

2022

Официальный журнал
Российского Научного Общества Иммунологов

**РОССИЙСКИЙ
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ**



**RUSSIAN JOURNAL
OF IMMUNOLOGY**

Official Journal
of Russian Society of Immunology

Volume 25
Number 3

2022

РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИММУНОЛОГОВ
(РНОИ)

РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

июль-сентябрь

2022, том 25

№. 3

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, инфекционной иммунологии 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.)

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. 14.5. 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.

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 стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, заведующая лабораторией патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний, Москва, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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. 14.5. 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.

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

RUSSIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY
(RSI)

**RUSSIAN
JOURNAL OF IMMUNOLOGY**

**ROSSIYSKIY
IMMUNOLOGICHESKIY
ZHURNAL**

July-September

2022, volume 25

No. 3

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. Khaïdukov – 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 №80, 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 14.5. 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

Лазарев С.С., Бочкова М.С., Тиманова В.П., Раев М.Б. ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ГИБРИДОМЫ ВАР3	245
Магамедов И.Д., Пивоварова Л.П., Нохрин С.П., Сорока В.В., Арискина О.Б., Осипова И.В., Раджабов И.М., Фомин К.Н., Поцхор-оглы С.Л., Количенко Л.В., Маркелова Е.В., Гончарова О.В. ФАКТОРЫ ВОСПАЛЕНИЯ, АДГЕЗИВНОСТИ И ТРОМБОЗА ПРИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ И ТЕРАПИИ ДЕКСАМЕТАЗОНОМ	251
Осиков М.В., Кайгородцева Н.В., Бойко М.С., Федосов А.А. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ОЗОНА И 5-АМИНОСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ НА ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА	259
Плехова Н.Г., Ситдикова Т.А., Дубий А.А., Михайлов А.О., Просекова Е.В. ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К SARS-CoV-2 ПРИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ COVID-19 И ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКЕ Гам-КОВИД-Вак	267
Просекова Е.В., Долгополов М.С., Турянская А.И., Сабыныч В.А. СОПРЯЖЕННОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ И СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ	275
Радыгина Т.В., Купцова Д.Г., Петричук С.В., Семикина Е.Л., Фисенко А.П. ЭКСПРЕССИЯ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗ CD39 И CD73 В ПОПУЛЯЦИЯХ CD4 ⁺ ЛИМФОЦИТОВ У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ.....	283
Савочкина А.Ю., Полторак А.Е., Никушкина К.В., Зотова М.А. АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ СЕПСИСЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДА	291
Савчук К.С., Симбирцев А.С. ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА, НЕ ИНФИЦИРОВАННЫХ SARS-CoV-2	295
Садек А., Храмцова Ю.С., Юшков Б.Г. ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ КАК БИОМАРКЕРЫ “INFLAMM-AGEING”	299
Сарычева Ю.А., Токарева А.А., Шехтман А.Г., Панфилова Т.В., Пименова Ю.С., Митрофанов Р.А., Фролов Б.А. ОГРАНИЧЕНИЕ МУТАГЕНЕЗА МИЕЛОКАРИОЦИТОВ ПРИ ОСТРОМ ВНЕШНЕМ ОБЛУЧЕНИИ КАК МЕХАНИЗМ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ МИЛИАЦИНА ПРИ РАДИАЦИОННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ.....	305
Сафронова Э.А., Рябова Л.В. ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИОННОГО И СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СПЕКТРА ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ	313
Старостина Е.В., Шарабрин С.В., Рудометов А.П., Литвинова В.Р., Боргоякова М.Б., <u>Бажан С.И.</u> , Ильичев А.А., Карпенко Л.И. ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ДНК- И мРНК-ВАКЦИНЫ, КОДИРУЮЩИЕ ИСКУССТВЕННЫЕ ИММУНОГЕНЫ ВИРУСА ГРИППА	321
Сташкевич Д.С., Беляева С.В., Евдокимов А.В. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ 2 И 6 В АССОЦИИ С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К НЕСПЕЦИФИЧЕСКОМУ ЯЗВЕННОМУ КОЛИТУ И СИНДРОМУ РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА У РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ	327
Сынчикова А.П., Корнева Е.А. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛПС-СТИМУЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК МИКРОГЛИИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ОРЕКСИНА А.....	333
Фомина Л.О., Гриценко В.А., Файзуллина А.И. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ НЕЙТРОФИЛОВ ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ ИХ С СУТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ S. AUREUS, ИМЕЮЩИХ И НЕ ИМЕЮЩИХ ГЕН spa.....	339
Шилов Ю.И., Шилов С.Ю., Барков С.Ю., Шилова Н.А. ВЛИЯНИЕ МИФЕПРИСТОНА ПРИ ОСТРОМ СТРЕССЕ НА АПОПТОЗ ТИМОЦИТОВ МЫШЕЙ.....	345
Правила для авторов	351
Авторский указатель	354
Предметный указатель.....	354

CONTENTS

Short communications

<i>Lazarev S.S., Bochkova M.S., Timganova V.P., Rayev M.B.</i> EFFECT OF GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON VIABILITY OF BAP3 HYBRIDOMA CELLS	245
<i>Magamedov I.D., Pivovarova L.P., Nokhrin S.P., Soroka V.V., Ariskina O.B., Osipova I.V., Radzhabov I.M., Fomin K.N., Potshkor-ogly S.L., Kolichenko L.V., Markelova E.V., Goncharova O.V.</i> FACTORS OF INFLAMMATORY, ADHESIVENESS AND THROMBOSIS IN ACUTE LOWER LIMB ISCHEMIA AND DEXAMETHASONE THERAPY	251
<i>Osikov M.V., Kaigorodtseva N.V., Boyko M.S., Fedosov A.A.</i> COMPARATIVE EFFECT OF OZONE EXPOSURE AND 5-AMINOSALICYLIC ACID IN OXAZOLON-INDUCED COLITIS UPON THE INDICES OF INNATE IMMUNITY	259
<i>Plekhoval N.G., Sitdikova T.A., Dubiy A.A., Mikhailov A.O., Prosekova E.V.</i> EVALUATION OF SPECIFIC T CELL IMMUNE RESPONSE TO SARS-CoV-2 IN COVID-19 INFECTION AND FOLLOWING Gam-COVID-Vac VACCINE PROPHYLAXIS	267
<i>Prosekova E.V., Dolgopolov M.S., Turyanskaya A.I., Sabynych V.A.</i> ASSOCIATION OF GENE POLYMORPHISM AND CYTOKINE CONTENT IN THE BLOOD SERUM IN CHILDREN WITH ALLERGIC BRONCHIAL ASTHMA	275
<i>Radygina T.V., Kuptsova D.G., Petrichuk S.V., Semikina E.L., Fisenko A.P.</i> EXPRESSION OF CD39 AND CD73 ECTONUCLEOTIDASES IN CD4⁺ LYMPHOCYTE POPULATIONS IN HEALTHY CHILDREN	283
<i>Savochkina A.Yu., Poltorak A.E., Nikushkina K.V., Zotova M.A.</i> RELATIONSHIPS BETWEEN THE INDICES OF INNATE IMMUNITY IN SEPSIS DEPEND ON CLINICAL OUTCOMES	291
<i>Savchuk K.S., Simbirtsev A.S.</i> CYTOKINE SYSTEM IN THE PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS NON-INFECTED WITH SARS-CoV-2	295
<i>Sadek A., Khramtsova Yu.S., Yushkov B.G.</i> MAST CELLS AS BIOMARKERS OF INFLAMM-AGEING	299
<i>Sarycheva Yu.A., Tokareva A.A., Shekhtman A.G., Panfilova T.V., Pimenova Yu.S., Mitrofanov R.A., Frolov B.A.</i> LIMITED MUTAGENESIS OF MYELOKARYOCYTES FOLLOWING ACUTE EXTERNAL IRRADIATION AS A PROTECTIVE MECHANISM OF MILIACIN IN RADIATIONINDUCED IMMUNOSUPPRESSION	305
<i>Safronova E.A., Ryabova L.V.</i> ASSESSMENT OF LYMPHOCYTE POPULATIONS AND THEIR SUBSETS IN THE PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME	313
<i>Starostina E.V., Sharabrin S.V., Rudometov A.P., Litvinova V.R., Borgoyakova M.B., [Bazhan S.I.], Ilyichev A.A., Karpenko L.I.</i> IMMUNE RESPONSE AGAINST DNA- AND mRNA VACCINES ENCODING ARTIFICIAL INFLUENZA VIRUS IMMUNOGENS	321
<i>Stashkevich D.S., Belyaeva S.V., Evdokimov A.V.</i> COMPARATIVE ASSESSMENT OF GENETIC POLYMORPHISM OF TOLL-LIKE 2 AND 6 RECEPTORS PREDISPOSING FOR NON-SPECIFIC ULCERATIVE COLITIS AND IRRITABLE BOWEL SYNDROME IN RUSSIANS FROM CHELYABINSK REGION	327
<i>Synchikova A.P., Korneva E.A.</i> MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF LPS-STIMULATED MICROGLIAL CELLS UNDER THE ACTION OF OREXIN A	333
<i>Fomina L.O., Gritsenko V.A., Fayzullina A.I.</i> COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF CYTOKINE CONTENT IN NEUTROPHIL SUPERNATANTS AFTER INCUBATION WITH DAILY CULTURES OF <i>S. AUREUS</i> WITH OR WITHOUT <i>spa</i> GENE	339
<i>Shilov Yu.I., Shilov S.Yu., Barkov S.Yu., Shilova N.A.</i> EFFECT OF MIFEPRISTONE UNDER ACUTE STRESS ON THYMOCYTE APOPTOSIS IN MICE	345
Instructions to Authors	351
Author index	354
Subject index	354

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ГИБРИДОМЫ ВАРЗ

Лазарев С.С.^{1,2}, Бочкова М.С.^{1,2}, Тимганова В.П.², Раев М.Б.^{1,2}

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

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

Резюме. Оксид графена (ОГ) является перспективным материалом для применения в медицине и биотехнологии. Тем не менее не так много известно о его влиянии на организм. Еще меньше данных доступно о влиянии ОГ на клеточные линии, применяемые в биотехнологическом производстве.

Целью нашего исследования стало изучение процессов взаимодействия наночастиц ОГ с клетками гибридомы ВАРЗ, производящей IgG, специфичные к трофобластическому бета-1-гликопротеину человека, в условиях *in vitro*. Рассматривали влияние наночастиц ОГ на жизнеспособность клеток, одновременно оценивая их интернализацию. В работе использовали наночастицы ОГ разных размеров с поверхностью, функционализированной линейным или разветвленным ПЭГ (ОГ-ПЭГ). Количество покрывающего ПЭГ составило ~20% (по массе). В исследовании применяли две рабочих концентрации наночастиц ОГ: 5 мкг/мл и 25 мкг/мл. Клетки культивировали в 48-луночном планшете в бессывороточной среде DCCM-1 в присутствии наночастиц ОГ. Культивирование проводили в течение суток при 37 °С и 5% CO₂. Жизнеспособность оценивали на проточном цитометре с помощью окрашивания клеток красителем Zombie Aqua (ZA). Интернализацию (адгезию) частиц фиксировали на проточном цитометре по флуоресценции ОГ в пробах ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ нм}$). Одновременно визуализировали взаимодействие клеток с наночастицами ОГ в системе EVOS M5000, представляющей собой инвертированный флуоресцентный микроскоп.

