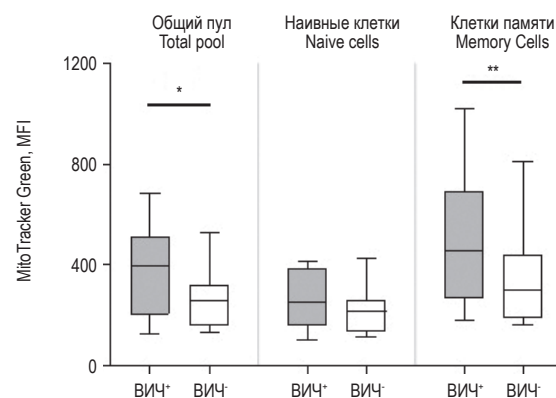


Рисунок 2. Исследование массы митохондрий в CD4⁺Т-лимфоцитах с использованием красителя MitoTracker Green

Примечание. По оси абсцисс указаны группы сравнения: ВИЧ-инфицированные (ВИЧ⁺) и неинфицированные (ВИЧ⁻) субъекты. По оси ординат показана медиана яркости флюоресценции (MFI: Median Fluorescence Intensity) MitoTracker Green в клетках, содержащих краситель в матриксе митохондрий. Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные интервалы (прямоугольники) и 10-90% размахи (вертикальные отрезки). * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ (U-критерий Манна–Уитни).

Figure 2. Study of mitochondrial mass in CD4⁺T lymphocytes using MitoTracker Green dye

Note. The x-axis shows the comparison groups: HIV-infected (HIV⁺) and uninfected (HIV⁻) subjects. The y-axis shows the median fluorescence intensity (MFI: Median Fluorescence Intensity) of MitoTracker Green in cells containing the dye in the mitochondrial matrix. Medians (horizontal lines within boxes), interquartile ranges (boxes), and 10-90% ranges (vertical bars) are shown. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (Mann–Whitney U test).

красителя МТ Orange у ВИЧ⁺ была сопоставима с таковой в группе ВИЧ⁻ ($p > 0,05$; рис. 1). Аналогичные данные были получены при оценке показателей в наивных элементах и клетках памяти ($p > 0,05$). При этом в последних заряд мембраны митохондрий был выше, что оказалось справедливым для обеих исследованных групп ($p < 0,05$).

Цитофлюориметрический анализ показал, что CD4⁺Т-лимфоциты ВИЧ-инфицированных и неинфицированных субъектов существенно отличались способностью накапливать краситель МТ Green в митохондриях. Средняя интенсивность свечения клеток в группе ВИЧ⁺ была выше, чем у ВИЧ⁻ ($p < 0,05$; рис. 2), что свидетельствовало о более высокой массе митохондрий в CD4⁺Т-лимфоцитах ВИЧ-зараженных лиц. При этом, хотя медиана яркости свечения МТ Green в наивных CD4⁺Т-клетках у ВИЧ⁺ была выше соот-

ветствующей величины, установленной у ВИЧ-, статистически значимых различий между группами выявлено не было ($p > 0,05$). В отличие от наивных элементов CD4⁺T-лимфоциты памяти накапливали больше МТ Green в митохондриях, что проявлялось увеличением флуоресценции клеток. Этот эффект был отмечен как у ВИЧ⁺ ($p < 0,01$), так и в группе ВИЧ⁻ ($p < 0,05$). Вместе с тем сниженная относительно ВИЧ⁺ интенсивность свечения красителя в CD4⁺T-лимфоцитах памяти здоровых лиц свидетельствовала о более высокой массе митохондрий в данной субпопуляции клеток у ВИЧ-позитивных субъектов ($p < 0,01$).

Таким образом, в настоящей работе нами показана возможность использования митохондриально-селективных красителей MitoTracker Green и MitoTracker Orange для относительно быстрой оценки состояния митохондрий методом проточной цитометрии. Нами установлено, что у получающих АРТ ВИЧ-инфицированных пациентов по сравнению со здоровыми донорами увеличена масса митохондрий CD4⁺T-лимфоцитов, что, однако, не сопровождается ростом мембранного потенциала органелл. Ранее рядом авторов также не было выявлено отличий между показателями мембранного потенциала митохондрий CD4⁺T-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных субъектов, находящихся на АРТ, и здоровых лиц [8, 14]. При этом если одни исследователи отмечали отсутствие различий в массе митохондрий CD4⁺T-клеток [8], то другие, напротив, указывали на более высокую массу органелл у ВИЧ-позитивных больных, получающих АРТ [14].

Необходимо отметить, что оба использованных нами красителя обладают не только ранее описанными преимуществами, но и недостатками. Так, MitoTracker Green связывается с белками, локализованными на внутренней мембране органелл и, по-видимому, интенсивность свечения клетки после окрашивания данным реагентом будет в большей мере коррелировать с площадью поверхности внутренней мембраны, чем

с общей массой митохондрий [4, 11]. Это может быть критически важным, поскольку не только разные клетки отличаются составом мембранных белков и их расположением, но и одинаковые клетки могут иметь различное метаболическое состояние [13]. Более того, было показано, что трансмембранные АТФ-связывающие кассетные транспортеры (АТФ-binding cassette transporters, ABC), выводящие из клетки различные субстраты, обладают способностью выкачивать краситель MitoTracker Green из CD4⁺T-лимфоцитов [5].

Исходя из вышеизложенного, для более корректной оценки состояния митохондрий методом проточной цитометрии (в дополнение к определению массы и заряда органелл) необходимо также исследовать их функциональные параметры. К таковым можно, например, отнести уровень продукции митохондриями активных форм кислорода; выход в цитоплазму цитохрома при нарушении проницаемости мембраны органелл; определение митохондриального транскрипционного фактора А (mitochondrial transcription factor A, TFAM) – белка, связанного с транскрипцией и репликацией митохондриальной ДНК [3, 7, 8]. Для цитофлуориметрического исследования этих параметров существуют различные флуорохром-меченые зонды.

Заключение

Таким образом, нами показано, что по сравнению со здоровыми донорами у ВИЧ-инфицированных субъектов повышена масса митохондрий в общем пуле CD4⁺T-лимфоцитов и в субпопуляции клеток памяти. Вместе с тем увеличение массы органелл не сопровождается ростом заряда мембраны митохондрий. В целом, цитофлуориметрическое определение массы и мембранного потенциала митохондрий с использованием митохондриально-селективных красителей MitoTracker Green и MitoTracker Orange является относительно легким, быстрым и информативным способом предварительной оценки состояния органелл в клетках.

Список литературы / References

1. Annesley S.J., Fisher P.R. Mitochondria in health and disease. *Cells*, 2019, Vol. 8, no. 7, pp. 680-687.
2. Breda C.N.S., Davanzo G.G., Basso P.J., Saraiva Camara N.O., Moraes-Vieira P.M.M. Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox Biol.*, 2019, Vol. 26, pp. 101255-101272.
3. Campos C.B., Paim B.A., Cosso R.G., Castilho R.F., Rottenberg H., Vercesi A.E. Method for monitoring of mitochondrial cytochrome c release during cell death: Immunodetection of cytochrome c by flow cytometry after selective permeabilization of the plasma membrane. *Cytometry A*, 2006, Vol. 69, no. 6, pp. 515-523.
4. Cottet-Rousselle C., Ronot X., Leverve X., Mayol J.F. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A*, 2011, Vol. 79, no. 6, pp. 405-425.
5. Dimeloe S., Frick C., Fischer M., Gubser P.M., Razik L., Bantug G.R., Ravon M., Langenkamp A., Hess C. Human regulatory T cells lack the cyclophosphamide-extruding transporter ABCB1 and are more susceptible to cyclophosphamide-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 12, pp. 3614-3620.

6. Fan H.H., Tsai T.L., Dzhagalov I.L., Hsu C.L. Evaluation of mitochondria content and function in live cells by multicolor flow cytometric analysis. *Methods Mol. Biol.*, 2021, Vol. 2276, pp. 203-213.
7. Kauffman M.E., Kauffman M.K., Traore K., Zhu H., Trush M.A., Jia Z., Li Y.R. MitoSOX-based flow cytometry for detecting mitochondrial ROS. *React. Oxyg. Species (Apex)*, 2016, Vol. 2, no. 5, pp. 361-370.
8. 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.
9. Perry C.G.R., Hawley J.A. Molecular basis of exercise-induced skeletal muscle mitochondrial biogenesis: historical advances, current knowledge, and future challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2018, Vol. 8, no. 9, a029686. doi: 10.1101/cshperspect.a029686
10. Perry S.W., Norman J.P., Barbieri J., Brown E.B., Gelbard H.A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*, 2011, Vol. 50, no. 2, pp. 98-115.
11. Presley A.D., Fuller K.M., Arriaga E.A. MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2003, Vol. 793, no. 1, pp. 141-150.
12. Solaini G., Sgarbi G., Lenaz G., Baracca A. Evaluating mitochondrial membrane potential in cells. *Biosci. Rep.*, 2007, Vol. 27, no. 1-3, pp. 11-21.
13. Sun H., Li X. Metabolic reprogramming in resting and activated immune cells. *Metabolomics (Los Angel.)*, 2017, Vol. 7, no. 1, pp. 188-194.
14. Yu F., Hao Y., Zhao H., Xiao J., Han N., Zhang Y., Dai G., Chong X., Zeng H., Zhang F. Distinct mitochondrial disturbance in CD4⁺T and CD8⁺T cells from HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2017, Vol. 74, no. 2, pp. 206-212.

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

Сайдакова Е.В. — д.б.н., заведующая лабораторией молекулярной 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

Authors:

Korolevskaya L.B., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Saidakova E.V., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, 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 Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 11.05.2022
Принята к печати 28.05.2022

Received 11.05.2022
Accepted 28.05.2022

ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM 791 НА МОДЕЛИ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*

**Костоломова Е.Г.¹, Тимохина Т.Х.¹, Перунова Н.Б.^{1,2},
Полянских Е.Д.¹, Сахаров Р.А.¹, Комарова А.В.¹**

¹ ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
России, г. Тюмень, Россия

² Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук,
г. Оренбург, Россия

Резюме. В последние десятилетия накоплены данные об иммуотропной активности бифидофлоры, основанные на влиянии дано группы бактерий на изолированные лимфоидные фолликулы, дендритные клетки, агрегаты В-клеток, про- и противовоспалительные цитокины и хемокины, а также участие бифидофлоры в дискриминация «чужеродного материала» при формировании микросимбиоза. Актуальность исследований связана не только с фундаментальной проблемой симбиоза человека и микробиоты, но и с перспективой практического применения полученных знаний в направлении создания пробиотиков, влияющих на иммунную систему. В работе приведены результаты исследования влияния супернатанта и бактериальных клеток штамма *Bifidobacterium bifidum* 791 (*B. bifidum* 791) на модели моноклеарных клетки (МНК) периферической крови человека. В работе использовали эталонный штамм *B. bifidum* 791 (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ «Генетика», № депонента АС-1247), использующийся при производстве пробиотика «Бифидумбактерин» (ЗАО «Экополис», г. Ковров). МНК выделяли из периферической крови 20 здоровых доноров. Для окрашивания МНК использовали моноклональные антитела CD4, CD8, CD3, CD25, CD69, CD56 (Beckman Coulter, США). Анализ субпопуляционного состава проводили методом многоцветной проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Эксперименты проводили в двух повторах. Исследования показали, что пробиотические штаммы обладают активизирующим и модулирующим действием на иммунокомпетентные клетки. Исследуемый штамм *B. bifidum* 791 оказывал иммуномодулирующее действие на клетки неспецифического и адаптивного иммунитета: увеличивал % CD69⁺ клеток в субпопуляции CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов, CD69 (%) и CD25 (%) НК-клетками, а также усиливал активацию цитотоксических лимфоцитов. Супернатант бифидобактерий оказывал более выраженное влияние на МНК (увеличивает экспрессию CD69 Тh-клетками, индуцировал экспрессию CD25 Т-цитотоксическими клетками и увеличивал

Адрес для переписки:

Костоломова Елена Геннадьевна
ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения России
625027, Россия, г. Тюмень, ул. Котовского, 5/2.
Тел.: 8 (3452) 20-00-61.
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 (3452) 20-00-61.
E-mail: lenakost@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Костоломова, Т.Х. Тимохина, Н.Б. Перунова,
Е.Д. Полянских, Р.А. Сахаров, А.В. Комарова «Оценка
иммуномодулирующей активности *Bifidobacterium*
bifidum 791 на модели клеток врожденного и
адаптивного иммунитета в эксперименте *in vitro*»
// Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 2. С. 213–218. doi: 10.46235/1028-7221-1133-IVE
© Костоломова Е.Г. и соавт., 2022

For citation:

E.G. Kostolomova, T.Kh. Timokhina, N.B. Perunova,
E.D. Polyanskikh, R.A. Sakharov, A.V. Komarova "In vitro
evaluation of immunomodulatory activity of *Bifidobacterium*
bifidum 791 in the cell model of innate and adaptive
immunity", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 213–218.
doi: 10.46235/1028-7221-1133-IVE
DOI: 10.46235/1028-7221-1133-IVE

экспрессию CD69 (%) и CD25 (%) НК-клетками), в сравнении с бактериальными клетками *B. bifidum* 791. Полученные данные способствуют пониманию механизмов иммунорегуляторного влияния нормобиоты (на модели бифидобактерий) при формировании симбиотических взаимодействий «микробиота – хозяин» и вносят вклад в развитие нового направления – «инфекционная симбиология». Дальнейшее исследование иммуномодулирующей активности бифидофлоры имеет перспективу развития в направлении поиска и отбора штаммов бифидобактерий с целью создания новых пробиотических препаратов таргетного действия.