При изучении влияния наночастиц ОГ на клетки гибридомы ВАРЗ было показано, что частицы оказывали цитотоксический эффект в высокой концентрации (25 мкг/мл). Наибольший цитотоксический эффект наблюдался у частиц, покрытых линейным ПЭГ. При оценке интернализации (адгезии) частиц клетками гибридомы ВАРЗ обнаружено, что в концентрации 5 мкг/мл степень интернализации (адгезии) частиц была значительно ниже, чем при концентрации 25 мкг/мл. Интернализация (адгезия) частиц малого размера осуществлялась клетками более активно, чем крупных частиц. Их цитотоксический эффект также был выше, чем у крупных частиц. В целом цитотоксичность наночастиц ОГ уменьшается с увеличением их размера, учитывая тот факт, что средний эффективный диаметр частиц, покрытых разветвленным ПЭГ, выше, чем у аналогичных, покрытых линейным ПЭГ. Таким образом, полученные данные позволяют связать оказываемый наночастицами ОГ цитотоксический эффект с их интернализацией (адгезией) клетками. В целом впервые изучены некоторые аспекты взаимодействия наночастиц ОГ с клетками гибридомы.

Ключевые слова: оксид графена, модификация поверхности наночастиц, пегилированные наночастицы оксида графена, жизнеспособность, поглощение, гибридома ВАРЗ

Адрес для переписки:

Лазарев Сергей Станиславович
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (919) 712-70-30.
E-mail: lasest@vk.com

Address for correspondence:

Lazarev Sergey S.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.
Phone: 7 (919) 712-70-30.
E-mail: lasest@vk.com

Образец цитирования:

С.С. Лазарев, М.С. Бочкова, В.П. Тимганова,
М.Б. Раев «Влияние наночастиц оксида графена
на жизнеспособность клеток гибридомы ВАРЗ»
// Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 3. С. 245–250. doi: 10.46235/1028-7221-1148-EOG
© Лазарев С.С. и соавт., 2022

For citation:

S.S. Lazarev, M.S. Bochkova, V.P. Timganova, M.B. Rayev
“Effect of graphene oxide nanoparticles on viability of VAP3
hybridoma cells”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 245–250.
doi: 10.46235/1028-7221-1148-EOG
DOI: 10.46235/1028-7221-1148-EOG

EFFECT OF GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON VIABILITY OF BAP3 HYBRIDOMA CELLS

Lazarev S.S.^{a, b}, Bochkova M.S.^{a, b}, Timganova V.P.^b, Rayev M.B.^{a, b}

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

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

Abstract. Graphene oxide (GO) is a promising material, which is likely to find applications in the fields of medicine and biotechnology. However, the current knowledge of its influence on human organism is limited. Even less information is available on the effects of GO on the cell lines widely used in biotechnology. The aim of this work is to describe the interaction between GO nanoparticles and BAP3 hybridoma cells which produce anti-human-PSG1 IgG, *in vitro*. We studied the effect of GO nanoparticles on cell viability and the intensity of internalization (adhesion) of nanoparticles by the cells. We used GO nanoparticles of different size, with surface being functionalized by linear or branched PEG (GO-PEG). The PEG coating level was 20% (by mass). The following nanoparticle concentrations were used: 5 µg/mL and 25 µg/mL. The BAP3 cells were cultured in a 48-well cell culture plates in serum-free DCCM-1 media in the presence of GO nanoparticles. The cells were cultured for 24 hours at 37 °C and 5% CO₂. Cell viability was assessed by a flow cytometer utilizing Zombie Aqua (ZA) staining. Internalization (adhesion) of nanoparticles was monitored using a flow cytometer by GO fluorescence in the samples (λ_{ex} = 488 nm). Moreover, interactions between hybridoma cells and GO nanoparticles were visualized by EVOS M5000 visualization system, which included an inverted fluorescent microscope.

We demonstrated that GO nanoparticles possess a cytotoxic effect when applied at high concentration (25 µg/mL). The highest cytotoxic effect is caused by GO nanoparticles coated with linear PEG. The degree of nanoparticle internalization (adhesion) was shown to be significantly lower when the particles were present at lower (5 µg/mL) concentration. Internalization (adhesion) of nanoparticles of smaller size was more abundant. Furthermore, these nanoparticles were shown to have a stronger cytotoxic effect compared to larger particles. In general, cytotoxicity of GO nanoparticles decreases with increasing size, which is especially evident if the fact that the mean effective diameter of the nanoparticles coated with branched PEG is considered larger than their linear PEG-coated counterparts. The data obtained allow us to draw a correlation between the cytotoxic effect of GO nanoparticles and the level of their internalization (adhesion) by the cells. In general, this work concerns some novel aspects of interaction between GO nanoparticles and hybridoma cells.

Keywords: graphene oxide, nanoparticle surface modification, PEG-coated graphene oxide nanoparticles, cell viability, internalization, BAP3 hybridoma

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-15-00244-П.

Введение

Благодаря своим уникальным свойствам графен все чаще находит применение в биомедицине. В частности, оксид графена (ОГ) в настоящее время исследуется для применения в таких сферах биомедицины, как доставка лекарств и медицинская визуализация [5]. Применение материалов на основе графена в медицине требует тщательной оценки их биосовместимости и детального понимания их взаимодействия с клетками. Как известно, различные поверхностные модифика-

ции ОГ могут снижать цитотоксические эффекты в отношении клеток [2]. Кроме того, одним из самых распространенных материалов для функционализации ОГ является полиэтиленгликоль (ПЭГ) [6]. В нашей работе мы использовали частицы ОГ, модифицированного разветвленным и неразветвленным ПЭГ.

Данное исследование является частью большого проекта по изучению биосовместимости наночастиц ОГ с клетками иммунной системы [https://grant.rscf.ru/prjcard_int?19-15-00244]. Гибридомы используются для продукции моноклональных антител определенной специфичности. Гибридома BAP3 (Genovac, Германия) была получена из плазматических клеток селезенки мыши

и продуцирует IgG к трофобластическому бета-1-гликопротеину человека. Известно, что клетки гибридомы быстро пролиферируют и обладают характеристиками, сходными с плазматическими клетками мыши [4]. Таким образом, они представляют собой адекватную модель для изучения влияния различных веществ на плазматические клетки.

Целью нашего исследования стало изучение процессов взаимодействия наночастиц ОГ с клетками гибридомы ВАРЗ в условиях *in vitro*. В работе применяли наночастицы разного размера, функционализованные линейным или разветвленным ПЭГ, изучая как жизнеспособность клеток, так и поглощение частиц этими клетками.

Материалы и методы

Функционализация наночастиц ОГ

В работе использовались наночастицы ОГ размерами 100-200 нм (ОГм) и 1-5 мкм (ОГб) (Ossila Ltd, Великобритания), которые покрывались линейным (П) и разветвленным (рП) полиэтиленгликолем (ПЭГ). Процедуры модификации и характеристика наночастиц описаны нами ранее [3]. Таким образом, в работе применялись следующие частицы: П-ОГм ($\varnothing 184 \pm 73$ нм), рП-ОГм ($\varnothing 287 \pm 52$ нм), П-ОГб ($\varnothing 569 \pm 14$ нм), рП-ОГб ($\varnothing 1376 \pm 48$ нм).

Подготовка культуры клеток гибридомы ВАРЗ

Для исследования *in vitro* использовали клетки гибридомы ВАРЗ (Genovac, Германия), производящей IgG, специфичные к трофобластическому бета-1-гликопротеину человека. Клетки гибридомы ВАРЗ хранили в криохранилище при температуре жидкого азота (количество клеток в каждой пробирке – $3-5 \times 10^6$) в среде заморозки (эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) (ВИ, Израиль) + 10% диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma, США)). Клетки были разморожены согласно протоколу производителя (Genovac, Германия). После размораживания клетки были перенесены в 48-луночный планшет (Corning, США) для культивирования в среде роста (среда DMEM с высоким содержанием глюкозы (ВИ, Израиль) + 12% (ЭТС) (ВИ, Израиль)) в течение 48 часов в CO₂-инкубаторе IG-150 Jouan (Франция) при концентрации CO₂ 5%. После этого клетки были перенесены в T75 культуральные фласки (Cellstar®, Германия) с бессывороточной средой DCCM-1 (ВИ, Израиль) с добавлением 3,3 мМ L-глутамин, 67 Ед/мл пенициллина, 0,07 мг/мл стрептомицина, 0,17 мкг/мл амфотерицина В, 1 мМ пирувата натрия (ВИ, Израиль).

Клетки культивировали во флашках в течение недели для формирования стабильной культуры

перед внесением наночастиц ОГ. Ежедневно проводили подсчет количества клеток, проверяли их жизнеспособность, при необходимости производили замену среды. Подсчет и проверку жизнеспособности клеток осуществляли в гемцитометре Нейбауэра, в тесте с трипановым синим (0,2%; Sigma, США).

Оценка взаимодействия клеток гибридомы с наночастицами ОГ

Для оценки влияния ОГ на жизнеспособность гибридомы ВАРЗ, клетки вносили в концентрации 2×10^5 кл/мл в 48-луночные планшеты (Corning, США). Далее в лунки добавляли наночастицы ОГ разных размеров, функционализованные линейным или разветвленным ПЭГ (П-ОГм, рП-ОГм, П-ОГб, рП-ОГб) до конечных концентраций 5 и 25 мкг/мл. Культуры инкубировали в течение суток при 37 °С и 5% CO₂ (для оценки влияния ОГ на жизнеспособность клеток гибридомы). Для каждого вида наночастиц ОГ делали три повторности культуры, контролем служила культура клеток без наночастиц ОГ.

После инкубации была произведена оценка жизнеспособности клеток с помощью суправитального красителя Zombie Aqua (ZA) на проточном цитометре (Cytotflex S, Beckman Coulter, США). Кроме того, оценивали количество клеток, интернализовавших (адгезировавших) наночастицы ОГ, по интенсивности флуоресценции клеток ($\lambda_{ex} = 488$ nm; bandpass filter: 720-840 nm; фильтр для красителя PC-7). Также нами была использована система визуализации (EVOS M5000, Thermo Fisher Scientific, США) для получения снимков каждого типа культур в лунках.

Обработку данных проточной цитометрии осуществляли в программе KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США), результаты выражали в виде процента живых (не окрашенных Zombie Aqua) клеток в гейте целевой популяции, и в виде процента клеток, флуоресцирующих в канале для красителя PC-7 (при оценке интернализации/адгезии) наночастиц.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью Graphpad Prism 8. Данные представлены в арифметических средних со стандартными отклонениями ($M \pm \sigma$), достоверность различий оценивали с использованием критерия ANOVA с тестом для множественных сравнений Сидака. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для частиц в высокой концентрации был вычислен коэффициент R² (Пирсона) для корреляции между размером частиц и долей жизнеспособных клеток.

Результаты и обсуждение

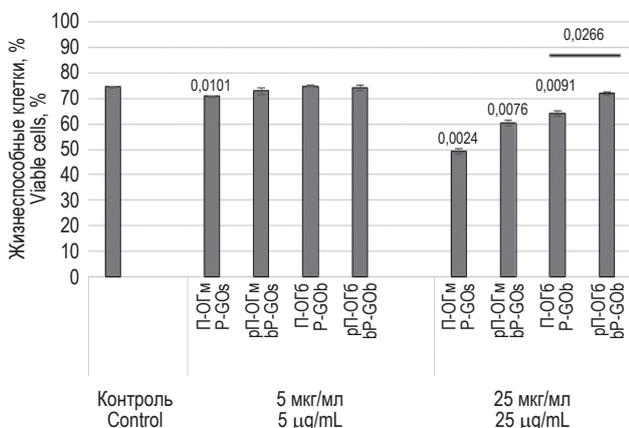
1. Обнаружено, что частицы П-ОГм в низкой и высокой концентрациях действовали цитотоксически на клетки гибридомы ВАРЗ, так как количество живых клеток в культурах статистически значимо снижалось (рис. 1А). Остальные частицы оказывали цитотоксический эффект только в высокой концентрации 25 мкг/мл. Интересно, что ОГ в высокой концентрации, функционализированный разветвленным ПЭГ (рП-ОГм и рП-ОГб), оказывал меньший цитотоксический эффект по сравнению с ОГ, покрытым линейным ПЭГ (рис. 1А).

Таким образом, наночастицы ОГ способны оказывать цитотоксический эффект на клетки гибридомы ВАРЗ в высокой концентрации (25 мкг/мл), независимо от размера и типа ПЭГ, которыми они покрыты. В то же время только частицы малого размера (П-ОГм) способны оказывать цитотоксический эффект в низкой концентрации (5 мкг/мл). Для частиц в высокой концентрации коэффициент R^2 для корреляции между размером частиц и долей жизнеспособных клеток в культуре равен 0,83 ($p < 0,05$). Цитоток-

сичность частиц уменьшается с увеличением их размера.

При оценке интернализации (адгезии) частиц клетками гибридомы ВАРЗ обнаружено, что в концентрации 5 мкг/мл частицы практически не интернализировались, однако концентрация наночастиц ОГ 25 мкг/мл способствовала их интенсивной интернализации (адгезии) клетками гибридомы, о чем говорит повышение процента флуоресцирующих клеток (рис. 1Б). Однако тип ПЭГ, использованный для покрытия частиц ОГ, не влиял на этот параметр. Известно, что опухолевые линии клеток, могут интернализировать наночастицы различными способами [1]. Статистически значимые различия в процентах флуоресцирующих клеток между культурами с ОГ с одинаковым покрытием, но разными размерами, говорит о том, что мелкие частицы клетками гибридомы адгезируются/интернализуются лучше, чем большие (рис. 1Б). Цитотоксический эффект наночастиц мы связываем с ER-стрессом, вызванный интернализацией наночастиц клетками гибридомы.

А (A)



Б (B)

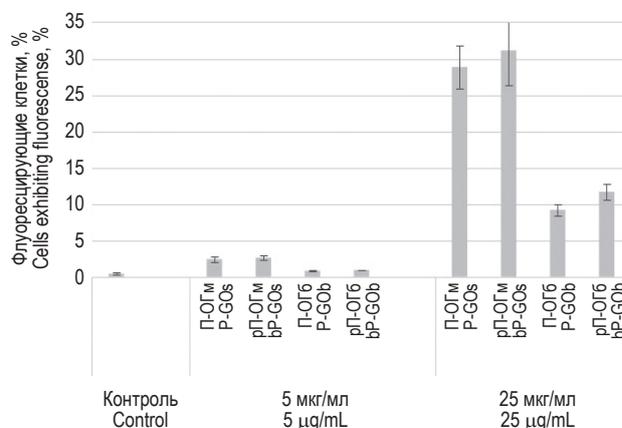


Рисунок 1. Взаимодействие наночастиц ОГ с клетками гибридомы

Примечание. А – процент жизнеспособных клеток в культурах гибридомы ВАРЗ с разными видами наночастиц ОГ в двух концентрациях. Для всех групп $n = 3$. Числами обозначены значения $p < 0,05$ по отношению к контролю без ОГ и по отношению к частицам ОГ, покрытым неразветвленным ПЭГ.

Б – Процент флуоресцирующих (интернализовавших/адгезирующих ОГ) клеток в суточных культурах клеток гибридомы ВАРЗ. Для всех групп $n = 3$. Числами обозначены значения $p < 0,05$ (ANOVA) показателей культур с большими наночастицами ОГ по отношению к культурам с малыми наночастицами ОГ с аналогичным покрытием (видом ПЭГ).

Figure 1. Interaction of GO nanoparticles and hybridoma cells

Note. (A) Percentage of viable BAP3 hybridoma cells in cultures with different types of GO nanoparticles added in two concentrations. For all groups $n = 3$. P-values < 0.05 as compared to the control group and to the GO nanoparticles functionalized with linear PEG are indicated by numbers.

(B) Percentage of cells exhibiting fluorescence in 24 h BAP3 hybridoma cell cultures. Note: for all groups $n = 3$. P-values indicate the difference (ANOVA) between samples with large nanoparticles and samples with small nanoparticles of the same PEG coating type.

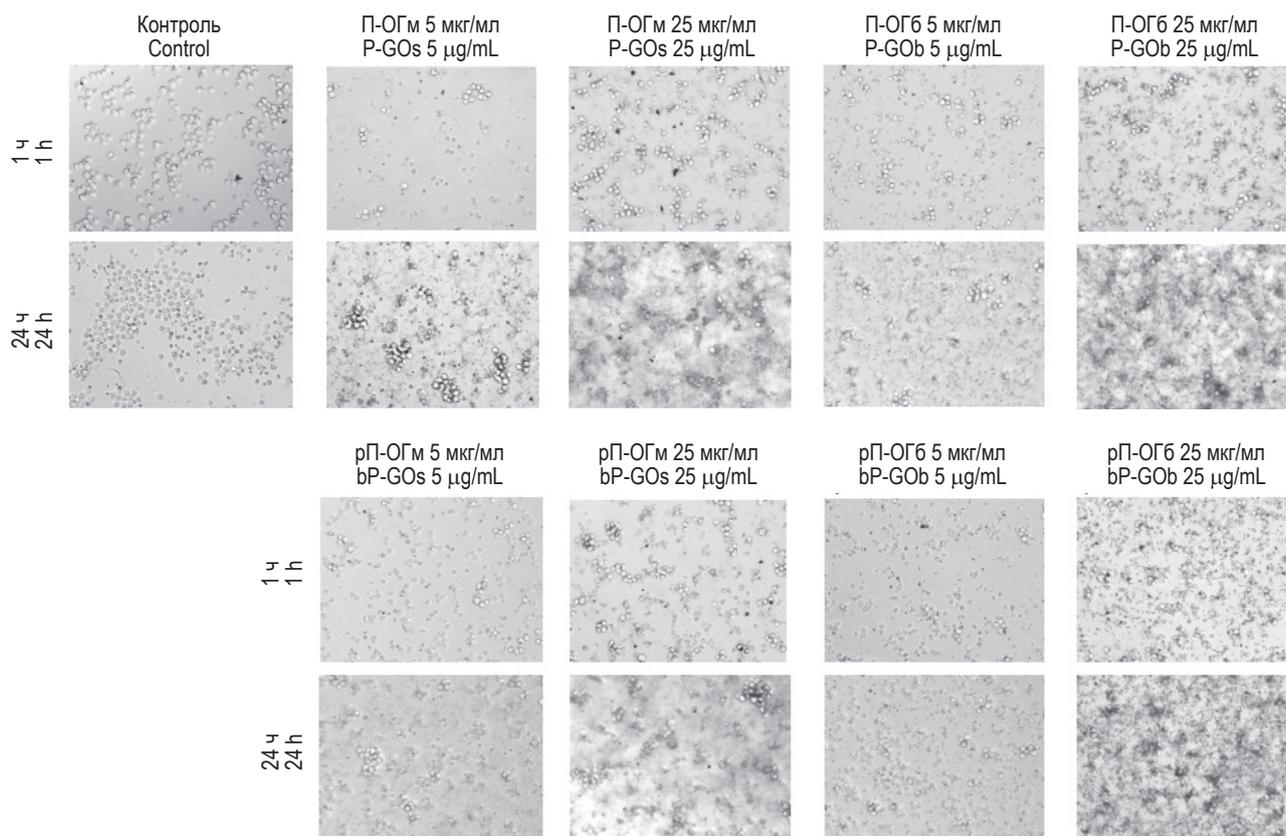


Рисунок 2. Визуализация взаимодействия клеток гибридомы ВАР3 и наночастиц ОГ

Примечание. П – линейный ПЭГ, рП – разветвленный ПЭГ, ОГм – частицы малого размера, ОГб – частицы большого размера.

Figure 2. Visualization of interaction between BAP3 hybridoma and GO nanoparticles

Note. P, linear PEG; bP, branched PEG; GOs, small particles; GOb, large particles.

Заключение

При изучении влияния наночастиц ОГ на клетки гибридомы ВАР3 было показано, что частицы оказывали цитотоксический эффект в высокой концентрации 25 мкг/мл, при этом цитотоксический эффект уменьшался с увеличением размера частиц. При оценке интернализации (адгезии) частиц клетками гибридомы ВАР3 обнаружено, что в концентрации 5 мкг/мл части-

цы практически не интернализировались, однако, концентрация наночастиц ОГ 25 мкг/мл способствовала их интенсивной интернализации (адгезии) клетками гибридомы. Таким образом, полученные данные позволяют связать оказываемый наночастицами ОГ цитотоксический эффект с их интернализацией (адгезией) клетками. В целом впервые изучены некоторые аспекты взаимодействия наночастиц ОГ с клетками гибридомы.

Список литературы / References

1. Behzadi S., Serpooshan V., Tao W., Hamaly M.A., Alkawareek M.Y., Dreaden E.C., Brown D., Alkilany A.M., Farokhzad O.C., Mahmoudi M. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem. Soc. Rev.*, 2017, Vol. 46, no. 14, pp. 4218-4244.
2. de Melo-Diogo D., Lima-Sousa R., Alves C.G., Costa E.C., Louro R.O., Correia I.J. Functionalization of graphene family nanomaterials for application in cancer therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2018, Vol. 171, pp. 260-275.
3. Khramtsov P., Bochkova M., Timganova V., Nechaev A., Uzhviyuk S., Shardina K., Maslennikova I., Rayev M., Zamorina S. Interaction of graphene oxide modified with linear and branched PEG with monocytes isolated from human blood. *Nanomaterials*, 2022, Vol. 12, no. 1, 126. doi: 10.3390/nano12010126.