Ключевые слова: *Bifidobacterium bifidum*, мононуклеарные клетки, субпопуляция лимфоцитов, иммунорегуляция, пробиотики

IN VITRO EVALUATION OF IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM 791 IN THE CELL MODEL OF INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY

**Kostolomova E.G.^a, Timokhina T.Kh.^a, Perunova N.B.^{a, b},
Polyanskikh E.D.^a, Sakharov R.A.^a, Komarova A.V.^a**

^a Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

^b Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russian Federation

Abstract. Over recent decades, multiple data were accumulated on immunotropic activity of *Bifidum* flora, based on effects of these bacteria on isolated lymphoid follicles, dendritic cells, B-cell aggregates, pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines, as well as participation of bifidoflora in the recognition of “non-self” during the development of microsymbiocenosis. The relevance of research in the field is associated both with fundamental issues of human host/microbiota symbiosis, but also with the prospects of practical application of the knowledge gained towards design of probiotics that affect the immune system. This article presents the results concerning effects of supernatant and bacterial cells of *Bifidobacterium bifidum* 791 (*B. bifidum* 791) strain in the model of human peripheral blood mononuclear cells (MNCs). We used the reference strain *B. bifidum* 791 (Russian Collection of Industrial Microorganisms from the GosNII Genetika Federal State Enterprise, Deposition No. AS-1247), which is used in production of the probiotic drug “Bifidumbacterin” (CJSC Ecolopolis, Kovrov). Mononuclear cells (MNCs) were isolated from peripheral blood of 20 healthy donors. MNCs were stained with monoclonal antibodies for CD4, CD8, CD3, CD25, CD69, CD56 (Beckman Coulter, USA). Analysis of the cellular subsets was performed by multicolor flow cytometry with Cytomics FC500 instrument (Beckman Coulter, USA). The experiments were carried out in duplicate. The studies have shown that probiotic strains have an activating and modulating effect upon immunocompetent cells. The studied *B. bifidum* 791 strain had an immunomodulatory effect on the cells of nonspecific and adaptive immunity: it increased the percentage of CD69⁺ cells in the subpopulation of CD3⁺CD8⁺T lymphocytes, CD69 (%) and CD25 (%) NK cells, and promoted activation of cytotoxic lymphocytes. The supernatant of bifidobacteria had a more pronounced effect on MNCs. E.g., it increased the expression of CD69 by Th cells, induced the expression of CD25 by T cytotoxic cells, and increased the CD69 and CD25 expression (%) by NK cells compared to *B. bifidum* 791 bacterial cells. These data contribute to understanding the mechanisms of immunoregulatory influence of normobiota (in the *Bifidobacteria* models) by formation of symbiotic interactions “microbiota – host” and contribute to the development of a new research area, i.e., “infectious symbiology”. Further study of immunomodulatory activity of bifidoflora has the prospectives of searching and selection of *Bifidobacteria* strains, in order to create new targeted probiotic preparations.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*, mononuclear cells, lymphocyte subpopulation, immunoregulation, probiotics

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

Введение

Функции бифидофлоры разнообразны, но основной является поддержание гомеостаза хозяина. Бифидофлоре принадлежит ведущая роль в синтезе биологически активных веществ, улучшении процессов всасывания и гидролиза жиров, белкового и минерального обмена [1, 6].

В последние десятилетия накоплены данные об иммуотропной активности бифидобактерий. Показан вклад бифидобактерий в развитие и функционирование изолированных лимфоидных фолликулов, специализированных кишечных структур, составленных из дендритных клеток и агрегатов В-клеток. В физиологических условиях штаммы бифидобактерий повышают колонизационную резистентность, подавляют воспалительные реакции и апоптоз [9]. Показано, что первичная дискриминация «чужеродного материала» бифидобактериями – инициальный этап последующего «сигналинга» в регуляции иммунного гомеостаза хозяина. Дальнейшие этапы регуляции осуществляются через дендритные клетки непосредственно бифидобактериями, их метаболитами с последующим воздействием на дифференцировку наивных CD4⁺T-лимфоцитов и поддержанием оптимального цитокинового баланса кишечного биотопа человека [2]. Установлено, что при взаимодействии специфической молекулы бифидобактерий, МАРР, с PRR, представленным на мембране эпителиальных/иммунных клеток, в основном, определяет клеточную структуру слизистой оболочки кишечника [12].

В различных исследованиях отмечено увеличение продукции широкого спектра про- и противовоспалительных цитокинов, сопровождающееся стимуляцией лейкоцитов крови при назначении пациентам пробиотиков содержащих бифидобактерии. Подтверждением иммуномодулирующей функции бифидобактерий являются данные зарубежных авторов о влиянии бифидосодержащих пробиотиков не только на индукцию, но и подавление выработки провоспалительных цитокинов и хемокинов [1, 7, 10].

С учетом вышеизложенного, интерес к дальнейшим исследованиям иммуномодулирующих свойств пробиотических бактерий очевиден. Это связано не только с фундаментальной проблемой симбиоза человека и микробиоты, но и с перспективой практического применения полученных знаний в направлении создания пробиотиков, влияющих на иммунную систему в желаемом

направлении. Данный факт требует разработки моделей для оценки иммуномодулирующего влияния бактерий с целью скрининга штаммов, способных оказывать влияние на иммунитет человека. Несмотря на то, что модели *in vitro* имеют важные ограничения, они позволяют провести предварительный скрининг эффектов, которые бактериальные клетки или их фракции могут оказывать на различные компоненты иммунного ответа [8]. В большинстве моделей *in vitro*, основанных на иммунных клетках, используются мононуклеарные клетки периферической крови (МНК).

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния супернатанта (СН) и бактериальных клеток (БК) штамма *B. bifidum* 791 на модели мононуклеарных клеток периферической крови человека (МНК).

Материалы и методы

В работе использовали эталонный штамм *B. bifidum* 791 (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ «Генетика», № депонента АС-1247), использующийся при производстве пробиотика «Бифидум-бактерин» (ЗАО «Экополис», г. Ковров). Ранее была доказана антимикробную активность экзо-метаболитов данного препарата [4].

Для получения СН и БК исследуемого штамма, рабочую концентрацию *B. bifidum* 791 (5×10^7 КОЕ/мл) инокулировали на дно пробирки с 9 мл бульона Шедлера (HIMEDIA, Индия). Пробирки инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 48 часов. Для получения супернатанта (экзометаболитов) бульонные культуры бифидобактерий центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут, надосадочную культуральную жидкость отделяли от клеток и стерилизовали через мембранные фильтры (Millipore, 0,22 мкм). С целью получения суспензии бактериальных клеток *B. bifidum* 791, осадок, полученный после центрифугирования бульонной культуры, дважды отмывали 0,9% физиологическим раствором хлорида натрия. Далее готовили бактериальную взвесь на 0,9%-ном физиологическом растворе хлорида натрия с концентрацией микроорганизмов 10^9 КОЕ/мл (3 McF).

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли в стерильных условиях из периферической крови 20 практически здоровых доноров (10 мужчин и 10 женщин). Кровь забирали из локтевой вены в стерильную вакуумную пробирку с К3ЭДТА. МНК получали методом градиентного центрифугирования (400 g) в градиенте плотности фиколл-верографин (Pharmacia, Швеция) – 1,077 г/см³. МНК доведенные до 2×10^6 клеток/мл, инкуби-

ровали в 24-луночных планшетах в присутствии бактерий в соотношении 1:1 и экзометаболитов в полной культуральной среде в течение 72 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Нестимулированные МНК использовали в качестве отрицательного контроля.

Для окрашивания МНК использовали моноклональные антитела CD4, CD8, CD3, CD25, CD69, CD56 (Beckman Coulter, США). Анализ субпопуляционного состава проводили методом многоцветной проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США).

Эксперименты проводили в двух повторах. Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, США). Статистические результаты выражали в виде средней ошибки средней величины (*m*). Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для оценки влияния бифидобактерий наименее компетентные клетки, супернатант и клеточные экстракты бактерий *B. bifidum* 791 соинкубировали с МНК в соотношении 1:1. Результаты оценивали методом многоцветной проточной цитометрии.

На первом этапе с целью создания модели *in vitro* было проведено исследование жизнеспособности МНК с использованием витального красителя 7AAD после 72 часов инкубации с СН и БК *B. bifidum* 791. Установлено, что жизнеспособность иммунокомпетентных клеток составила 91±2,6% при соинкубации с полной инкубационной средой, 74±3,9% – с СН *B. bifidum* 791 и 49±5,1% – с КЭ *B. bifidum* 791. Далее, исследование влияния бифидобактерий на маркеры активации и активность НК-клеток оценивали только в жизнеспособных клетках. Маркеры активации и пролиферация Т-лимфоцитов обычно являются параметрами для оценки иммунной функции CD69 и CD25 представляют собой клеточные молекулы, экспрессия которых может быть индуцирована на Т-клетках, В-клетках, НК-клетках и других клетках путем стимуляции патогенами во время воспаления или митогенами. Следовательно, их поверхностная экспрессия может быть использована для оценки активации лимфоцитов.

На втором этапе исследований клетки окрашивали соответствующими комбинациями флуоресцентно меченных мышинных моноклональных антител против человека для различия субпопуляций лимфоцитов. При оценке иммуномодулирующей активности бифидобактерий на модели МНК *in vitro*, было установлено, что супернатант, и суспензия бактериальных клеток исследуемого штамма бифидобактерий были способны уве-

личивать экспрессию CD69 Т-клетками (CD3⁺, составляющие 79% лимфоцитов) ($p > 0,05$). При этом БК *B. bifidum* 791 не влияли на экспрессию CD69 (в CD3⁺CD4⁺Th-клетками (составляющими 51% лимфоцитов от CD3⁺), а СН исследуемого штамма – незначительно увеличивали экспрессию CD69 Th-клетками (3,24±0,98% и 0,69±0,2% соответственно) ($p < 0,05$). Примечательно, что и бактериальные клетки и супернатант *B. bifidum* 791 увеличивали % CD69⁺ клеток в субпопуляции CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов, в норме составляющих 27% популяции Т-лимфоцитов (6,88±2,13% и 11,34±2,29% против 1,92±0,64% в контроле соответственно) ($p < 0,05$).

Также было выявлено, что БК и СН *B. bifidum* 791 преимущественно усиливали активацию цитотоксических лимфоцитов, что, по-видимому, является общей чертой пробиотических штаммов и подтверждается данными зарубежных исследователей [5]. Бактериальные клетки исследуемого пробиотического штамма бифидобактерий не влияли на экспрессию CD25 Т-клетками, Th или Ts-клетками. При этом супернатант *B. bifidum* 791 индуцировал экспрессию CD25 Т-цитотоксическими клетками (7,62±1,33% против 2,59±0,88% в контроле) ($p < 0,05$).

Известно, что НК-клетки являются компонентом неспецифического иммунного ответа, участвующего в разрушении опухолевых клеток и инфицированных вирусом клеток и составляют примерно 15% лимфоцитов. В эксперименте было получено значительное увеличение экспрессии CD69 (%) и CD25 (%) НК-клетками при сокультивировании как с БК, так и с СН исследуемого штамма бифидобактерий: полученные значения варьировали от 57,55 до 82,52% и от 8,08 до 22,26% соответственно при значениях в контрольных пробах 4,0 и 0,19 соответственно.

В настоящее время большинство пробиотических продуктов и препаратов создается на основе бифидобактерий, являющихся «ключевым» звеном кишечной микробиоты человека и выполняющих многофункциональную роль в поддержании гомеостаза хозяина. Это обусловлено тем, что бифидобактерии обеспечивают «устойчивость к заселению» (колонизации) тканей и органов человека патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, обладают иммуностропной активностью и огромным потенциалом метаболических функций, что позволяет рассматривать их как эффективный «био корректор» и основу для создания лечебно-профилактических препаратов [2, 11].

В проведенном исследовании установлено, что пробиотический штамм *B. bifidum* 791, используемый в производстве бифидосодержащих препаратов, оказывает иммуномодулирующее дей-

ствии на клетки неспецифического и адаптивного иммунитета. При этом результат воздействия на МНК различался при воздействии бактериальных клеток и супернатанта бифидобактерий. Полученные данные подтверждают значение супернатанта культур бифидобактерий в поддержании иммунного гомеостаза, показанный ранее на модели микросимбиоза кишечника человека, реализуемый через цитокиновый и антицитокиновый профиль хозяина [1].

Исследования показали, что пробиотические штаммы способны оказывать активизирующее и модулирующее воздействие на иммунокомпетентные клетки, что, возможно обеспечивает защиту против кишечных инфекций [3].

Таким образом, полученные материалы способствуют пониманию механизмов иммунорегуляторного влияния нормобиоты (на модели бифидобактерий) при формировании симбиотических взаимодействий «микробиота – хозяин» и вносят вклад в развитие нового направления – «инфекционная симбиология». С другой стороны, дальнейшее развитие исследований имеет практическую значимость, поскольку исполь-

зование предложенной модели можно использовать для отбора штаммов бифидобактерий с высокой иммуномодулирующей активностью с целью создания пробиотических препаратов таргетного действия.

Выводы

1. Разработана модель *in vitro* сокультивирования МНК и клеточного концентрата *B. bifidum*.

2. Пробиотический штамм 791 оказывает иммуномодулирующее действие на клетки неспецифического и адаптивного иммунитета: увеличивает % CD69⁺ клеток в субпопуляции CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов, CD69 (%) и CD25 (%) НК-клетками, а также усиливает активацию цитотоксических лимфоцитов.

3. Супернатант бифидобактерий оказывает более выраженное влияние на МНК (увеличивает экспрессию CD69 Тh-клетками, индуцирует экспрессию CD25 Т-цитотоксическими клетками и увеличивает экспрессию CD69 (%) и CD25 (%) НК-клетками), в сравнении с бактериальными клетками *B. bifidum* 791.

Список литературы / References

1. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека. Екатеринбург: УрО РАН, 2014. 212 с. [Bukharin O.V., Perunova N.B., Ivanova E.V. Bifidoflora in human associative symbiosis]. Yekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. 212 p.
2. Бухарин О.В., Стадников А.А., Перунова Н.Б. Роль окситоцина и микробиоты в регуляции взаимодействия про- и эукариот при инфекции. Екатеринбург: УрО РАН, 2018. 247 с. [Bukharin O.V., Stadnikov A.A., Perunova N.B. The role of oxytocin and microbiota in the regulation of pro- and eukaryotic interactions during infection]. Yekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018. 247 p.
3. Погожева А.В., Шевелева С.А., Маркова Ю.М. Роль пробиотиков в питании здорового и больного человека // Лечащий врач, 2017. № 5. С. 67-75. [Pogozheva A.V., Sheveleva S.A., Markova Yu.M. The role of probiotics in the nutrition of a healthy and sick person. *Lechashchiy Vrach = Attending Physician*, 2017, no. 5, pp. 67-75. (In Russ.)]
4. Тимохина Т.Х., Марков А.А., Паромова Я.И., Самикова В.Н., Перунова Н.Б. Способ получения экзо-метаболитов бифидобактерий с высокой антимикробной активностью // Медицинская наука и образование Урала, 2016. № 2. С. 152-154. [Timokhina T.Kh., Markov A.A., Paromova Ya.I., Samikova V.N., Perunova N.B. Method for obtaining exometabolites of bifidobacteria with high antimicrobial activity. *Meditinskaya nauka i obrazovanie Urala = Medical Science and Education of the Urals*, 2016, no. 2, pp. 152-154. (In Russ.)]
5. de Vrese M., Winkler P., Rautenberg P., Harder T., Noah C., Laue C., Ott S., Hampe J., Schreiber S., Heller K., Schrezenmeir J. Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on common cold episodes: a double blind, randomized, controlled trial. *Clin. Nutr.*, 2005, Vol. 24, no. 4, pp. 481-491.
6. Esteban-Torres M., Ruiz L., Lugli G.A., Ventura M., Margolles A., Sinderen D. Editorial: role of bifidobacteria in human and animal health and biotechnological applications. *Front. Microbiol.*, 2021, Vol. 12, 785664. doi: 10.3389/fmicb.2021.785664.
7. Kekkonen R.A., Lummela N., Karjalainen H., Latvala S., Tynkkynen S., Jarvenpaa S., Kautiainen H., Julkunen I., Vapaatalo H., Korpela R. Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World J. Gastroenterol.*, 2008, Vol. 14, no. 13, pp. 2029-2036.
8. Kim J., Koo B.K., Knoblich J.A. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2020, Vol. 21, no. 10, pp. 571-584.
9. Ruiz L., Delgado S., Ruas-Madiedo P., Sánchez B., Margolles A. Bifidobacteria and their molecular communication with the immune system. *Front. Microbiol.*, 2017, Vol. 8, 2345. doi: 10.3389/fmicb.2017.02345.
10. Shida K., Nanno M. Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff. *Trends Immunol.*, 2008, Vol. 29, no. 11, pp. 565-573.

11. Suvorov A. Gut microbiota, probiotics, and human health. *Biosci. Microbiota Food Health*, 2013, Vol. 32, no. 3, pp. 81-91.

12. Zheng D., Liwinski T., Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res.*, 2020, Vol. 30, no. 6, pp. 492-506.

Авторы:

Костоломова Е.Г. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, г. Тюмень, Россия

Тимохина Т.Х. — д.б.н., доцент, заведующая кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, г. Тюмень, Россия

Перунова Н.Б. — д.м.н., профессор РАН, ведущий научный сотрудник Университетского НИИ медицинских биотехнологий и биомедицины ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, г. Тюмень; ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Полянских Е.Д. — студентка педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, г. Тюмень, Россия

Сахаров Р.А. — студент лечебного факультета ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, г. Тюмень, Россия

Комарова А.В. — студентка лечебного факультета ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, г. Тюмень, Россия

Authors:

Kostolomova E.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Timokhina T.Kh., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Perunova N.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, University Institute of Medical Biotechnologies and Biomedicine, Tyumen State Medical University, Tyumen; Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russian Federation

Polyanskikh E.D., Student, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Sakharov R.A., Student, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Komarova A.V., Student, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Поступила 15.05.2022
Принята к печати 15.06.2022

Received 15.05.2022
Accepted 15.06.2022

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА СЕРОПОЗИТИВНЫХ ПАЦИЕНТОВ ПО АНТИТЕЛАМ ПРОТИВ SARS-CoV-2 В ТЕЧЕНИЕ ДВУХ С ПОЛОВИНОЙ ЛЕТ РАЗВИТИЯ ПАНДЕМИИ COVID-19

Крицкий И.С.¹, Зурочка В.А.^{1,2}, Ху Д.³, Сарапульцев А.П.^{1,2}

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

² ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

³ Хуачжунский университет науки и технологий, Ухань, Китай

Резюме. Серология, являясь оперативным и относительно недорогим методом определения COVID-19, может играть важную роль в борьбе с пандемией SARS-CoV-2. Целью исследования было изучение динамики изменения количества серопозитивных пациентов по антителам против SARS-CoV-2 в течение двух с половиной лет развития пандемии COVID-19.

В исследовании приняли участие 6051 человек. Среди них было 2840 женщины и 3211 мужчины. Средний возраст составил $41,68 \pm 0,17$ (M \pm SEM). Все участники исследования на момент проведения анализа являлись жителями Челябинской области. Сбор данных осуществлялся в период с 01.06.2020 по 18.01.2022. Серопозитивность оценивалась с помощью тестирования на антитела IgG, IgM и IgA (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия) против SARS-CoV-2 методом «непрямого» двухэтапного иммуноферментного анализа (ИФА).

В ходе исследования за весь период было получено 27 (20,45%) отрицательных, 99 (75%) положительных и 6 (4,55%) сомнительных результатов ИФА на IgA к SARS-CoV-2; 2433 (42,35%) отрицательных, 3245 (56,48%) положительных и 67 (1,17%) сомнительных результатов ИФА на IgG, и 2710 (70,41%) отрицательных, 996 (25,88%) положительных и 143 (3,72%) сомнительных результатов ИФА на IgM. В целом наибольшая доля положительных результатов была выявлена у иммуноглобулинов класса А. Был определен волновой характер распределения плотности всех антител-положительных пациентов, не связанный с пиковыми значениями распределения заболеваний COVID-19 в Челябинской области. Большая часть волн серопревалентности была обнаружена раньше волн заболеваемости SARS-CoV-2. Установлена положительная взаимосвязь серопозитивности IgG и IgM против SARS-CoV-2 с возрастом и женским полом.

В целом серологические методы исследования и регулярный мониторинг антител против SARS-CoV-2 могут играть важную роль в оценке распространенности пандемии коронавируса и иммунного ответа на инфекцию внутри популяции.

Ключевые слова: антитела, иммунитет, иммуноферментный анализ, серопозитивность, SARS-CoV-2, COVID-19

Адрес для переписки:

Крицкий Игорь Сергеевич
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (950) 658-74-62.
E-mail: igor81218@gmail.com

Address for correspondence:

Kritsky Igor S.
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,
Russian Academy of Sciences
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,
Pervomayskaya str., 106.
Phone: 7 (950) 658-74-62.
E-mail: igor81218@gmail.com

Образец цитирования:

И.С. Крицкий, В.А. Зурочка, Дэшэн Ху,
А.П. Сарапульцев «Оценка динамики изменения
количества серопозитивных пациентов по антителам
против SARS-CoV-2 в течение двух с половиной
лет развития пандемии COVID-19» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 219–226.
doi: 10.46235/1028-7221-1153-DOC

© Крицкий И.С. и соавт., 2022

For citation:

I.S. Kritsky, V.A. Zurochka, Desheng Hu, A.P. Sarapultsev
“Dynamics of changes in the number of SARS-CoV-2
seropositive patients over two years of the COVID-19
pandemic”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 219–226.
doi: 10.46235/1028-7221-1153-DOC
DOI: 10.46235/1028-7221-1153-DOC

DYNAMICS OF CHANGES IN THE NUMBER OF SARS-CoV-2 SEROPOSITIVE PATIENTS OVER TWO YEARS OF THE COVID-19 PANDEMIC

Kritsky I.S.^a, Zurochka V.A.^{a, b}, Hu D.^c, Sarapultsev A.P.^{a, b}

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

^b South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

^c Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

Abstract. Serological assays, being rapid and relatively inexpensive methods for detecting COVID-19, may play an important role in combating the SARS-CoV-2 pandemic. The aim of the present study was to assess dynamics of changes in the number of seropositive patients for SARS-CoV-2 antibodies over 2.5 years of the evolving COVID-19 pandemic. The study included 6051 persons (2840 women and 3211 males). Their mean age was 41.68 ± 0.17 years ($M \pm SEM$). At the time of this survey, all participants were residents of the Chelyabinsk region. General information was collected over the period from 06/01/2020 to 01/18/2022. Seropositivity for SARS-CoV-2 was assessed by test kits for IgG, IgM and IgA antibodies (JSC Vector-Best, Novosibirsk, Russia) against SARS-CoV-2 using “indirect” two-stage enzyme immunoassay (ELISA). Over the entire period, 27 cases were seronegative (20.45%); 99 samples were positive for IgA to SARS-CoV-2 (75%), and 6 samples (4.55%) yielded questionable ELISA results. IgG testing for SARS-CoV-2 antibodies was negative in 2433 cases (42.35%); 3245 samples (56.48%) were positive, and 67 specimens provided (1.17%) doubtful results using ELISA tests. IgM antibodies were not revealed in 2710 (70.41%) cases; 996 were positive (25.88%), and 143 specimens (3.72%) yielded doubtful results by ELISA technique. In general, the highest proportion of positive results was found in class A immunoglobulins. The wave-like distribution of the density among all antibody-positive patients was revealed, which, however, was not associated with peak values of COVID-19 morbidity in Chelyabinsk Region. Most waves of seroprevalence were detected before the waves of SARS-CoV-2 infection. A positive relationship was established between IgG and IgM seropositivity against SARS-CoV-2 with age and female gender. Conclusion. In general, serological testing and regular monitoring of antibodies against SARS-CoV-2 may play an important role in assessing its prevalence during the coronavirus pandemic and immune response to the infection at a population level.