4. Mitra S., Tomar P.C. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 2021, Vol. 19, no. 1, 159. doi: 10.1186%2Fs43141-021-00264-6.
5. Shareena T.P.D., McShan D., Dasmahapatra A.K., Tchounwou P.B. A review on graphene-based nanomaterials in biomedical applications and risks in environment and health. *Nanomicro Lett.*, 2018, Vol. 10, no. 3, 53. doi: 10.1007/s40820-018-0206-4.
6. Singh D.P., Herrera C.E., Singh B., Singh S., Singh R.K., Kumar R. Graphene oxide: An efficient material and recent approach for biotechnological and biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2018, Vol. 86, pp. 173-197.

Авторы:

Лазарев С.С. — инженер лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН; бакалавр кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Бочкова М.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН; старший преподаватель кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Тимганова В.П. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Пермь, Россия

Раев М.Б. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Authors:

Lazarev S.S., Engineer, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center; Bachelor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Bochkova M.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center; Senior Lecturer, Department of Microbiology and Immunology, Perm State University, Perm, Russian Federation

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

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

ФАКТОРЫ ВОСПАЛЕНИЯ, АДГЕЗИВНОСТИ И ТРОМБОЗА ПРИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ И ТЕРАПИИ ДЕКСАМЕТАЗОНОМ

**Магамедов И.Д., Пивоварова Л.П., Нохрин С.П., Сорока В.В.,
Арискина О.Б., Осипова И.В., Раджабов И.М., Фомин К.Н.,
Поцхор-оглы С.Л., Количенко Л.В., Маркелова Е.В., Гончарова О.В.**

*ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе»,
Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия при гипоксии, повреждении тканей, активации воспаления и коагуляции ассоциирована с экспрессией мембранных молекул ICAM-1 клетками крови и тканей. Одновременно адгезионные рецепторы тромбоцитов обуславливают их адгезию к эндотелию и к рекрутированным лимфоцитам. Роль тромбоцитов в патогенезе ишемических сердечно-сосудистых заболеваний также состоит в их способности модулировать как реакции гемостаза, так и воспалительные реакции, что сопровождается секрецией воспалительных медиаторов и факторов, способствующих рекрутированию лейкоцитов в места повреждения тканей. Чувствительным маркером повреждения тканей и тканевой ишемии является активность креатинкиназы. Цель исследования: изучить влияние противовоспалительной терапии дексаметазоном на активность воспаления и адгезивные свойства лимфоцитов, количество тромбоцитов в крови больных с острой ишемией нижних конечностей (ОИНК) и эффективность лечения больных.

Для изучения влияния противовоспалительной терапии сформирована группа из 32 пациентов с терапией дексаметазоном; контрольная группа представлена 71 пациентом с базисной терапией, группу сравнения составили 15 волонтеров. После операции ревааскуляризации все больные получали дезагрегантную и антикоагулянтную терапию. Инфузии дексаметазона проводили курсом от 4 до 6 дней после реконструктивной операции. У всех пациентов определяли содержание С-реактивного белка в крови, активность креатинкиназы, содержание тромбоцитов и крупных тромбоцитов. С помощью иммуноцитохимического метода подсчитывали число лимфоцитов, экспрессирующих молекулы адгезии ICAM-1 (CD54⁺). Исследования выполняли до операции и через 1, 3, 5, 7, 10 суток после операции.

При обострении ишемии и повреждении эндотелия, накоплении продуктов цитолиза усиливается экспрессия молекул адгезии как на эндотелиоцитах, так и на клетках-эффекторах воспаления – лей-

Адрес для переписки:

*Арискина Ольга Борисовна
ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе»
192242, Россия, Санкт-Петербург, ул. Будапештская, 3.
Тел.: 8 (911) 933-19-26.
E-mail: ariskinaob@emergency.spb.ru*

Address for correspondence:

*Ariskina Olga B.
I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care
192242, Russian Federation, St. Petersburg,
Budapeshtskaya str., 3.
Phone: 7 (911) 933-19-26.
E-mail: ariskinaob@emergency.spb.ru*

Образец цитирования:

*И.Д. Магамедов, Л.П. Пивоварова, С.П. Нохрин, В.В. Сорока, О.Б. Арискина, И.В. Осипова, И.М. Раджабов, К.Н. Фомин, С.Л. Поцхор-оглы, Л.В. Количенко, Е.В. Маркелова, О.В. Гончарова «Факторы воспаления, адгезивности и тромбоза при острой ишемии нижних конечностей и терапии дексаметазоном» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 251-258.
doi: 10.46235/1028-7221-1117-FOI*

© Магамедов И.Д. и соавт., 2022

For citation:

*I.D. Magamedov, L.P. Pivovarova, S.P. Nokhrin, V.V. Soroka, O.B. Ariskina, I.V. Osipova, I.M. Radzhabov, K.N. Fomin, S.L. Poiskhor-ogly, L.V. Kolichenko, E.V. Markelova, O.V. Goncharova "Factors of inflammatory, adhesiveness and thrombosis in acute lower limb ischemia and dexamethasone therapy", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 251-258.
doi: 10.46235/1028-7221-1117-FOI*

DOI: 10.46235/1028-7221-1117-FOI

коцитах и тромбоцитах. Молекулы адгезии проводят активационный сигнал внутрь клетки, что способствует адгезии лейкоцитов и тромбоцитов к эндотелию, лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии, образованию пристеночного тромба и возможной окклюзии поврежденных сосудов. Усиление экспрессии молекул адгезии связано с активацией метаболизма, воспаления, коагуляции и оксидативного стресса, стимулирует все ростки кроветворения, в том числе тромбоцитарный. Уровень вовлечения клеточных реакций в патогенез заболевания влияет на эффективность и продолжительность лечения, риск рецидивов тромбоза и летального исхода. Противовоспалительная терапия с дексаметазоном способствовала более ранней ремиссии, снижению доли инфекционных и тромботических осложнений, частоты летальных исходов, сокращению сроков лечения.

Воспаление, адгезивность клеток-эффекторов и тромбоз являются важными факторами патогенеза острой ишемии нижних конечностей. Дополнительная противовоспалительная терапия дексаметазоном способствует более ранней ремиссии, снижению доли инфекционных и тромботических осложнений, частоты летальных исходов, сокращению сроков лечения.

Ключевые слова: острая ишемия конечностей, лимфоциты, тромбоциты, молекулы адгезии, дексаметазон

FACTORS OF INFLAMMATORY, ADHESIVENESS AND THROMBOSIS IN ACUTE LOWER LIMB ISCHEMIA AND DEXAMETHASONE THERAPY

Magamedov I.D., Pivovarova L.P., Nokhrin S.P., Soroka V.V., Ariskina O.B., Osipova I.V., Radzhabov I.M., Fomin K.N., Potskhor-ogly S.L., Kolichenko L.V., Markelova E.V., Goncharova O.V.

I. Dzhanlidze Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Lymphocyte-to-platelet adhesion during hypoxia, tissue damage, activation of inflammation and coagulation is associated with expression of ICAM-1 membrane molecules by blood and tissue cells. At the same time, the platelet adhesion receptors determine their adherence to endothelium and recruited lymphocytes. Moreover, the role of platelets in pathogenesis of ischemic cardiovascular diseases comprises their ability to modulate both hemostasis and inflammatory reactions, which are accompanied by secretion of inflammatory mediators and some factors that promote recruitment of leukocytes to tissue damage sites. Creatine kinase activity is a sensitive marker of tissue damage and tissue ischemia. The purpose of the present study was to assess the effect of anti-inflammatory therapy with dexamethasone upon the intensity of inflammation and adhesive properties of lymphocytes, number of platelets in peripheral blood of the patients with acute lower limb ischemia (ALLI), as well as to evaluate the effectiveness of treatment.

To study the effect of anti-inflammatory therapy, a group of 32 patients treated with dexamethasone was selected; the control group was represented by 71 patients with basic therapy, the comparison group consisted of 15 volunteers. After revascularization, all patients received antiplatelet and anticoagulant therapy. Dexamethasone infusions were carried out as a course of 4 to 6 days after reconstructive surgery. In all patients, the content of C-reactive protein in blood, the activity of creatine kinase, the content of platelets and, especially, of enlarged platelets were determined. The numbers of lymphocytes expressing ICAM-1 (CD54⁺) adhesion molecules were counted using immunocytochemical technique. The studies were performed before surgery and 1, 3, 5, 7, 10 days after surgery.

During exacerbation of the limb ischemia and damage to endothelium, the accumulation of cytolysis products was noted. Expression of adhesion molecules was increased both on endotheliocytes and on inflammation effector cells, i.e., leukocytes and platelets. The adhesion molecules transmit the activating signal inside the cell, thus promoting adhesion of leukocytes and platelets to endothelium, lymphocytic-platelet adhesion, formation of parietal thrombi, and possible occlusion of damaged vessels. Increased expression of adhesion molecules

is associated with activation of metabolism, inflammation, coagulation and oxidative stress. It may stimulate all hematopoietic lineages, including platelets. The involvement level of cellular reactions in pathogenesis of the disease affects effectiveness and duration of treatment, risk of recurrent thrombosis and lethal outcome. Anti-inflammatory therapy with dexamethasone contributed to earlier remission, it was associated with lower frequency of infectious and thrombotic complications, decreased mortality, and reduced duration of treatment.

Inflammation, adhesiveness of effector cells and thrombosis are important factors in pathogenesis of acute lower limb ischemia. Additional anti-inflammatory therapy with dexamethasone contributes to earlier remission, decreased proportion of infectious and thrombotic complications, lower frequency of deaths, and reduced duration of treatment.

Keywords: acute limb ischemia, lymphocytes, platelets, adhesion molecules, dexamethasone

Введение

Активация коагуляции и тромбообразование являются факторами патогенеза острой ишемии нижних конечностей (ОИНК). Роль тромбоцитов в развитии сосудистых заболеваний обусловлена как активацией коагуляции и тромбообразования, так и модуляцией воспалительных реакций [1, 11]. Посредством экспрессии молекул адгезии и хемокинов тромбоциты вызывают активацию лейкоцитов, образуют с ними лиганд-рецепторные комплексы [8], в частности лимфоцитарно-тромбоцитарные агрегаты в очаге воспаления. Активированные кровяные пластинки продолжают присоединяться к лимфоцитам и лимфоцитарно-тромбоцитарным агрегатам, что приводит к дальнейшему росту клеточного скопления на поверхности сосудистой стенки [4]. Мембранными молекулами, участвующими в лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА), являются ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule, CD54⁺), экспрессируемые клетками крови и тканей. Рециркуляция и рекрутирование лейкоцитов в зоне воспаления опосредуются специфическим взаимодействием лиганд-рецептор между молекулами адгезии эндотелиоцитов, тромбоцитов и лейкоцитов, экспрессия которых регулируется воспалительными медиаторами и цитокинами. Адгезионные молекулы могут стать клинически значимыми мишенями для противовоспалительной терапии. В настоящее время ведется поиск агентов, селективно ингибирующих адгезионные молекулы.

Цель исследования — изучить влияние противовоспалительной терапии дексаметазоном на активность воспаления и адгезивные свойства лимфоцитов, количество тромбоцитов в крови больных с ОИНК и эффективность лечения больных.