Keywords: antibodies, immunity, enzyme immunoassay, seropositivity, SARS-CoV-2, COVID-19

Работа выполнена по гранту РФФИ и NSFC, 20-515-55003.

Введение

11 марта 2020 года ВОЗ объявила новую коронавирусную инфекцию SARS-CoV-2, впервые обнаруженную в китайском городе Ухань в декабре 2019 года, пандемией. Вирус быстро распространился по множеству стран, приводя к высоким уровням заболеваемости и смертности. Спустя более чем два года, по оценке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) во всем мире было зарегистрировано более 500 миллионов подтвержденных случаев заболевания и более 6 миллионов случаев смерти.

В настоящее время «золотым стандартом» подтверждения COVID-19, одобренным ВОЗ [5], является метод амплификации нуклеиновых кислот с помощью полимеразной цепной реакции с

обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени. В то же время данный метод диагностики имеет ряд ограничений. Так, проведение методики ПЦР требует хорошо подготовленного персонала, а также сложного и дорогостоящего оборудования, которое обычно находится в крупных лабораториях с высокими требованиями по биобезопасности. При этом ОТ-ПЦР тестирование занимает достаточно много времени, требуя от нескольких часов до 2-3 дней для получения окончательных результатов [12]. Наконец, чувствительность и точность отдельных наборов для проведения ОТ-ПЦР может вызывать сомнения [11]. В этом случае появление ложноотрицательных результатов может объясняться ошибками на преаналитическом этапе тестирования (во время сбора, хранения, транспортировки и обработки биологических образцов), а также тем, что эффективность тестирования во многом опреде-

ляется временными рамками и слишком раннее или слишком позднее тестирование может привести к неверным результатам [8].

В то же время, в связи с большим влиянием SARS-CoV-2 на сферу глобального здравоохранения и серьезными последствиями, которые испытывают медицинские учреждения во всем мире, для сдерживания и контроля коронавирусной инфекции (COVID-19) требуются надежные, эффективные и недорогие средства диагностики. Это приводит к активному развитию и широкому применению других методов лабораторной диагностики SARS-CoV-2. Большую часть из них можно разделить на две категории. Первая, к которой относится амплификация нуклеиновых кислот методом ПЦР, а также ряд других анализов, направлена на обнаружение вируса либо его частей в биологических образцах пациента. Такие методы иногда называют «прямыми». Вторая группа методов направлена на оценку иммунного ответа, возникающего вследствие инфицирования (в том числе определение вирусоспецифических антител – серологические методы). Серологические методы в основном используются для характеристики гуморального иммунного ответа и обычно предназначены для обнаружения человеческих антител IgA, IgM и IgG на SARS-CoV-2 [9]. Выработка специфических антител (сероконверсия) имеет определенные временные рамки, которые могут помочь определить стадию и тяжесть инфекционного заболевания. Так, в исследовании, опубликованном в июле 2020 года, сероконверсия IgM и IgG в ответ на SARS-CoV-2 наблюдалась у более 80% участников в среднем через 8 и 10 дней после проявления симптомов. При этом пиковые значения величины IgM были выше у пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии [7]. В другом исследовании сероконверсия отмечается с 15-го дня от начала заболевания – антитела IgM и IgG выявлялись у 94,3% и 79,8% пациентов, соответственно [15]. Имеются данные о среднем времени сероконверсии для IgA, IgM и IgG в 13, 14 и 14 дней соответственно, в то время как самый ранний случай сероконверсии при этом наблюдался у IgA – 2 дня после появления начальных симптомов [13, 14].

Несмотря на то, что в настоящее время серологические методы исследования играют по большей мере вспомогательную роль по отношению к тестам с амплификацией нуклеиновых кислот в диагностике COVID-19, они имеют целый ряд преимуществ. Во-первых, эти методы могут дать более точную оценку распространенности инфекции SARS-CoV-2, так как способны обнаружить антитела у переболевших лиц, не имеющих ПЦР-теста, или у бессимптомных пациентов [4, 15]. Во-вторых, человеческие анти-

тела более стабильны по сравнению с вирусной РНК, и поэтому серологические образцы менее подвержены порче на преаналитическом этапе [12]. В-третьих, при использовании обычных 96-луночных микропланшетов и автоматических устройств иммуноферментного анализа возможности серологического тестирования значительно увеличиваются по сравнению с ПЦР-тестированием [10], а рост производительности в условиях пандемии крайне необходим при диагностике инфекции. Также, как было сказано ранее, с помощью серологических методов тестирования на COVID-19, при оценке кинетики выработки антител, можно определить тяжесть заболевания.

Таким образом, серология, являясь оперативным и относительно недорогим методом определения COVID-19, может играть важную роль в борьбе с пандемией SARS-CoV-2, например при оценке распространенности инфекции или в исследованиях иммунного ответа как у отдельных пациентов, так и у целых когорт [15].

Цель исследования – изучить динамику изменения количества серопозитивных пациентов по антителам против SARS-CoV-2 в течение двух с половиной лет развития пандемии COVID-19.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 6051 человек. Среди них было 2840 женщин и 3211 мужчин. Средний возраст составил $41,68 \pm 0,17$ (M \pm SEM). Все участники исследования на момент проведения анализа являлись жителями Челябинской области. Сбор данных осуществлялся в период с 01.06.2020 по 18.01.2022. Серопозитивность оценивалась с помощью тестирования на антитела IgG, IgM и IgA против SARS-CoV-2 методом «непрямого» двухэтапного иммуноферментного анализа (ИФА). На все три иммуноглобулина выполнили анализ 133 человека, тест на IgM и IgG выполнили 3561 человек, только на определение IgG – 2124 человека и только на определение IgM – 233 человека. На определение антител IgA и IgM или только IgA тестирование не выполнялось.

Для ИФА периферическая кровь участников исследования была взята путем венопункции. Сбор крови осуществлялся в пробирки, содержащие кремнезем и полимерный гель для отделения сыворотки. Центрифугирование биоматериала проводилось при 1500g в течение 20 мин. Полученную сыворотку крови использовали для выявления антител в день взятия образца. Иммуноферментный анализ выполнялся с помощью реагентов D-5501 SARS-Cov-2-IgG-ИФА-BEST, D-5502 SARS-Cov-2-IgM-ИФА-BEST и D-5503 SARS-Cov-2-IgA-ИФА-BEST (АО «Вектор-Бест»,

г. Новосибирск, Россия). Для проведения анализа было необходимо 10 мкл сыворотки. Тестирование проводилось в соответствии с инструкциями производителя.

На первом этапе анализа специфические антитела, содержащиеся в исследуемых образцах, связывались с иммобилизованным на поверхности лунок планшета рекомбинантным антигеном SARS-CoV-2 – рецептор-связывающим доменом (RBD) гликопротеина S (шипovidный белок SARS-CoV-2). На втором этапе конъюгат моноклональных антител к иммуноглобулину человека с пероксидазой хрена взаимодействовал с комплексами антиген-IgG/IgM/IgA. При инкубации с раствором тетраметилбензидина в течение 25 минут растворы в лунках содержали образовавшиеся комплексы антиген-IgG/IgM/IgA-конъюгат. Остановка реакции осуществлялась добавлением стоп-раствора (NH₂SO₄). Поглощение при 450 нм, с эталонным значением 620 нм, измеряли в считывающем устройстве для планшетов ELISA. Интенсивность окрашивания была пропорциональна концентрации антител к SARS-CoV-2 в анализируемом образце. Продолжительность анализа составляла около 2 часов.

Для оценки результатов проведенного ИФА был произведен расчет коэффициента позитивности (КП). КП отображает, во сколько раз концентрация антител превышает пороговое значение. Расчет КП осуществляется с помощью следующей формулы:

$$\text{КП} = \frac{\text{Оптическая плотность образца}}{\text{Оптическая плотность критическая}}$$

Результат анализа считался положительным, если КП был больше либо равен 1,1, и отрицательным, если КП был меньше 0,8. Если значение КП было между 0,8 и 1,1 результат считался сомнительным [15].

Обработка и анализ данных осуществлялись с помощью R 3.1.1 12 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия) и Microsoft Excel версии 14.0 [1]. Так как распределение в количественных данных было ненормальным (p-value теста Шапиро–Уилка < 0,05), то использованные статистические критерии были непараметрическими.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования за весь период было получено 27 (20,45%) отрицательных, 99 (75%) положительных и 6 (4,55%) сомнительных результатов ИФА на IgA к SARS-CoV-2; 2433 (42,35%) отрицательных, 3245 (56,48%) положительных и 67 (1,17%) сомнительных результатов ИФА на IgG, и 2710 (70,41%) отрицательных, 996 (25,88%)

положительных и 143 (3,72%) сомнительных результатов ИФА на IgM. В целом наибольшая доля положительных результатов была выявлена у иммуноглобулинов класса А.

Получившееся распределение плотности положительных результатов всех исследуемых антител и заболеваемости в Челябинской области за период пандемии представлено на рисунке 1. Дополнительно на графике двумя вертикальными пунктирными линиями были добавлены даты обнаружения в России вариантов коронавируса, имеющих наиболее сильное влияние на распространенность COVID-19 в нашей стране – «Дельта» (Панго-линия B.1.617.2, дата обнаружения в РФ – начало апреля 2021 года) и «Омикрон» (Панго-линия B.1.1.529, дата обнаружения в Челябинской области – 17.01.2022); и серой точечной линией была добавлена дата начала вакцинации в России (15.10.2020). Визуально отмечается мультимодальность у всех представленных распределений, с разным количеством пиков. Для нахождения соответствующих пиков был использован пакет R "multimode" [1].

Первый пик заболеваемости определяется 21 июня 2020 года с плотностью 0,0006. Последующие пики серопозитивности IgG были 17 ноября 2020 года (плотность = 0,0019), а IgM – 3 ноября 2020 года (плотность = 0,0051). Так как анализы на IgA проводились нами только с 7 июля 2021 года, частота положительных результатов на этот тип антител против SARS-CoV-2 не отражает первую «волну» заболеваемости COVID-19.

Второй пик заболеваемости в Челябинской области определяется 22 декабря 2020 года с плотностью 0,001. Последующий пик серопозитивности IgG зафиксирован 2 июля 2021 года (плотность = 0,0061), IgM – 8 июля 2021 года (плотность = 0,0028), IgA – 15 августа 2021 года (плотность = 0,0107).

После третьего пика заболеваемости, зафиксированного 20 августа 2021 года (плотность = 0,0012), резкие повышения серопозитивности были определены 24 октября 2021 года для IgG (плотность = 0,003), 28 октября 2021 года для IgM (плотность = 0,0038) и 27 октября 2021 года для IgA (плотность = 0,0076).

Четвертый пик заболеваемости зафиксирован 30 ноября 2021 года (плотность = 0,002). После него резкого повышения серопозитивности ни в одном из типов антител не было обнаружено.

Самый высокий пик заболеваемости 14 февраля 2022 года, плотность которого составила 0,0144, не попал в наш временной интервал исследования серопревалентности.

Таким образом, время определения пиков серопозитивности IgG составляло от 65 до 192 дней, IgM от 122 до 196 дней и IgA от 68 до 236 дней

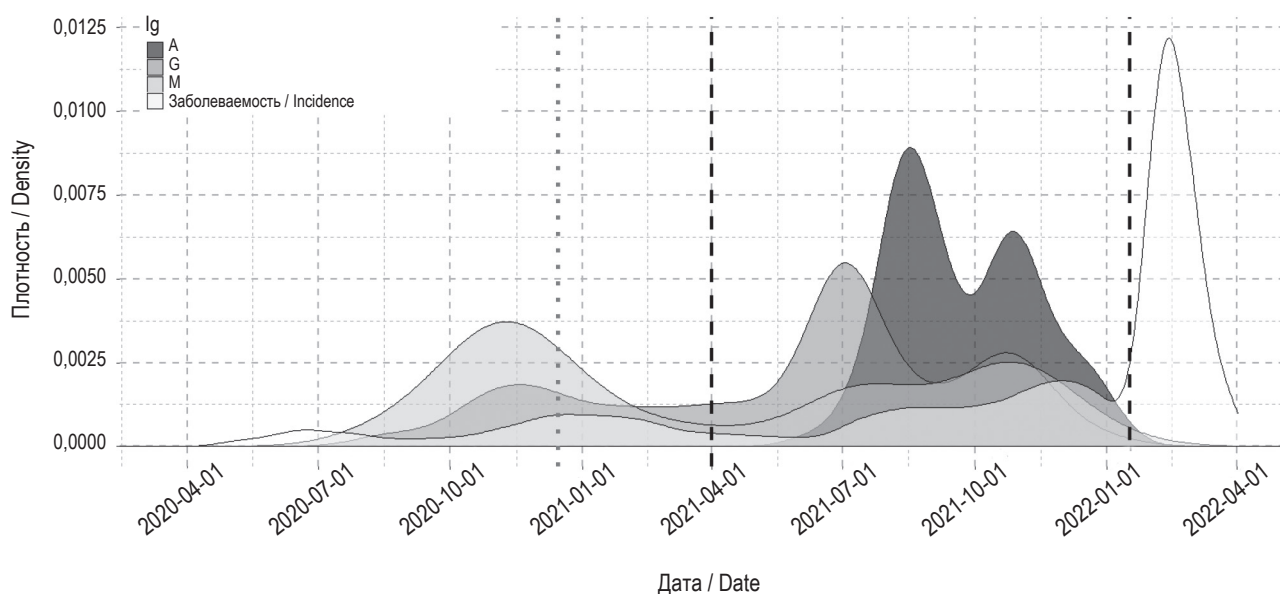


Рисунок 1. Распределение плотности серопозитивных на SARS-CoV-2 результатов ИФА, сделанных в ходе настоящего исследования, и заболеваемости, зарегистрированной в Челябинской области

Figure 1. Distribution of the density of SARS-CoV-2 seropositive ELISA results obtained during this study and the incidence registered in the Chelyabinsk

после ориентировочных пиков заболеваемости в Челябинской области. Так как эти временные промежутки намного выше указанных в научной литературе сроков сероконверсии, рассматривать полученную нами серопревалентность как коллективный иммунный ответ на условные волны ПЦР-положительных пациентов, указанных на официальном интернет-ресурсе по противодействию распространению коронавирусной инфекции в Челябинской области, вероятнее всего, не стоит. Тест Спирмена на поиск корреляции по недельной и помесячной частоте заболеваемости COVID-19 с серопозитивностью каждого из антител на SARS-CoV-2 также не имел статистической значимости. Но при этом и ПЦР-тесты, и полученные нами результаты ИФА отображают сильное повышение плотности распределения после появления в России варианта коронавируса, квалифицируемого ВОЗ, как вызывающего беспокойства – «Дельта». Дополнительно стоит отметить, что пики серопревалентности определяются несколько раньше пиков высокой плотности ПЦР-положительных результатов. Можно предположить, что либо наше ИФА-тестирование отражает распространенность среди бессимптомных пациентов, либо характеризует не только распределение антител против SARS-CoV-2 у зараженных пациентов, но и учитывает иммуноглобулины, синтезированные в результате вакцинации.

Связь между возрастом и результатом ИФА была изучена с помощью рангового теста Спирме-

на на корреляцию. Была обнаружена статистически значимая положительная взаимосвязь между возрастом и значением КП для IgM (коэффициент корреляции = 0,1, p -value < 0,001) и IgG (коэффициент корреляции = 0,16, p -value < 0,001). Для IgA корреляция не имела статистической значимости (коэффициент корреляции = 0,14, p -value = 0,12). Сравнение возраста между группами людей с положительным, отрицательным и сомнительным результатом ИФА была проведена тестом Краскела–Уоллиса с множественными сравнениями тестом Вилкоксона и поправкой Бонферрони.

Для IgM против SARS-CoV-2 различия были статистически значимы для теста Краскела–Уоллиса ($N = 39,44$; $df = 2$; p -value < 0,001) и всех множественных сравнений (p -value поправленный < 0,05) кроме сравнения между группой «Положительные» и группой «Сомнительные» (p -value поправленный = 0,4). При этом средние значения возраста составили ($M \pm SEM$, в годах): отрицательный ИФА – $40,03 \pm 0,25$, положительный ИФА – $42,38 \pm 0,41$, сомнительный ИФА – $44,2 \pm 1,08$.

Для IgG против SARS-CoV-2 результат теста Краскела–Уоллиса имел статистическую значимость ($N = 82,35$; $df = 2$; p -value < 0,001). Множественные сравнения при этом показали значимые различия только между группой с положительным и отрицательным результатом (p -value поправленный < 0,001). Средние значения возраста составили $40,1 \pm 0,25$ для отрицательного ИФА,

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИФА НА АНТИТЕЛА К SARS-CoV-2 ПО ПОЛУ УЧАСТНИКОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. DISTRIBUTION OF ELISA RESULTS FOR ANTIBODIES TO SARS-CoV-2 BY GENDER OF STUDY PARTICIPANTS

Результат ИФА ELISA result	Пол Gender	IgA		IgG		IgM	
		Количество Number	Процент внутри группы Percent within the group	Количество Number	Процент внутри группы Percent within the group	Количество Number	Процент внутри группы Percent within the group
Отрицательный Negative	Мужской Male	14	24,56%	1428	46,65%	1606	72,77%
	Женский Female	13	17,33%	1005	37,44%	1104	67,24%
Положительный Positive	Мужской Male	41	71,93%	1592	52,01%	531	24,06%
	Женский Female	58	77,33%	1653	61,59%	465	28,32%
Сомнительный Doubtful	Мужской Male	2	3,51%	41	1,34%	70	3,17%
	Женский Female	4	5,33%	26	0,97%	73	4,45%

42,88±0,24 для положительного ИФА, 41,63±1,59 для сомнительного ИФА.

Для IgA против SARS-CoV-2 тест Краскела–Уоллиса не определил наличия статистически значимых различий между группами (H = 4,13; df = 2; p-value = 0,13).

Положительная взаимосвязь между возрастом и серопревалентностью IgM и IgG, которая может быть объяснена большей концентрацией провоспалительных цитокинов у пожилых людей, так же отмечается и в других исследованиях [6].

Распределение результатов ИФА в зависимости от пола участников исследования представлено в таблице 1.

Как видно из представленных в таблице 1 данных, процент сероположительных женщин для всех типов антител превышает процент серопозитивных мужчин, что согласуется с результатами других исследований [2, 6, 15]. Все различия в соотношениях были проверены Хи-квадратом Пирсона. В результате статистических расчетов значимы были различия в распределении ИФА по полу на IgM (Хи-квадрат = 14,81; df = 2; p-value < 0,001) и IgG (Хи-квадрат = 53,54; df = 2; p-value < 0,001). Различия в соотношениях IgA между мужчинами и женщинами не имели статистическую значимость (Хи-квадрат = 1,19; df = 2; p-value = 0,55).

Между участниками исследования мужского и женского пола мы сравнили КП изучаемых антител тестом Вилкоксона. Для IgM (W = 1956365, p-value < 0,001) и для IgG (W = 4704211, p-value < 0,001) различия в КП между мужчинами и женщинами были статистически значимы. При этом средние значения КП (M±SEM) для IgM составили 1,66±0,08 у мужчин и 1,69±0,09 у женщин. Для IgG – 6,54±0,18 и 8,91±0,17 у мужчин и женщин соответственно.

Для IgA различия между мужчинами и женщинами в КП статистической значимости не имели (W = 2064,5; p-value = 0,74), а средние значения составили 5,09±0,82 у мужчин и 4,56±0,68 у женщин.

Проведенное исследование отобразило картину изменения распространенности антител IgA, IgM и IgG в популяции Челябинской области в период пандемии SARS-CoV-2.

Необходимо отметить, что выявленное распределение положительных результатов имело мультимодальный, «волновой» характер, с несколькими пиками за весь изучаемый временной промежуток. Пики в распределении антител, имеющие самую высокую плотность серопозитивных анализов, определялись спустя некоторое время после появления Дельта-варианта коронавируса. Дельта-вариант SARS-CoV-2

классифицируется ВОЗ, как вариант, вызывающий беспокойство – те генетические мутации, что присутствует в этом варианте патогена, привели к резким изменениям в количестве заболевших и умерших от COVID-19, как в России, так и во всем мире [3]. При сравнении дат предполагаемых пиков серопревалентности, с датой, характеризующей повышенную плотность распределения ПЦР-положительных результатов тестирования в Челябинской области, после начала распространения Дельта-варианта SARS-CoV-2, было обнаружено более раннее начало нарастания ИФА-положительных пациентов, что может характеризовать передачу инфекции среди зараженных людей, не имеющих симптомы COVID-19. При рассмотрении других «волн» с повышенной плотностью распределения ИФА и ПЦР анализов, пики серопозитивных результатов, возникающие после пиков заболеваемости, оцениваемые методом ПЦР, имеют достаточно большие временные дистанции, из-за чего рассматривать повышение антител после зарегистрированной «золотым стандартом» высокой частоты встречаемости COVID-19, как результат сероконверсии, не стоит. Возможно, пики серопревалентности, полученные в результате тестирования отражали иммунный ответ пациентов на проведенную вакцинацию. Также в ходе нашего исследования мы установили положительную взаимосвязь серопозитивности с возрастом и женским полом для IgM и IgG против SARS-

CoV-2, что согласуется с результатами наших исследований и данными литературы, согласно которым у женщин в среднем отмечается более выраженный иммунный ответ как в ответ на инфекцию, так и на вакцинацию [2, 15].

В заключение хочется отметить, что серологические методы исследования и регулярный мониторинг антител против SARS-CoV-2 могут играть важную роль в оценке распространенности пандемии коронавируса и иммунного ответа на инфекцию внутри популяции, поэтому периодический скрининг соответствующих иммуноглобулинов может быть полезен.

Выводы

1. Распределение положительных результатов серологической диагностики SARS-CoV-2 в Челябинской области в период 2020-2022 годы имело мультимодальный, «волновой» характер, с несколькими пиками, что, по-видимому, определялось сменой превалирующих штаммов вируса и темпами вакцинации жителей региона.

2. Сероположительные результаты (IgM и IgG) достоверно чаще определялись среди женщин, чем среди мужчин, а также у лиц старшей возрастной группы.

3. Результаты мониторинга антител против SARS-CoV-2 могут иметь практическое применение для оценки динамики распространения инфекции и эффективности политики вакцинации.