Материалы и методы

Для достижения цели были сформированы 2 группы пациентов: основная, пациентам которой на фоне базисной терапии вводили дексаметазон (ДМ) внутривенно капельно в дозе 8 мг в 200 мл изотонического раствора хлорида натрия курсом от 4 до 6 дней после реконструктивной операции, 32 пациента, возраст 76 (70-81) лет; группа сравнения — 71 пациент с базисной терапией, возраст 70 (64-83) лет. Базисная терапия (БТ) включала обезболивающие, антибактериальные, дезагрегантные, антикоагулянтные средства. Всем пациентам с некомпенсированной ишемией выполняли операцию реваскуляризации артерий, пациентам с необратимой ишемией — ампутацию конечности. Контрольная группа представлена волонтерами, возраст 70 (55-80) лет. У всех пациентов определяли содержание в крови С-реактивного белка (СРБ) как маркера воспаления (Cobas 6000 C501, Швейцария), активность креатинкиназы (КК), количество тромбоцитов и крупных тромбоцитов (SYSMEX XT4000i, Япония), число CD54⁺ лимфоцитов иммуноцитохимическим методом (Novocastra, UK). Для оценки коморбидности использовали индекс Charlson M.E. Статистическую оценку выполнили методами вариационной статистики (Statistica 6.0); определяли медиану (Me) и перцентили ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), коэффициент корреляции Спирмена, t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости (p) статистических гипотез принимали за 0,05.

Результаты и обсуждение

У всех больных в структуре коморбидности преобладали хронические сердечно-сосудистые заболевания. Средний индекс коморбидности у больных основной группы составил 10,0; группы сравнения — 9,9 баллов, контрольной группы —

ТАБЛИЦА 1. РАЗВИТИЕ ВОСПАЛЕНИЯ И ЦИТОЛИЗА У БОЛЬНЫХ С ОИНК С БАЗИСНОЙ И ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИЕЙ ДЕКСАМЕТАЗОНОМ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 1. DEVELOPMENT OF INFLAMMATION AND CYTOLYSIS IN PATIENTS WITH ALLI WITH BASIC AND ADJUNCTIVE DEXAMETHASONE THERAPY DURING TREATMENT

Сроки наблюдения Terms of observation	Пациенты с базисной терапией Patients with basic therapy		Пациенты с терапией дексаметазоном Patients with therapy dexamethasone	
	СРБ (мг/л) CRP (mg/L)	КК (Ед/л) СК (U/L)	СРБ (мг/л) CRP (mg/L)	КК (Ед/л) СК (U/L)
До операции Before surgery	41,1* (9,0-86,7)	2628* (552-5489)	34,7* (7,9-52,3)	1404* (111-2000)
После операции After surgery	66,5* (31,9-156,2)	1711* (552-1205)	61,9* (18,6-86,1)	1621* (127-1216)
3-и сутки 3 rd day	108,3* (52,3-157,3)	1130* (270-1566)	70,5* (12,6-80,8)	416*# (144-771)
7-е сутки 7 th day	62,2* (21,1-135,6)	1480* (376-4103)	28,4* (14,7-33,5)	315# (158-479)
10-е сутки 10 th day	74,2* (51,0-141,4)	148* (84-484)	31,1*# (22,2-39,4)	68,5 (37-110)
Контроль Control	2,9 (1,1-4,1)	76 (65-97)	2,9 (1,1-4,1)	76 (65-97)

Примечание. * – различия с контролем: $p < 0,05$; # – различия между группами, $p < 0,05$.

Note. *, differences with control: $p < 0.05$; #, differences between groups, $p < 0.05$.

6,7. Концентрация СРБ в крови всех пациентов при поступлении в стационар превышала нормальные показатели в 11-14 раз и достигала максимума в периоде реперфузии, т. е. на 3-7-е сутки после операции (табл. 1). У пациентов, получавших ДМ, концентрация СРБ снижалась уже к 7-м суткам наблюдения и была в 2 раза ниже, чем в группе сравнения. Активность КК как маркера цитолиза в результате тканевой гипоксии была максимальной при поступлении у больных обеих групп. Начиная с 3-х суток после операции наблюдали снижение уровня КК, при этом у больных основной группы более заметное, чем у больных с БТ. К 10-м суткам наблюдения активность КК нормализовалась только у пациентов основной группы.

Рецепторами, участвующими в ЛТА, являются ICAM-1-лиганды для $\beta 2$ -интегринов (CD11a/CD18, CD11b/CD18), LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1), Mac-1 (macrophage-1 antigen) и CD43 [3]. У всех больных ОИНК до операции тромбэктомии содержание

$CD54^+$ лимфоцитов было в 1,5-2 раза выше, чем у волонтеров, коррелировало с исходом ОИНК ($r = -0,652$ $p < 0,05$) и количеством крупных тромбоцитов ($r = -0,845$ $p < 0,001$). После тромбэктомии также у всех пациентов снижалось количество $CD54^+$ лимфоцитов вплоть до 7-м суток. К 10-м суткам у больных с БТ наблюдали повышенные числа $CD54^+$ лимфоцитов, а у больных, получавших ДМ, показатель оставался в пределах нормы (табл. 2). Таким образом, введение ДМ уменьшало активность воспаления и тканевого повреждения, количество $CD54^+$ клеток. Корреляционный анализ выявил связь количества $CD54^+$ лимфоцитов с количеством тромбоцитов ($r = -0,849$; $p < 0,05$) на 3-и сутки после операции; на 7-е сутки – с исходом заболевания ($r = -0,956$; $p < 0,05$) и способом терапии ($r = -0,956$; $p < 0,05$); на 10-е сутки – с концентрацией СРБ ($r = 0,952$; $p < 0,05$).

Роль тромбоцитов в патогенезе сосудистых заболеваний обусловлена их влиянием на активацию коагуляции и воспаления, тонус сосудистой

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ CD54⁺ ЛИМФОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ (plt) У БОЛЬНЫХ С ОИНК С БАЗИСНОЙ И ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИЕЙ ДЕКСАМЕТАЗОНОМ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 2. CONTENT OF CD54⁺ LYMPHOCYTES AND PLATELETS (plt) IN PATIENTS WITH ALLI WITH BASIC AND ADJUNCTIVE DEXAMETHASONE THERAPY DURING TREATMENT

Сроки наблюдения Terms of observation	Пациенты с базисной терапией Patients with basic therapy		Пациенты с терапией дексаметазоном Patients with therapy dexamethasone	
	CD54 ⁺ (%)	Plt (10 ⁹ /L)	CD54 ⁺ (%)	Plt (10 ⁹ /L)
До операции Before surgery	31,7* (23,2-41,1)	245,5 (171,1-283,0)	29,2* (25,1-39,5)	255,1 (180,2-329,9)
После операции After surgery	25,4* (21,1-33,7)	229,4 (154,1-279,0)	22,7* (13,6-31,0)	240,8 (179,1-321,6)
3-и сутки 3 rd day	24,0 (19,3-27,3)	350,0* (298,0-409,1)	19,8 (13,9-24,1)	295,1 (201,9-351,2)
7-е сутки 7 th day	15,1* (8,8-19,3)	421,1* (341,2-516,0)	8,8* (4,7-15,8)	299,4# (234,3-362,1)
10-е сутки 10 th day	25,5* (21,5-31,1)	324,1 (257,2-340,4)	17,0# (13,9-23,1)	282,2 (202,0-360,1)
Контроль Control	19,4 (15,1-25,1)	227,0 (189,0-258,0)	19,4 (15,1-25,1)	227,0 (189,0-258,0)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

стенки. ЛТА регулируется цитокинами и индукторами агрегации тромбоцитов (IL-16, ICAM-I, IL-2, IL-1) [6]. Активация тромбоцитов кровотоком и последующая их агрегация в микроциркуляторном русле приводит к повреждению эндотелия [7, 8]. Более того, адгезия тромбоцитов к эндотелию и секреция медиаторов воспаления вызывает активацию эндотелиоцитов, способствуя хемотаксису, адгезии и трансмиграции лейкоцитов в участки воспаления [9], формированию атеросклеротического повреждения сосудистой стенки [10] и тромбозу. В связи с этим первоочередная цель лечения – коррекция адгезии и агрегации тромбоцитов. Во время артериального тромбоза и острой ишемии конечности содержание тромбоцитов в крови больных не отличалось от нормы, что, вероятно, связано с увеличением их пристеночного пула и повышенным потреблением. У больных с БТ содержание тромбоцитов было максимальным в периоде реперфузии, в то время как у больных с терапией ДМ содержание тромбоцитов не превышало нормальных значе-

ний (табл. 2). Крупные тромбоциты (p-Icg) – незрелые, реактивные тромбоциты с повышенным адгезивным и тромботическим потенциалом. Увеличение фракции p-Icg является ранним индикатором потребления кровяных пластинок (норма: 13–43% независимо от возраста и пола пациента). Большинство исследователей относят параметр «фракция незрелых тромбоцитов» к тромбопоэтическим индексам, отражающим состояние тромбоцитопоэза [1]. Содержание крупных тромбоцитов у больных обеих групп находилось в референсных пределах.

В итоге терапия ДМ способствовала снижению числа осложнений после ОИНК: нагноения ран – в 1,5 раза, пиелонефрита – в 1,6 раза, сепсиса – в 1,7 раза, тромбоэмболий – в 5 раз. Частота ампутаций конечности уменьшилась в 2,5 раза, а летальных исходов – в 5 раз.

Дексаметазон, как выяснили Spiecker M. с соавторами [10], снижает NF-κB-опосредованную индукцию, активируемую воспалительными цитокинами экспрессию молекул адгезии на эн-

дотелии, прежде всего ICAM-1. Этот механизм объясняет и снижение числа лимфоцитов, экспрессирующих молекулы адгезии ICAM-1. Таким образом назначение дексаметазона препятствует развитию эндотелиальной дисфункции, снижая межклеточную адгезию, а также предотвращая дисбаланс между протромботической и противотромботической функцией эндотелия.

Заключение

Ишемические заболевания нижних конечностей являются мультифакториальным заболеванием. Очевидна приоритетная роль воспаления в патогенезе тромботических заболеваний. При обострении ишемии, повреждении эндотелия, накоплении продуктов цитолиза усиливается экспрессия молекул адгезии как на эндотелиоцитах, так и на клетках-эффекторах воспаления – лейкоцитах и тромбоцитах. Усиление экспрессии молекул адгезии связано с активацией метаболизма, стимулирует развитие воспаления и оксидативного стресса, стимулирует все ростки кроветворения, в том числе тромбоцитарный, и продукцию факторов коагуляции. Чрезмерная

активация экспрессии молекул адгезии приводит к увеличению продолжительности лечения, рецидивам тромбоза и риску летального исхода. Назначение дополнительной противовоспалительной терапии дексаметазоном способствовало более раннему наступлению ремиссии, снижению доли осложнений, количества необходимых ампутаций и летальных исходов, сокращению сроков лечения.

Количественные характеристики тромбоцитов и крупных тромбоцитов не отражают в полной мере событий тромбоза при острой ишемии конечностей. Необходимо определять качественные маркеры активности тромбоцитов, объективно характеризующие их функции.

Выводы

Воспаление, адгезивность клеток-эффекторов и тромбообразование являются основными факторами патогенеза острой ишемии нижних конечностей. Дополнительная противовоспалительная терапия способствует улучшению результатов лечения.