Список литературы / References

1. Ameijeiras-Alonso J., Crujeiras R.M., Rodriguez-Casal A. Multimode: an r package for mode assessment. *J. Stat. Soft.*, 2021, Vol. 97, no. 9, pp. 1-32.
2. Bunders M.J., Altfeld M. Implications of sex differences in immunity for SARS-CoV-2 pathogenesis and design of therapeutic interventions. *Immunity*, 2020, Vol. 53, pp. 487-495.
3. Gusev E., Sarapultsev A., Solomatina L., Chereshnev V. SARS-CoV-2-Specific immune response and the pathogenesis of COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 3, 1716. doi: 10.3390/ijms23031716.
4. Li R., Pei S., Chen B., Song Y., Zhang T., Yang W., Shaman J. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science*, 2020, Vol. 368, no. 6490, pp. 489-493.
5. Lippi G., Simundic A.M., Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2020, Vol. 58, no. 7, pp. 1070-1076.
6. Luo C., Liu M., Li Q., Zheng X., Ai W., Gong F., Fan J., Liu S., Wang X., Luo J. Dynamic changes and prevalence of SARS-CoV-2 IgG/IgM antibodies: Analysis of multiple factors. *Int. J. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 108, pp. 57-62.
7. Lynch K.L., Whitman J.D., Lacanienta N.P., Beckerdite E.W., Kastner S.A., Shy B.R., Goldgof G.M., Levine A.G., Bapat S.P., Stramer S.L., Esensten J.H., Hightower A.W., Bern C., Wu A.H.B. Magnitude and kinetics of anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody responses and their relationship to disease severity. *Clin. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 72, no. 2, pp. 301-308.
8. Tali S.H.S., LeBlanc J.J., Sadiq Z., Oyewunmi O.D., Camargo C., Nikpour B., Armanfard N., Sagan S.M., Jahanshahi-Anbuhi S. Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2021, Vol. 34, no. 3, e00228-20. doi: 10.1128/CMR.00228-20.
9. Vandenberg O., Martiny D., Rochas O., van Belkum A., Kozlakidis Z. Considerations for diagnostic COVID-19 tests. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2021, Vol. 19, no. 3, pp. 171-183.

10. Xiao S.Y., Wu Y., Liu H. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. *J. Med. Virol.*, 2020, Vol. 92, no. 5, pp. 464-467.
11. Xu J., Wu R., Huang H., Zheng W., Ren X., Wu N., Ji B., Lv Y., Liu Y., Mi R. Computed tomographic imaging of 3 patients with coronavirus disease 2019 pneumonia with negative virus real-time reverse-transcription polymerase chain reaction test. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 71, no. 15, pp. 850-852.
12. Younes N., Al-Sadeq D.W., Al-Jighefee H., Younes S., Al-Jamal O., Daas H.I., Yassine H.M., Nasrallah G.K. Challenges in laboratory diagnosis of the novel coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses*, 2020, Vol. 12, no. 6, 582. doi: 10.3390/v12060582.
13. Yu H.Q., Sun B.Q., Fang Z.F., Zhao J.C., Liu X.Y., Li Y.M., Sun X.Z., Liang H.F., Zhong B., Huang Z.F., Zheng P.Y., Tian L.F., Qu H.Q., Liu D.C., Wang E.Y., Xiao X.J., Li S.Y., Ye F., Guan L., Hu D.S., Hakonarson H., Liu Z.G., Zhong N.S. Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients. *Eur. Respir. J.*, 2020, Vol. 56, no. 2, 2001526. doi: 10.1183/13993003.01526-2020.
14. Zhao J., Yuan Q., Wang H., Liu W., Liao X., Su Y., Wang X., Yuan J., Li T., Li J., Qian S., Hong C., Wang F., Liu Y., Wang Z., He Q., Li Z., He B., Zhang T., Fu Y., Ge S., Liu L., Zhang J., Xia N., Zhang Z. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 71, no. 16, pp. 2027-2034.
15. Zurochka A., Dobrinina M., Zurochka V., Hu D., Solovyev A., Ryabova L., Kritsky I., Ibragimov R., Sarapultsev A. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies in symptomatic individuals is higher than in persons who are at increased risk exposure: the results of the single-center, prospective, cross-sectional study. *Vaccines (Basel)*, 2021, Vol. 9, no. 6, 627. doi: 10.3390/vaccines9060627.

Авторы:

Крицкий И.С. — аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Зурочка В.А. — д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург; старший научный сотрудник НИЛ иммунобиотехнологии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Ху Дэшэн — профессор кафедры интегрированной традиционной китайской и западной медицины, госпиталь Юнион, медицинский колледж Тунцзи, Хуачжунский университет науки и технологий, Ухань, Китай

Сарapultsev А.П. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург; директор НОЦ «Российско-Китайский центр системной патологии» ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Authors:

Kritsky I.S., Postgraduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Zurochka V.A., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg; Senior Research Associate, Laboratory of Immune Biotechnology, Russian-Chinese Educational Center at the South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Hu Desheng, Professor, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

Sarapultsev A.P., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg; Director, Russian-Chinese Center for Systemic Pathology, South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 15.05.2022
Отправлена на доработку 29.05.2022
Принята к печати 15.06.2022

Received 15.05.2022
Revision received 29.05.2022
Accepted 15.06.2022

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА КК1 НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ У ПАССИВНО КУРИВШИХ БЕРЕМЕННЫХ КРЫС И ИХ ПОТОМСТВА

Кузьмичева Н.А., Михайлова И.В., Пушкарева Л.А., Филиппова Ю.В., Бондаренко А.И., Синеговец А.А., Смолягин А.И.

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет», г. Оренбург, Россия

Резюме. В настоящее время активно ведутся экспериментальные исследования по изучению влияния низкомолекулярных медиаторов полипептидной природы на иммунную систему с целью направленного конструирования новых иммуномодулирующих лекарственных средств. В то же время остается недостаточно изученным вопрос о специфическом влиянии отдельных групп пептидов на иммунную систему экспериментальных животных и их потомства, что делает актуальным исследование в данном аспекте. В работе была проведена оценка влияния пептида – гомолога фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈ (лабораторный шифр КК1) на иммунологические показатели беременных крыс и их потомства на модели воздействия пассивного табакокурения.

Исследованы иммунологические показатели у 96 беременных крыс Вистар массой 200–300 г, подвергшихся пассивному табакокурению и получавших синтетический пептид КК1, являющийся структурным аналогом последовательности фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈ (Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide), а также у их потомства на 14-й день от рождения (76 крысят). Опытные крысы подвергались фумигации табачным дымом по 8 часов ежедневно с 1-го по 20-й день беременности. Синтетический пептид КК1 беременным крысам вводили в виде водного раствора в дозе 40 мкг/кг, через день, один раз в сутки на протяжении 10 дней, начиная со второй недели беременности.

У всех животных определялись масса тела, тимуса и селезенки, количество лейкоцитов, тимоцитов, спленоцитов, миелокариоцитов, циркулирующих иммунных комплексов определяли в соответствии с лабораторными методами исследования экспериментальных животных. Статистическая обработка проводилась с помощью непараметрических методов. Группы сравнивали с помощью U-критерия Манна–Уитни с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows v. 9.0, StatSoft Inc. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Введение пептида КК1 как контрольным, так и опытным беременным крысам сопровождалось разнонаправленными изменениями количества клеток в лимфоидных органах. В основе положительной тенденции сдвигов иммунологических параметров при воздействии пептида КК1 лежит возможное снижение последствий токсического действия табачного дыма за счет противовоспалительного эффекта данного препарата, а также его способности к ограничению развития свободно-радикальных реакций. Показано, что изучаемый пептид способствует положительной динамике ряда иммунологических параметров у экспериментальных животных, подвергнутых пассивному курению.

Адрес для переписки:

Кузьмичева Наталья Александровна
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный
медицинский университет»
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Советская, 6.
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, Sovetskaya str., 6.
Phone: 7 (987) 847-52-55.
E-mail: natalie-vip@list.ru

Образец цитирования:

Н.А. Кузьмичева, И.В. Михайлова, Л.А. Пушкарева, Ю.В. Филиппова, А.И. Бондаренко, А.А. Синеговец, А.И. Смолягин «Влияние пептида КК1 на иммунологические параметры у пассивно куривших беременных крыс и их потомства» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 227-234. doi: 10.46235/1028-7221-1122-EOT

© Кузьмичева Н.А. и соавт., 2022

For citation:

N.A. Kuzmicheva, I.V. Mikhailova, L.A. Pushkareva, Yu.V. Filippova, A.I. Bondarenko, A.A. Sinegovets, A.I. Smolyagin "Effect of the KK1 peptide on immunological parameters in passively smoking pregnant rats and their offspring", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 227-234. doi: 10.46235/1028-7221-1122-EOT

DOI: 10.46235/1028-7221-1122-EOT

Целесообразным является дальнейшее изучение механизмов иммуотропного действия пептидогомологов фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈.

Ключевые слова: беременные крысы, пассивное курение, иммунологические показатели, синтетический пептид KK1

EFFECT OF THE KK1 PEPTIDE ON IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN PASSIVELY SMOKING PREGNANT RATS AND THEIR OFFSPRING

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

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Abstract. Currently, experimental studies are actively conducted to assess the effects of low-molecular-weight polypeptide mediators on the immune system, in order to design new immunomodulatory drugs. However, the specific effects of individual peptides on the immune system of experimental animals and their offspring remains insufficiently studied, thus requiring relevant research in this aspect. Our study evaluated the effect of the peptide homologue of the of adrenocorticotrophic hormone fragment (15-18) (laboratory code, KK1) on immunological parameters of pregnant rats and their offspring using experimental models of passive maternal smoking exposure.

The immunological parameters were studied in 96 pregnant Wistar rats weighing 200-300 g, exposed to passive tobacco smoking and receiving a synthetic peptide KK1, which is a structural analogue of the ACTH₁₅₋₁₈ sequence fragment (Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide), as well as probable effect on their offspring tested on the 14th day after birth (76 rats). Experimental rats were fumigated with tobacco smoke for 8 hours daily from the 1st to the 20th day of pregnancy. Synthetic peptide KK1 was administered to pregnant rats in the form of an aqueous solution at a dose of 40 mcg / kg / day five times a day for 10 days. Weights of whole body, thymus and spleen were determined in all animals, the number of leukocytes, thymocytes, splenocytes, myelocaryocytes, circulating immune complexes were assessed in accordance with common protocols for experimental laboratory animals. The data were analyzed by Mann–Whitney U test. The significance level was set at $p < 0.05$.

Administration of the KK1 peptide to both control and experimental pregnant rats was accompanied by multidirectional changes in the number of cells in lymphoid organs. The positive trend of shifts in immunological parameters when exposed to the peptide KK1 seems to be based on the possible reduction of the consequences of the toxic effect of tobacco smoke due to the anti-inflammatory effect of this drug, as well as its ability to limit the development of free radical reactions. It is shown that the studied peptide contributes to the positive dynamics of multiple immunological parameters in experimental animals subjected to passive smoking. Further studies are required to assess the mechanisms of immunotropic action of the ACTH₁₅₋₁₈ peptide homologue.