Список литературы / References

1. Бурячковская Л.И. Гетерогенность тромбоцитов человека и животных. Связь морфологических особенностей с функциональным состоянием: автореф. дисс. ... докт. биол. наук. М., 2007. 217 с. [Buryachkovskaya L.I. Heterogeneity of human and animal platelets. Communication of morphological features with the functional state: abstract dis. ... doct. med. sci.] Moscow, 2007. 217 p.
2. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии // Медицинская иммунология, 2006. Т. 8, № 5-6. С. 745-753. [Vitkovsky Yu.A., Kuznik B.I., Solpov A.V. Pathogenetic significance of lymphocytic-platelet adhesion. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 5-6, pp. 745-753. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2006-5-6-745-753.
3. Москалец О.В. Молекулы клеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1 при инфекционной патологии // Тихоокеанский медицинский журнал, 2018. № 2. С. 21-25. [Moskalets O.V. Cell adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in infectious pathology. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2018, no. 2, pp. 21-25. (In Russ.)]
4. Романюк С.В., Витковский Ю.А., Солпов А.В. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у больных со стенокардией и острым коронарным синдромом // Современные научные исследования и инновации, 2012. № 11. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://web.snauka.ru/issues/2012/11/18607>. [Romanyuk S.V., Vitkovsky Yu.A., Solpov A.V. Lymphocyte-platelet adhesion in patients with angina pectoris and acute coronary syndrome. *Sovremennye nauchnye issledovaniya i innovatsii = Modern Scientific Research and Innovation*, 2012, no. 11. [Electronic resource]. Access mode: <https://web.snauka.ru/issues/2012/11/18607>. (In Russ.)]
5. Huo Y., Schober A., Forlow S.B., Smith D.F., Hyman M.S., Jung S., Littman D.R., Weber C., Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein. *Nat. Med.*, 2003, Vol. 9, pp. 61-67.
6. Jorgensen L. ADP-induced platelet aggregation in the microcirculation of pig myocardium and rabbit kidneys. *Thromb. Hemost.*, 2005, Vol. 3, pp. 1119-1124.

7. Jorgensen L. The role of platelets in the initial stages of atherosclerosis. *Thromb. Hemost.*, 2006, Vol. 4, pp. 1443-1449.
8. Kral J.B., Schrottmaier W.C., Salzmann M., Assinger A. Platelet interaction with innate immune cells. *Transfus. Med. Hemother.*, 2016, Vol. 43, no. 2, pp. 78-88.
9. Lindemann S., Kramer B., Seizer P., Gawaz M. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *Thromb. Hemost.*, 2007, Vol. 5, pp. 203-211.
10. Spiecker M., Darius H., Liao J.K. A functional role of I κ B-e in endothelial cell activation. *J. Immunol.*, 2000; 164, no. 6, pp. 3316-3322.
11. Wagner D.D., Burger P.C. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003, Vol. 23, no. 12, pp. 2131-2137.

Авторы:

Магамедов И.Д. — хирург отделения сосудистой хирургии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Пивоварова Л.П. — д.м.н., руководитель отдела лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Нохрин С.П. — д.м.н., ведущий научный сотрудник ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Сорока В.В. — д.м.н., профессор, руководитель отдела неотложной сердечно-сосудистой хирургии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Арискина О.Б. — к.б.н., научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Осипова И.В. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Раджабов И.М. — хирург отделения сосудистой хирургии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Фомин К.Н. — к.м.н., хирург отделения сосудистой хирургии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Magamedov I.D., Surgeon, Department of Vascular Surgery, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation

Pivovarova L.P., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Laboratory Diagnostics, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation

Nokhrin S.P., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation

Soroka V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Emergency Cardiovascular Surgery, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation

Ariskina O.B., PhD (Biology), Research Associate, Department of Laboratory Diagnostics, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation

Osipova I.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Laboratory Diagnostics, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation

Radjabov I.M., Surgeon, Department of Vascular Surgery, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation

Fomin K.N., PhD (Medicine), Surgeon, Department of Vascular Surgery, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation

Поцхор-оглы С.Л. — хирург отделения сосудистой хирургии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Колеченко Л.В. — заведующая клинико-диагностической лабораторией ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Маркелова Е.В. — врач клинико-диагностической лаборатории ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Гончарова О.В. — биолог отдела лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Potskhor-ogly S.L., Surgeon, Department of Vascular Surgery, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation

Kolichenko L.V., Head, Laboratory of Clinical Diagnostics, Department of Vascular Surgery, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation

Markelova E.V., Doctor, Laboratory of Clinical Diagnostics, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation

Goncharova O.V., Biologist, Department of Laboratory Diagnostics, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 13.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 13.05.2022
Accepted 29.05.2022

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ОЗОНА И 5-АМИНОСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ НА ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

Осиков М.В.^{1,2}, Кайгородцева Н.В.^{1,2}, Бойко М.С.¹, Федосов А.А.^{3,4}

¹ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

² ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

³ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Резюме. Мультитропные эффекты озона являются предпосылкой для его применения в комплексной терапии воспалительных заболеваний кишечника. Цель — проанализировать влияние озона и 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК) при оксазолон-индуцированном колите (ОИК) на показатели врожденного иммунитета.

На 72 самцах крыс линии Wistar массой 240±20 г моделировали ОИК двухэтапным применением раствора оксазолон. Озон в дозе 0,05 мг/кг в составе озонкислородной смеси вводили внутрибрюшинно каждые 24 часа. Показатели исследовали на 2-е, 4-е, 6-е сутки. В крови исследовали количество лейкоцитов, лейкоформулу, поглотительную способность нейтрофилов крови и их кислородзависимый метаболизм, в гомогенате слизистой оболочки толстой кишки — концентрацию IL-17.

При ОИК на 2-е, 4-е и 6-е сутки в крови увеличивается количество лейкоцитов с преобладанием лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов и их поглотительной способности, в области повреждения толстой кишки увеличивается концентрация IL-17, на 2-е и 4-е сутки — активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста, на 2-е и 6-е сутки — активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста. Применение озона снижает на 2-е и 6-е сутки в крови содержание лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов и их поглотительной способности на 2-е и 4-е сутки, снижению НСТ-редуцирующей способности на 6-е сутки, снижению концентрации IL-17 в области повреждения толстой кишки на 4-е и 6-е сутки. Эффекты применения при ОИК озона по сравнению с 5-АСК менее выражены на 2-е и 4-е сутки в отношении уменьшения количества в крови моноцитов, нейтрофилов и их поглотительной способности на 2-е сутки, концентрации IL-17 в области повреждения толстой кишки на 4-е и 6-е сутки.

Ключевые слова: экспериментальный колит, озон, 5-аминосалициловая кислота, нейтрофилы, IL-17

Адрес для переписки:

Осиков Михаил Владимирович
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (919) 122-37-99.
Факс: 8 (351) 260-77-55.
E-mail: prof.osikov@yandex.ru

Address for correspondence:

Osikov Michael V.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (919) 122-37-99.
Fax: 7 (351) 260-77-55.
E-mail: prof.osikov@yandex.ru

Образец цитирования:

М.В. Осиков, Н.В. Кайгородцева, М.С. Бойко, А.А. Федосов «Сравнительный анализ влияния озона и 5-аминосалициловой кислоты при экспериментальном колите на показатели врожденного иммунитета» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 259–266. doi: 10.46235/1028-7221-1152-CEO
© Осиков М.В. и соавт., 2022

For citation:

M.V. Osikov, N.V. Kaigorodtseva, M.S. Boyko, A.A. Fedosov “Comparative effect of ozone exposure and 5-aminosalicylic acid in oxazolone-induced colitis upon the indices of innate immunity”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 259–266. doi: 10.46235/1028-7221-1152-CEO
DOI: 10.46235/1028-7221-1152-CEO

COMPARATIVE EFFECT OF OZONE EXPOSURE AND 5-AMINOSALICYLIC ACID IN OXAZOLON-INDUCED COLITIS UPON THE INDICES OF INNATE IMMUNITY

Osikov M.V.^{a, b}, Kaigorodtseva N.V.^{a, b}, Boyko M.S.^a, Fedosov A.A.^{c, d}

^a South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

^c N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

^d Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. Multiple effects of ozone are a prerequisite for its use in the complex therapy of inflammatory bowel diseases. Our aim was to analyze the effects of ozone and 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in oxazolone-induced colitis (OIC) upon the innate immunity functions.

OIC was modeled in 72 male Wistar rats weighing 240 ± 20 g by a two-stage application of oxazolone solution. Ozone at a dose of 0.05 mg/kg, as a part of ozone-oxygen mixture, was injected intraperitoneally every 24 hours. The laboratory indices were studied on the days 2, 4, 6. In blood samples, the number of leukocytes, differential leukocyte counts, absorptive capacity of blood neutrophils and their oxygen-dependent metabolism were studied. In homogenate of the colon mucosa, IL-17 concentration was measured.

In OIC, on days 2, 4, and 6, the number of blood leukocytes was increased, with a predominance of lymphocytes, monocytes, neutrophils and their absorption capacity; the concentration of IL-17 increased in the areas of colonic damage. On days 2 and 4, the activity and intensity of the spontaneous NBT test is increased like as activity and intensity of induced NBT-test on days 2 and 6. Administration of ozone reduced the content of blood leukocytes, lymphocytes, neutrophils on days 2 and 6, like as their absorption capacity on days 2 and 4, along with a decrease in NCT-reducing ability on days 6, and decreased IL-17 concentration in the area of colonic damage on days 4 and 6. The effects of ozone administration in OIC, if compared with 5-ASA, are less pronounced on days 2 and 4, with respect to decreased number of monocytes, neutrophils in blood and their absorption capacity on days 2, like as IL-17 concentration in the area of colonic damage on days 4 and 6.

Keywords: experimental colitis, ozone, 5-aminosalicylic acid, neutrophils, IL-17

Введение

Производные 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), глюкокортикостероиды и иммуносупрессоры являются базисной терапией воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), которые обладают широким спектром побочных эффектов, что ограничивает длительный прием, а значит необходим поиск новых терапевтических подходов [11]. Ранее нами при экспериментальном моделировании ВЗК продемонстрированы антиоксидантные, противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства экстракта куркумы, эритропоэтина и витамина D₃ [1, 2, 3, 4, 9]. Интерес представляет применение озона ввиду наличия у него выраженных противовоспалительных, иммуномодулирующих, микробицидных, регулирующих редокс-статус свойств [8]. Известно успешное применение озонотерапии в хирургии, дерматокосметологии, оториноларингологической практике, имеются отдельные пу-

бликации о применении озонотерапии в гастроэнтерологии [5, 7].

Цель – исследовать влияние озона и 5-АСК при оксазолон-индуцированном колите (ОИК) на показатели врожденного иммунитета.

Материалы и методы

72 самца крыс линии Wistar массой 240 ± 20 г расформированы в 4 группы: группа 1 (n = 9) – интактный контроль; группа 2 (n = 21) – крысы с ОИК; группа 3 (n = 21) – крысы с ОИК на фоне внутрибрюшинного введения каждые 24 ч озона в дозе 0,05 мг/кг в составе озонородной смеси (ОКС) (Заявка на изобретение № 2021123148/14(048302); группа 4 (n = 21) – крысы с ОИК на фоне терапии 5-АСК в дозе 50 мг в составе ректальных суппозиторий каждые 12 ч. Суппозитории для крыс с 50 мг 5-АСК готовили на основе ректальных суппозиторий «Салофальк» (МНН: Месалазин, Doctor Falk Pharma

GmbH, Германия). ОИК воспроизводили поочередным применением раствора оксазолон (Sigma-aldrich, США): в первую очередь – сенсибилизация нанесением на предварительно выбритую межлопаточную область кожи 675 мкл/кг

3%-ного раствора оксазолон (в 100% этиловом спирте); во вторую очередь – ректальное введение на глубину 7-8 см 675 мкл/кг 3%-ного раствора оксазолон (в 50% этиловом спирте). Для анестезии использовали препарат «Золетил-100»

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ВНУТРИБРЮШИННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ОЗОНА И 5-АСК НА ПОПУЛЯЦИЮ ЛЕЙКОЦИТОВ В КРОВИ И В ОЧАГЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ ОИК, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. EFFECT OF INTRAPERITONEAL USE OF OZONE AND 5-ASA ON THE POPULATION OF LEUKOCYTES IN THE BLOOD AND IN THE FOCUS OF COLON INJURY IN OIC, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа 1 Интактные Group 1 Intact (n = 10)	Группа 2 ОИК Group 2 OIC			Группа 3 ОИК + ОКС ВБ Group 3 OIC + OOM IP			Группа 4 ОИК+ 5-АСК Group 4 OIC + 5-ASA		
		2-е сутки 2 nd day (n = 9)	4-е сутки 4 th day (n = 10)	6-е сутки 6 th day (n = 10)	2-е сутки 2 nd day (n = 9)	4-е сутки 4 th day (n = 10)	6-е сутки 6 th day (n = 10)	2-е сутки 2 nd day (n = 9)	4-е сутки 4 th day (n = 10)	6-е сутки 6 th day (n = 10)
Лейкоциты, × 10 ⁹ /л White blood cells, × 10 ⁹ /L	5,24 (4,24- 6,42)	16,75 (14,04- 19,28) *	15,08 (13,87- 15,66) *	14,62 (13,36- 15,41) *	14,91 (11,84- 18,28) *	6,98 (6,06- 7,91) #	4,97 (4,42- 5,81) #	8,36 (6,92- 10,91) * # \$	4,81 (4,31- 6,31) # \$	4,35 (3,71- 4,87) #
Нейтрофилы, × 10 ⁹ /л Neutrophils, × 10 ⁹ /L	1,58 (1,34- 1,71)	5,57 (2,63- 6,63) *	2,79 (1,99- 3,54) *	3,53 (1,93- 5,14) *	8,97 (7,68- 10,69) * #	3,86 (3,25- 4,47) *	1,73 (1,21- 2,32)	4,64 (2,52- 8,19) * \$	1,75 (1,16- 1,82) # \$	1,54 (1,12- 2,14) #
Палочкоядерные нейтрофилы, × 10 ⁹ /л Rod-shaped neutrophils, × 10 ⁹ /L	0,02 (0,00- 0,05)	0,32 (0,21- 0,38) *	0,01 (0,00- 0,01)	0,09 (1,93- 5,14)	0,05 (0,01- 0,12) #	0,02 (0,02- 0,03)	0,05 (0,03- 0,05) #	0,07 (0,00- 0,11) #	0,03 (0,00- 0,03)	0,03 (0,00- 0,07)
Сегментоядерные нейтрофилы, × 10 ⁹ /л Segmented neutrophils, × 10 ⁹ /L	1,55 (1,34- 1,65)	5,25 (2,41- 6,14) *	2,78 (1,99- 3,54) *	3,43 (1,61- 5,14) *	8,91 (7,56- 10,51) * #	3,86 (3,25- 4,47) *	1,74 (1,36- 2,29)	4,57 (2,52- 8,17) * \$	1,71 (1,16- 1,82) # \$	1,51 (1,12- 2,07)
Эозинофилы, × 10 ⁹ /л Eosinophils, × 10 ⁹ /L	0,12 (0,00- 0,12)	0,02 (0,00- 0,05)	0,11 (0,05- 0,12)	0,24 (0,06- 0,29)	0,44 (0,12- 0,38) #	0,14 (0,04- 0,23)	0,04 (0,00- 0,13)	0,04 (0,00- 0,11) \$	0,11 (0,06- 0,17)	0,09 (0,00- 0,17)
Лимфоциты, × 10 ⁹ /л Lymphocytes, × 10 ⁹ /L	3,25 (2,32- 4,48)	10,46 (10,93- 12,58) *	11,82 (11,41- 13,19) *	10,27 (6,31- 12,71) *	4,91 (3,21- 6,21) #	2,62 (2,21- 3,05)	3,03 (2,11- 4,21) #	3,38 (2,57- 4,41) #	2,71 (2,01- 0,81) #	2,49 (2,27- 3,02) #
Моноциты, × 10 ⁹ /л Monocytes, × 10 ⁹ /L	0,27 (0,23- 0,32)	0,68 (0,47- 0,81) *	0,34 (0,14- 0,41)	0,57 (0,36- 0,75) *	0,58 (0,51- 0,61) *	0,35 (0,31- 0,41)	0,16 (0,10- 0,21) *	0,28 (0,21- 0,36) # \$	0,23 (0,15- 0,25)	0,22 (0,17- 0,25) #

Примечание. * – статистически значимые (p < 0,05) различия с группой интактных животных; # – с группой 2; \$ – с группой 3. ОИК – оксазолон-индуцированный колит, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота, ОКС – озонкислородная смесь, ВБ – внутрибрюшинно.

Note. *, statistically significant (p < 0.05) differences with group intact animals; #, with group 2; \$, with group 3. OIC, oxazolone-induced colitis; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; OOM-ozone-oxygen mixture; IP, intraperitoneal.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ВНУТРИБРЮШИННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ОЗОНА И 5-АСК НА ПОГЛОТИТЕЛЬНУЮ И НСТ-РЕДУЦИРУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ОИК, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. EFFECT OF INTRAPERITONEAL USE OF OZONE AND 5-ASA ON THE ABSORPTION AND NBT-REDUCING ABILITY OF NEUTROPHILS IN OIC, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа 1 Интакт- ные Group 1 Intact (n = 10)	Группа 2 ОИК Group 2 OIC			Группа 3 ОИК + ОКС ВБ Group 3 OIC + OOM IP			Группа 4 ОИК + 5-АСК Group 4 OIC + 5-ASA		
		2-е сутки 2 nd day (n = 9)	4-е сутки 4 th day (n = 10)	6-е сутки 6 th day (n = 10)	2-е сутки 2 nd day (n = 9)	4-е сутки 4 th day (n = 10)	6-е сутки 6 th day (n = 10)	2-е сутки 2 nd day (n = 9)	4-е сутки 4 th day (n = 10)	6-е сутки 6 th day (n = 10)
Активность фагоцитоза, % Phagocytosis activity, %	35,62 (32,00-37,50)	49,11 (44,00-54,00) *	55,31 (45,00-64,00) *	50,61 (38,00-67,00) *	58,33 (56,00-61,00) *#	46,51 (45,00-48,00) #	41,16 (40,00-42,00)	31,51 (30,00-36,00) # \$	43,51 (38,00-48,00) * #	35,83 (29,00-41,00) #
Интенсивность фагоцитоза, у. е. Phagocytosis intensity, c. u.	0,71 (0,61-0,78)	3,65 (3,63-3,85) *	8,38 (6,37-12,16) *	6,85 (3,65-10,81) *	3,44 (2,89-3,86) *	2,71 (1,67-3,89) * #	2,48 (1,65-2,84) *	1,53 (1,46-1,46) * # \$	4,87 (3,92-5,92) * # \$	3,61 (2,94-4,63) *
Фагоцитарное число, у. е. Phagocytic number, c. u.	1,96 (0,60-0,78)	7,51 (7,12-7,51) *	14,91 (14,15-19,00) *	12,71 (9,61-16,11) *	5,97 (5,17-6,77) * #	5,84 (3,71-8,31) * #	6,07 (4,03-7,29) *	4,97 (4,05-5,61) * #	11,37 (10,25-13,53) * # \$	9,92 (7,73-13,00) *
НСТ-тест спонтанный, активность, % NBT-spontaneous test, activity, %	4,25 (4,00-5,00)	9,91 (10,00-10,00) *	13,30 (15,00-15,00) *	8,21 (2,00-12,00)	7,16 (6,00-8,00) *	6,16 (5,00-7,00) *	5,16 (4,00-6,00) *	11,00 (8,00-11,00) *	7,30 (5,00-9,00) * #	7,33 (5,00-10,00) *
НСТ-тест спонтанный, интенсивность, у. е. NBT-spontaneous test, intensity, c. u.	0,05 (0,05-0,07)	0,15 (0,15-0,17) *	0,16 (0,19-0,19) *	0,08 (0,02-0,12)	0,07 (0,06-0,08) *	0,12 (0,09-0,18) *	0,09 (0,06-0,12) *	0,12 (0,09-0,12) *	0,09 (0,06-0,11) #	0,08 (0,05-0,11)
НСТ-тест индуцированный, активность, % NBT-induced test, activity, %	5,25 (4,00-6,00)	16,41 (8,00-22,00) *	7,71 (3,00-13,00)	10,80 (7,00-16,00) *	7,66 (7,00-9,00)	4,80 (4,00-5,00) *	4,66 (3,00-6,00) #	12,00 (9,00-18,00) *	4,41 (2,00-7,00)	8,83 (7,00-10,00) *
НСТ-тест индуцированный, интенсивность, у. е. NBT-induced test, intensity, c. u.	0,06 (0,06-0,06)	0,21 (0,11-0,26) *	0,11 (0,05-0,19)	0,11 (0,07-0,16) *	0,04 (0,03-0,05)	0,11 (0,08-0,15) *	0,08 (0,06-0,07)	0,17 (0,14-0,23) *	0,06 (0,02-0,08)	0,09 (0,08-0,11) *
Функциональный резерв (активность НСТ-теста) Functional reserve (activity of the NBT test)	1,23 (0,81-1,51)	1,67 (1,33-2,21)	0,62 (0,21-0,86) *	2,87 (0,58-5,51)	1,14 (0,87-1,51)	0,71 (0,44-0,83)	0,94 (0,75-1,16)	1,15 (0,12-0,12)	0,73 (0,21-0,87)	1,46 (0,81-2,00)
Функциональный резерв (интенсивность НСТ-теста) Functional reserve (intensity of the NBT test)	1,17 (0,85-1,00)	1,36 (1,52-1,61)	0,66 (0,26-1,00)	2,84 (0,58-5,51)	0,35 (0,00-0,51)	0,62 (0,00-0,83)	0,89 (0,63-1,16)	1,49 (1,55-1,55)	0,75 (0,26-1,00)	1,41 (0,72-2,20)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