Keywords: rats, pregnancy, second-hand smoke, immunological parameters, synthetic peptide KK1

Введение

Среди биорегуляторов иммунной системы представляют интерес низкомолекулярные медиаторы полипептидной природы – пептидные гомологи первичной аминокислотной последовательности АКТГ₁₅₋₁₈, которые используются для модуляции активности иммунной системы с целью лечения целого ряда патологических состояний и заболеваний. Продемонстрированные в ряде работ их антигипоксические, антиишемические [10, 11], церебропротекторные, нейро-

протекторные свойства [2, 3] и антиоксидантный эффект [5, 6] характеризуют данные пептидные соединения, как перспективные стресспротекторные средства. Вместе с тем исследования практически не коснулись оценки иммуотропных свойств данных пептидов на моделях воздействия ксенобиотиков. Одним из широко распространенных воздействий ксенобиотиков на организм является пассивное табакокурение [4, 9, 13, 14]. В связи с этим особый интерес может представлять не только воздействие пептида, являющегося структурным аналогом последо-

вательности фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈ на животных, но и модель, на которой можно изучить влияние данного пептида на иммунологические показатели беременных крыс, подвергнутых пассивному табакокурению и их потомства, что и составило цель данной работы.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования были выполнены на 96 половозрелых крысах Вистар массой 200-300 г и на 76 крысятах в возрасте 14 дней от рождения. Животных содержали на стандартном пищевом рационе без ограничения доступа к воде. Пептидный гомолог фрагмента АКТГ₁₅₋₁₈ (лабораторный шифр КК1) синтезирован в ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России и любезно предоставлен членом-корреспондентом РАН, профессором А.С. Симбирцевым. Все животные были разделены на 12 групп. 1-я группа – 24 контрольных самки, 2-я – 13 куривших крыс, 3-я – 10 крыс, получавших пептид КК1, 4-я – 8 куривших крыс, получавших пептид КК1. 5-8-ю группы составили самки на 20-й день беременности: 5-я – 14 беременных самок, 6-я – 7 беременных самок, 7-я – 13 беременных куривших самок, 8-я – 7 беременных куривших крыс, получавших пептид КК1. В 9-ю, 11-ю группы вошли крысята от некуривших самок, в 10-ю, 12-ю группы – крысята от самок, подвергавшихся пассивному табакокурению. 11-ю, 12-ю группы составили крысята от самок, получавших пептид КК1 во время беременности. Крысят выводили из эксперимента на 14-й день от рождения. Животным контрольных (1-я, 2-я, 5-я, 7-я) групп вводили интраназально физиологический раствор в равных объемах с остальными группами. Животным 3-й, 4-й, 6-й, 8-й групп вводили тетрапептид КК1 интраназально в виде водного раствора в дозе 40 мкг/кг, через день, 1 раз в сутки на протяжении 10 дней. Беременным самкам физиологический раствор или пептиды КК1 вводили 5 раз начиная со второй недели беременности. Отсчет сроков беременности самок 5-8-й групп вели с момента обнаружения сперматозоидов в вагинальных мазках. Опытные крысы 5-й, 6-й, 7-й, 8-й группы подвергались фумигации табачным дымом по 8 часов с 1-го по 20-й день беременности. Контрольные крысы в аналогичный период помещались в камеру, вентилируемую атмосферным воздухом без табачного дыма. Животные содержались в стандартных условиях, при двенадцатичасовом световом режиме и свободном доступе к воде и корму. Эвтаназию осуществляли дислокацией шейных позвонков под эфирным наркозом. Массу крыс, тимуса и селезенки, количество лейкоцитов, тимоцитов, спленоцитов, миелокариоцитов, циркулирующих иммунных комплексов

(ЦИК) определяли 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 N267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики».

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 помощью U-критерия Манна–Уитни с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows v. 9.0, StatSoft Inc. (США). Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Сравнение иммунологических показателей проводилось по отношению к параметрам контрольных животных (1-я группа).

Как видно из данных таблицы 1, пассивное курение крыс (2-я гр.) приводило к негативному эффекту, выражающемуся в снижении массы животных, тимуса и селезенки, а также количества тимоцитов, спленоцитов и миелокариоцитов. Введение пептида КК1 некурившим крысам (3-я гр.) по сравнению с контрольными самками (1-я гр.) способствовало увеличению массы тимуса и селезенки. Аналогичное введение КК1 курившим крысам (4-я гр.) снижало отрицательный эффект пассивного курения, выражающийся в увеличении массы животных, тимуса и количества спленоцитов по отношению к параметрам курящих крыс (3-я гр.).

У беременных крыс 5-й, 6-й, 7-й, 8-й групп на 20-й день беременности увеличена масса животных и селезенки, а также уровень ЦИК по сравнению с данными показателями у контрольных крыс (1-я гр.). Напротив, количество тимоцитов у беременных крыс всех групп, по сравнению с величиной данного показателя у животных 1-й контрольной группы, было снижено, с наименьшим содержанием данных клеток в тимусе пассивно куривших крыс 7-й группы. Введение некурившим (6-я гр.) беременным крысам пептида КК1 приводило к увеличению числа лейкоцитов, спленоцитов и ЦИК, а также массы селезенки по сравнению с показателями 1-й группы. По сравнению с крысами 1-й группы введение пептида КК1 курившим беременным крысам (8-я гр.) также обладало иммуномодулирующим эффектом, который выражался в увеличении числа лейкоцитов и ЦИК, массы крысы и селезенки, и,

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ У ОБСЛЕДОВАННЫХ КРЫС ВИСТАР, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN THE EXAMINED WISTAR RATS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	1-я группа Group 1 n = 24	2-я группа Group 2 n = 13	3-я группа Group 3 n = 10	4-я группа Group 4 n = 8	5-я группа Group 5 n = 14	6-я группа Group 6 n = 7	7-я группа Group 7 n = 13	8-я группа Group 8 n = 7
Масса крыс, г Rat weight, g	200 (191-205)	160* (157-165)	197 (190,5-203,7)	177* (173-185)	340* (295-350)	300* (295-320)	300* (300-309)	305* (305-318)
Лейкоциты, $\times 10^9$ White blood cells, $\times 10^9$	5,0 (4,0-8,0)	5,8 (5,0-6,3)	6,5 (6,0-7,2)	4,5 (4,0-6,0)	7,5 (6,3-11,2)	10,8* (7,40-11,69)	6,9 (5,7-7,3)	9,3* (9,3-10,3)
Масса тимуса, мг Thymus weight, mg	231 (212-305)	123* (120-147)	352* (343-364)	180* (156-191)	235 (198-293)	248 (225-368)	236 (216-250)	255 (217-296)
Число тимоцитов, $\times 10^6$/орган Number of thymocyte, $\times 10^6$ /organ	448 (385-540)	208* (161-218)	508 (365-677)	225* (178-318)	300* (240-465)	403 (392-424)	236* (214-244)	321* (306-338)
Масса селезенки, мг Spleen weight, mg	497 (364-539)	317* (305-328)	560* (531-718)	346* (321-377)	515* (477-720)	590* (582-634)	561* (543-572)	617* (617-629)
Число кариоцитов, $\times 10^6$/орган Number of karyocytes, $\times 10^6$ /organ	546 (401-636)	251* (209-284)	428 (363-530)	389 (321-487)	580 (483-708)	695* (684-747)	540 (435-583)	595 (533-681)
Число миелокариоцитов, $\times 10^6$/орган Number of myelocaryocytes, $\times 10^6$ /organ	81 (61-105)	58* (39-70)	74 (52-90)	57* (53-65)	60* (44-72)	57 (52-74)	65 (62-725)	48* (41-50)
Циркулирующие иммунные комплексы, у. е. Circulating immune complex, c. u.	65 (53-69)	76 (66-99)	79 (74-97)	88 (70-96)	114* (106-123)	101* (91-109)	120* (77-128)	117* (108-125)

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. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРЫСЯТ, РОДИВШИХСЯ ОТ КОНТРОЛЬНЫХ И ПАССИВНО КУРИВШИХ КРЫС ВИСТАР, ПОЛУЧАВШИХ ПЕПТИД КК1, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF BABY RATS BORN FROM CONTROL AND PASSIVELY SMOKING WISTAR RATS TREATED WITH PEPTIDE KK1, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	9-я группа Group 9 n = 20	10-я группа Group 11 n = 25	11-я группа Group 11 n = 18	12-я группа Group 12 n = 13
Масса крыс, г Rat weight, g	20 (19-21)	21 (20-21)	25* (23-27)	29* (25-35)
Лейкоциты, × 10 ⁹ White blood cells, × 10 ⁹	5,4 (4,5-6,4)	5,2 (4,6-6,2)	3,8 (3,6-5,1)	5,9 (4,7-7,3)
Масса тимуса, мг Thymus weight, mg	75 (67-91)	65 (59-71)	103* (101-120)	109* (107-125)
Число тимоцитов, × 10 ⁶ /орган Number of thymocyte, × 10 ⁶ /organ	116 (96-148)	115 (107-127)	170 (149-219)	140 (112-150)
Масса селезенки, мг Spleen weight, mg	74 (68-82)	72 (68-75)	89* (69-84)	98* (87-116)
Число кариоцитов, × 10 ⁶ /орган Number of karyocytes, × 10 ⁶ /organ	128 (91-153)	111 (100-128)	92* (76-102)	95 (75-120)
Число миелокариоцитов, × 10 ⁶ /орган Number of myelocaryocytes, × 10 ⁶ /organ	14 (12-18)	17 (15-18)	14 (11-20)	26* (17-33)

Примечание. * – статистически значимые различия (p < 0,05) с показателями 9-й контрольной группы; n – число животных в группе.

Note. *, significant differences (p < 0.05) with the control group 9; n – population number.

напротив, снижало число тимоцитов, миелокариоцитов. У беременных куривших крыс (8-я гр.) при введении пептида КК1 отмечается значимое снижение выраженности миграции тимоцитов из тимуса при увеличении массы селезенки по сравнению с аналогичными показателями у беременных куривших крыс (7-я гр.), не получавших пептид КК1, что говорит об ослаблении негативного изменения данного параметра. Вместе с тем важно отметить, что все изучаемые показатели куривших и некуривших беременных крыс, получавших пептид КК1, значимо не отличались от соответствующих показателей некуривших беременных крыс (5-я гр.).

В таблице 2 представлены иммунологические показатели родившихся крысят от куривших и некуривших самок, получавших пептид КК1. Как видно из данных таблицы, у крысят, родившихся от куривших крыс (10-я гр.), наблюдается тенденция к снижению массы тимуса и числа спленоцитов на 13% по сравнению с контрольными животными 9-й группы. Введение пептида КК1

контрольным крысам увеличивало массу крысят, тимуса, селезенки и, напротив, снижало количество спленоцитов у крысят 11-й группы. Важно отметить положительный эффект от введения КК1 беременным курившим крысам, который выражался в увеличении массы крысенок, тимуса, селезенки, а также числа миелокариоцитов у крысят 12-й группы.

Обсуждая полученные результаты, важно отметить, что эндогенная интоксикация самок крыс, вызываемая пассивным курением, обладает отрицательным воздействием на показатели иммунной системы и способствовала развитию индуцированного варианта вторичного иммунодефицитного состояния. Менее выраженный защитный эффект КК1 у беременных крыс связан, вероятнее всего, со сложной перестройкой иммунной системы при беременности [12].

У крысят, родившихся от куривших самок, также отмечается тенденция к снижению массы тимуса и количества спленоцитов. Известно, что при действии токсикантов табачного дыма в

наибольшей степени страдает лимфоидная линия клеток, так как их полигидроокисленные метаболиты аккумулируются в костном мозге и лимфоидных органах, вызывая гипоплазию центральных и периферических органов иммунитета [7, 8]. Видимый признак такого явления – это уменьшение клеточности в органах кроветворения и лимфоидных органах (селезенка, тимус), что установлено в настоящей работе. Введение пептида КК1 как контрольным, так и опытным беременным крысам сопровождалось разнонаправленными изменениями количества клеток в лимфоидных органах. В основе положительной тенденции сдвигов иммунологических параметров при воздействии пептида КК1 лежит

возможное снижение последствий токсического действия табачного дыма за счет противовоспалительного эффекта [10, 11] данного препарата, а также его способностью к ограничению развития свободно-радикальных реакций.

Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии положительной тенденции сдвигов иммунологических параметров при воздействии пептида КК1 на беременных крыс и их потомство. Целесообразным является дальнейшее изучение механизмов иммуотропного действия пептидов-гомологов фрагмента АКГГ₁₅₋₁₈.

Список литературы / References

1. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: Изд-во ЧГПУ, 2000. 167 с. [Volchegorsky I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L. Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions of the body]. Chelyabinsk: Chelyabinsk State Pedagogical University, 2000. 167 p.
2. Дейко Р.Д., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А., Ходаковский А.А., Черешнюк И.Л. Влияние потенциального нейропротектора Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (КК-1) на нейродеструкцию и нейроапоптоз у крыс при остром нарушении мозгового кровообращения // Вестник фармации, 2016. № 1 (71). С. 96-102. [Deiko R.D., Shtrygol S.Yu., Kolobov A.A., Khodakovskiy O.A., Chereshniuk I.L. The influence of new neuroprotector acetyl-(d-lys)-lys-arg-arg-amide (KK-1) on neurodestruction and neuroapoptosis of rats in conditions of acute stroke. *Vestnik farmatsii = Bulletin of Pharmacy*, 2016, no. 1, pp. 96-102. (In Russ.)]
3. Дейко Р.Д., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А., Симбирцев А.С. Церебропротекторные свойства и протеолитическая устойчивость пептидов, гомологичных первичной последовательности участка АКГГ₁₅₋₁₈ (экспериментальное исследование) // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 2. С. 65-69. [Deiko R.D., Shtrygol S.Yu., Kolobov A.A., Simbirtsev A.S. Cerebroprotective properties of the original peptides homologous to ACTH₁₅₋₁₈ primary sequence (experimental study). *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 2, pp. 65-69. (In Russ.)]
4. Колесникова Л.И., Гребенкина Л.А., Даренская М.А., Власов Б.Я. Окислительный стресс как неспецифическое патогенетическое звено репродуктивных нарушений (обзор) // Бюллетень СО РАМН, Т. 32, № 1. С. 58-66. [Kolesnikova L.I., Grebenkina L.A., Darenskaya M.A., Vlasov B.Ya. Oxidative stress as a nonspecific pathogenetic link reproductive disorders. *Byulleten SO RAMN = Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, Vol. 32, no. 1, pp. 58-66. (In Russ.)]
5. Кудина О.В., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А. Влияние олигопептидов – гомологов фрагмента АКГГ₁₅₋₁₈ на показатели углеводного обмена в условиях острого холодового стресса // Вестник фармации, 2019. № 1 (83). С. 64-70. [Kudina O.V., Shtrygol S.Yu., Kolobov A.A. Influence of oligopeptides – homologues of the ACTH fragment [15-18] on the parameters of carbohydrate metabolism under conditions of acute cold stress. *Vestnik farmatsii = Bulletin of Pharmacy*, 2019, no. 1 (83), pp. 64-70. (In Russ.)]
6. Кудина О.В., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А., Ларьяновская Ю.Б. Влияние олигопептидов – гомологов фрагмента актг₁₅₋₁₈ на состояние печени и надпочечников крыс на модели острого иммобилизационного стресса // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, 2017. Т. 15, № 4. С. 30-37. [Kudina O.V., Shtrygol S.Yu., Kolobov A.A., Laryanovskaya Yu.B. The influence of oligopeptides – the homologues of ACTH₁₅₋₁₈ on the liver and adrenal glands in the rats on the model of acute immobilization stress. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii = Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2017, Vol. 15, no. 4, pp. 30-37. (In Russ.)]
7. Курляндский В.А. Филлов В.А. Общая токсикология. М.: Медицина, 2002. 608 с. [Kurlyandsky V.A., Filov V.A., General toxicology]. Moscow: Medicine, 2002. 608 p.
8. Куценко С.А. Основы токсикологии. СПб.: Фолиант, 2004. 720 с. [Kutsenko S.A. Fundamentals of toxicology]. St. Petersburg: Foliant, 2004. 720 p.
9. 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. *Message2. Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 22, no. 2-1, pp. 411-413. (In Russ.)]

10. Толкач П.Г., Башарин В.А., Гребенюк А.Н., Колобов А.А. Оценка эффективности пептида КК1 для профилактики отдаленных нарушений функций центральной нервной системы после тяжелой интоксикации оксидом углерода в эксперименте // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, 2015. Т.13, № 3. С. 29-34. [Tolkach P.G., Basharin V.A., Grebenyuk A.N., Kolobov A.A. Experimental assessment of the KK1 peptide effectiveness for prevention of the CNS delayed impairments after acute intoxication with carbon monoxide. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii = Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2015, Vol. 13, no. 3, pp. 29-34. (In Russ.)]

11. Толкач П.Г., Башарин В.А., Соловьева Т.С., Слуцкая Д.Р. Сравнительная эффективность нейропептидов КК1 и семакса для терапии поражений центральной нервной системы после тяжелого отравления оксидом углерода // Вестник Российской военно-медицинской академии, 2016. № 2 (54). С. 131-137. [Tolkach P.G., Basharin V.A., Solovieva T.S., Slutskaaya D.R. Comparative efficacy of neuropeptides KK1 and Semax for the treatment of lesions of the central nervous system after severe carbon monoxide poisoning. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii = Vestnik Rossijskoy Voенno-Medicinskoy Akademii*, 2016, no. 2 (54), pp. 131-137. (In Russ.)]

12. Шмагель К.В., Черешнев В.А. Иммуитет беременной женщины. М.: Медицинская книга, 2003. 226 с. [Shmagel K.V., Chereshevnev V.A. Immunity of a pregnant woman]. Moscow: Medical Book, 2003. 226 p.

13. Burke A., FitzGerald G.A. Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 2003, Vol. 46, no. 1, pp. 79-90.

14. 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», г. Оренбург, Россия

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

Пушкарева Л.А. — аспирант кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет», 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

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

Филиппова Ю.В. — к.м.н., доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет», г. Оренбург, Россия

Бондаренко А.И. — ассистент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет», г. Оренбург, Россия

Синеговец А.А. — ассистент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет», 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», г. Оренбург, Россия

Filippova Yu.V., PhD (Medicine), 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

Sinegovets A.A., Assistant Professor, 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 14.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 14.05.2022
Accepted 29.05.2022

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. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Российский иммунологический журнал» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии.

Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.

2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.

3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:

1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):

- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).

- Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).

- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.

- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.

- Полное название статьи, направляемой в редакцию.

- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.

- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.

- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);

- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);

- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (В случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное

учреждение. Для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);

- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);

- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках (на русском и английском языках);

- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).

6) Файл в формате .doc, .docx, .tiff, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, в начале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) — редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

4. Текст набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям, описанным в Правилах для авторов, расположенных на странице «О Журнале».

6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать из раздела Рецензирование, на странице «О Журнале».

Авторские права

Авторы, публикующие в данном журнале, соглашаются со следующим:

1. Авторы сохраняют за собой авторские права на работу и предоставляют журналу право первой публикации работы на условиях лицензии Creative Commons Attribution License, которая позволяет другим распространять данную работу с обязательным сохранением ссылок на авторов оригинальной работы и оригинальную публикацию в этом журнале.

2. Авторы сохраняют право заключать отдельные контрактные договоренности, касающиеся неэксклюзивного распространения версии работы в опубликованном здесь виде (например, размещение ее в институтском хранилище, публикацию в книге), со ссылкой на ее оригинальную публикацию в этом журнале.

3. Авторы имеют право размещать их работу в сети Интернет (например, в институтском хранилище или персональном сайте) до и во время процесса рассмотрения ее данным журналом, так как это может привести к продуктивному обсуждению и большему количеству ссылок на данную работу (См. The Effect of Open Access).

Приватность

Имена и адреса электронной почты, введенные на сайте этого журнала, будут использованы исключительно для целей, обозначенных этим журналом, и не будут использованы для каких-либо других целей или предоставлены другим лицам и организациям.

Вы можете оформить подписку на журнал «Российский иммунологический журнал» через отделения связи:

Каталог «Пресса России» — индекс 15590.

Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Бекпергенова А.В..... 125	Журавлева Ю.А. 173	Костоломова Е.Г..... 213	Сарапульцев А.П..... 219
Бердюгина О.В..... 117	Задорожный А.М. 131	Крицкий И.С. 219	Сахаров Р.А. 213
Бондаренко А.И. 227	Здвижкова И.А. 125	Кузьмичева Н.А..... 227	Сизиков А.Э. 147
Бондаренко Т.А. 125	Зотова Н.В. 173	Ленгина М.А..... 201	Синеговец А.А..... 227
Боргоякова М.Б. 131	Зурочка А.В..... 161	Ло Ш..... 161	Смолягин А.И. 227
Борисов С.Д..... 187	Зурочка В.А..... 219	Маркова Е.В. 155	Соломатина Л.В. 173
Бурмистрова А.Л. 139	Иванова Е.В..... 125	Меледина И.В. 167	Старостина Е.В. 131
Вавилов М.Н. 139	Изюрова Н.В. 181	Михайлова И.В. 227	Сулова Т.А. 139
Волосникова Е.А..... 131	Ильичев А.А. 131	Никифоров И.А. 125	Тимохина Т.Х. 213
Вольский Н.Н. 147	Каримов И.Ф. 187	Никиткина К.В. 181	Узунова А.Н. 181
Гаврилова Е.Д. 147	Карпенко Л.И..... 131	Носырева С.Ю. 187	Ушакова А.А. 187
Гойман Е.В..... 147	Ковалев М.А. 195	Орлова Л.А..... 131	Филиппова Ю.В..... 227
Гольдин Б.Г. 155	Козлов В.А. 147	Паньков А.С. 187	Ху Д..... 219
Гольдина И.А. 155	Комарова А.В. 213	Панькова А.А..... 187	Чайникова И.Н. 125
Гусев Е.Ю. 117	Комелькова М.В. 161	Перунова Н.Б. 213	Челпаченко О.Е. 125
Давыдова Е.В. 195	Коркмазов А.М. 201	Полянских Е.Д. 213	Черных Е.Р..... 167
Демченко Е.Н..... 147	Коркмазов М.Ю..... 201	Пушкарева Л.А..... 227	Чумасова О.А..... 147
Добрынина М.А. 161	Корнеев А.Г..... 187	Рябенко Ю.И..... 201	Шевела Е.Я..... 167
Дубинец И.Д..... 201	Корнова Н.В. 201	Савочкина А.Ю..... 181	Шмагель К.В. 207
Желтова О.И..... 167	Королевская Л.Б. 207	Сайдакова Е.В. 207	

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

авидность..... 188	мезенхимальные стромальные клетки 167	системная воспалительная реакция 173
аносмия 118	миелопероксидаза 148	системное воспаление..... 173
антитела..... 188, 219	митохондрии 207	средний отит..... 201
аскорбиновая кислота..... 118	моноклеарные клетки 214	субпопуляция лимфоцитов..... 214
беременные крысы..... 228	моноклеарные клетки крови... 155	умифеновира гидрохлорида моногидрат 118
вакцина..... 188	нейтрализующая активность 188	упаковка ДНК-вакцин 132
внебольничная пневмония 181	нейтрофильные лейкоциты 148	фибробласты 195
внеклеточная ДНК..... 148	нетоз..... 148	фотохромотерапия 201
врожденный иммунитет..... 181	низкочастотная ультразвуковая кавитация 201	хемокины..... 195
гаплотипы..... 139	общий анализ крови..... 161	цинк 118
гуморальный ответ 188	оптическое излучение 201	цирроз печени 167
дети 181	пассивное курение 228	цитокины..... 125, 155, 181, 201
дисбиоз 125	популяционная иммуногенетика. 139	экспрессия..... 155
ДНК-вакцина..... 132	постковидные пациенты..... 161	экссудативные поражения пространства Рейнке..... 195
иммунитет 219	пробиотики..... 214	эндогенный ретровирус 155
иммунная система..... 161	проточная цитометрия..... 207	<i>Bifidobacterium bifidum</i> 214
иммунный ответ 132	регенерация 201	CD4 ⁺ T-лимфоциты 207
иммунологические показатели... 228	Региональный регистр доноров костного мозга..... 139	COVID-19 118, 188, 219
иммунопатогенез..... 155	рекуррентное депрессивное расстройство..... 155	ELISpot 132
иммунорегуляция..... 214	риамиловир 118	HLA 139
иммуоферментный анализ 219	риносеptoпластика 201	ICS 132
интерфероны III типа 181	русская популяция 139	IFN α -2b человеческий рекомбинантный..... 118
кишечные микросимбионты 125	С-реактивный белок 173	IFN λ 181
колекальциферол 118	серопозитивность..... 219	IL-6 173
копрофилтраты..... 125	синтетический пептид KK1 228	MICA..... 139
коронавирусная инфекция 188		NK-клетки 161
корреляционная связь..... 125		SARS-CoV-2 132, 188, 219
кортизол..... 161		SARS-CoV-2 инфекция..... 161
липоаспират 167		

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
ПРЕССА РОССИИ – 15590**

ISSN 1028-7221



9 771234 567898