(МНН: тилетамина гидрохлорид) (Virbac Sante Animale; Франция) в дозе 20 мг/кг [6]. Озон в составе ОКС получали на специальной озонотерапевтической установке с деструктором озона УОТА-60-01-«Медозон» (ООО «МЕДОЗОН», Москва). Выводили крыс из эксперимента и оценивали показатели на 2-е, 4-е и 6-е сутки. Популяции лейкоцитов в крови определяли на геманализаторе, откалиброванном для крови крыс, ВС-2801Vet (Mindray, Китай) и подсчитывали в мазках крови, окрашенных гематоксилином и эозином. НСТ-редуцирующую способность нейтрофилов оценивали по интенсивности восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в диформаза. Поглощительную способность нейтрофилов оценивали по поглощению частиц латекса. Определение концентрации IL-17 проводили в гомогенатах области повреждения толстой кишки с помощью специфических тест-систем для крыс Bender Medsystems (Австрия) на иммуноферментном анализаторе Personal LAB (Италия). Обработка данных осуществлена с помощью IBM SPSS Statistics 19, статистически значимыми считали отличия при $p < 0,01$ с использованием критериев Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Установлено, что на 2-е, 4-е и 6-е сутки ОИК в крови растет содержание лейкоцитов с преобладанием лимфоцитов, сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов (табл. 1). На все сутки увеличивается поглощительная способность нейтрофилов (табл. 2). Активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста растет на 2-е и 4-е сутки, активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста – на 2-е и 6-е сутки, функциональный резерв нейтрофилов, оцениваемый по активности НСТ-теста, уменьшается к 4-м суткам (табл. 2). Концентрация IL-17 в области повреждения толстой кишки увеличивается на 2-е сутки ($12,13 \pm 0,39$ пг/мл; контроль $6,48 \pm 0,37$ пг/мл; $p < 0,01$), 4-е сутки ($18,47 \pm 0,46$ пг/мл; $p < 0,01$) и 6-е сутки ($27,59 \pm 2,88$ пг/мл; $p < 0,01$).

На 2-е сутки ОИК в крови в условиях применения озона в составе ОКС отмечается увеличение количества эозинофилов, общего количества нейтрофилов (преимущественно сегментоядерных), уменьшение количества палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, количество моноцитов значимо не изменяется; увеличение активности фагоцитоза, снижение фагоцитарного числа, НСТ-редуцирующая способность нейтрофилов без значимых изменений; концентрация IL-17 в области повреждения толстой кишки

без значимых изменений ($13,09 \pm 0,31$ пг/мл; $p > 0,01$) (табл. 1, 2). К 4-м суткам в крови общее количество лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, моноцитов не имеют значимых различий с группой животных с ОИК; снижается поглощительная способность нейтрофилов, а НСТ-редуцирующая способность не имеет значимых различий с группой животных с ОИК; в области повреждения уменьшается концентрация IL-17 ($12,52 \pm 0,55$ пг/мл; $p < 0,01$) (табл. 1, 2). На 6-е сутки в крови зафиксировано снижение количества лейкоцитов, преимущественно лимфоцитов и палочкоядерных нейтрофилов, без значимых изменений поглощительная способность нейтрофилов, отмечено снижение активности индуцированного НСТ-теста; в области повреждения толстой кишки уменьшение концентрации IL-17 ($10,52 \pm 0,25$ пг/мл; $p < 0,01$) (табл. 1, 2).

Применение при ОИК 5-АСК приводит на 2-е сутки к снижению в крови количества лейкоцитов, моноцитов, лимфоцитов, палочкоядерных нейтрофилов и их поглощительной способности; активность и интенсивность спонтанного и индуцированного НСТ-теста не имеют значимых различий с группой животных с ОИК (табл. 1, 2). На 4-е сутки в крови отмечено уменьшение общего количества лейкоцитов, лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов, снижение поглощительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов (табл. 1, 2). На 6-е сутки в крови наблюдается снижение общего количества лейкоцитов (лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов), снижение поглощительной способности и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови (табл. 1, 2). Концентрация IL-17 в области повреждения снижается на 4-е сутки ($10,32 \pm 0,35$ пг/мл; $p < 0,01$) и 6-е сутки ($7,25 \pm 0,71$ пг/мл; $p < 0,01$).

При сравнительном анализе эффектов озона и 5-АСК при ОИК установлено, что в условиях применения O_3 в отличие от применения 5-АСК на 2-е сутки в крови больше общее количество лейкоцитов (преимущественно сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов), выше активность и интенсивность фагоцитоза; на 4-е сутки в крови больше общее количество лейкоцитов (преимущественно нейтрофилов), меньше интенсивность фагоцитоза, выше концентрация IL-17 в области повреждения толстой кишки; на 6-е сутки выше концентрация IL-17 в области повреждения (табл. 1, 2).

Полагаем, что применение озона в составе ОКС при ОИК и поступление с током крови озона в область повреждения в толстой кишке

изменяет редокс-статус и уменьшает площадь и интенсивность альтерации, что приводит к снижению миграции нейтрофилов и моноцитов в области повреждения, рекрутинга активированных нейтрофилов, моноцитов/макрофагов. В результате снижается синтез и секреция медиаторов воспаления, в том числе IL-17, а также IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-23 и, как следствие, снижается выраженность ответа острой фазы и системных воспалительных изменений в виде увеличения в крови количества моноцитов, нейтрофилов а также их поглотительной способности и НСТ-редуцирующей. Известно, что озон и его дериваты через изменение активности транскрипционного фактора NRF2 увеличивают синтез ферментов антиокислительной защиты [10, 12, 13].

Выводы

1. При оксазолон-индуцированном колите на 2-е, 4-е и 6-е сутки эксперимента в крови растет количество лимфоцитов, моноцитов, количе-

ство нейтрофилов и их поглотительная и НСТ-редуцирующая активность, растет концентрация IL-17 в области повреждения толстой кишки.

2. Внутривентриальное применение озона в дозе 0,05 мг/кг каждые 24 ч при оксазолон-индуцированном колите приводит на 2-е и 6-е сутки к снижению в крови количества лимфоцитов, нейтрофилов и их поглотительной способности на 2-е и 4-е сутки, снижению НСТ-редуцирующей способности на 6-е сутки, снижению концентрации IL-17 в области повреждения толстой кишки на 4-е и 6-е сутки.

3. Эффекты применения при оксазолон-индуцированном колите озона по сравнению с эффектами применения 50 мг 5-АСК в составе ректальных суппозиторий каждые 12 ч менее выражены в отношении уменьшения количества в крови нейтрофилов, моноцитов на 2-е и 4-е сутки, поглотительной активности нейтрофилов крови на 2-е сутки, концентрации IL-17 в области повреждения толстой кишки на 4-е и 6-е сутки наблюдения.

Список литературы / References

1. Осиков М.В., Симонян Е.В., Бакеева А.Е., Огнева О.И. Иммуотропные эффекты куркумина в составе оригинальных ректальных суппозиторий при экспериментальной болезни Крона // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 483-496. [Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E., Ogneva O.I. Immunotropic effects of curcumin in the composition of original rectal suppositories in experimental Crohn's disease. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 3. pp. 483-496. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IEO-1875.
2. Осиков М.В., Симонян Е.В., Бакеева А.Е., Астахова Л.В. Морфологические аспекты протекторного действия оригинальных ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы при экспериментальной болезни Крона // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2021. Т. 65, № 2. С. 67-77. [Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E., Astakhova L.V. Morphological aspects of the protective effect of the original rectal suppositories with turmeric extract in experimental Crohn's disease. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy*, 2021, Vol. 65, no. 2, pp. 67-77. (In Russ.)]
3. Осиков М.В., Бойко М.С., Симонян Е.В., Ушакова В.А. Иммуотропные эффекты витамина D3 в составе оригинальных ректальных суппозиторий при экспериментальном язвенном колите / М.В. Осиков, // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 497-508. [Osikov M.V., Boyko M.S., Simonyan E.V., Ushakova V.A. Immunotropic effects of vitamin D3 in the composition of original rectal suppositories in experimental ulcerative colitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 497-508. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IEO-2176.
4. Пат. 2740060 РФ. Лекарственная форма для лечения и профилактики язвенного колита, содержащая пегилированную липосомальную форму эритропоэтина в форме суппозиторий, обладающая противовоспалительными и иммуномодулирующим действием / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, И.Р. Галева. Прим. 14.02.2020. [Pat. 2740060 RF. A dosage form for the treatment and prevention of ulcerative colitis containing a pegylated liposomal form of erythropoietin in the form of suppositories with anti-inflammatory and immunomodulatory effects / M.V. Osikov, E.V. Simonyan, I.R. Galeeva. Approx. 14.02.2020].
5. Fitzpatrick E., Holland O.J., Vanderlelie J.J. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. *Int. Wound J.*, 2018, Vol. 15, no. 4, pp. 633-644.
6. Kiesler P., Fuss I.J., Strober W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 2015. Vol. 1, no. 2, pp. 154-170.
7. Manoto S.L., Maera M.J., Motaung S.K. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. *Saudi J. Biol. Sci.*, 2018, Vol. 25, no. 4, pp. 672-679.

8. Na Y.R., Stakenborg M., Seok S.H., Matteoli G. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2019, Vol. 16, no. 9, pp. 531-543.
9. Osikov M.V., Boyko M.S., Fedosov A.A., Ilyinykh M.A. Effectiveness of experimental colitis therapy with original vitamin D3 rectal suppositories. *Int. J. Biomed.*, 2022, Vol. 12, no. 1, pp. 124-133.
10. Swanson K.V., Deng M., Ting J.P.Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.*, 2019, Vol. 19, no. 8, pp. 477-489.
11. Weisshof R., El Jurdi K., Zmeter N., Rubin D.T. Emerging therapies for inflammatory bowel disease. *Adv. Ther.*, 2018, Vol. 35, no. 11, pp. 1746-1762.
12. Wang Z., Zhang A., Meng W., Wang T., Li D., Liu Z., Liu H. Ozone protects the rat lung from ischemia-reperfusion injury by attenuating NLRP3-mediated inflammation, enhancing Nrf2 antioxidant activity and inhibiting apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.*, 2018, Vol. 835, pp. 82-93.
13. Yu G., Bai Z., Chen Z., Chen H., Wang G., Wang G., Liu Z. The NLRP3 inflammasome is a potential target of ozone therapy aiming to ease chronic renal inflammation in chronic kidney disease. *Int. Immunopharmacol.*, 2017, Vol. 43, pp. 203-209.

Авторы:

Осиков М.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; руководитель отдела научной работы ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Кайгородцева Н.В. — ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии № 3 ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

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

Kaigorodtseva N.V., Assistant Professor, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University; Anesthesiologist-Resuscitator, Resuscitation and Intensive Care Unit No. 3, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

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

Boyko M.S., Assistant Professor, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Федосов А.А. — к.м.н., доцент, доцент кафедры анатомии человека лечебного факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ; доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Fedosov A.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, N. Pirogov Russian National Research Medical University; Associate Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 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

ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К SARS-CoV-2 ПРИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ COVID-19 И ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКЕ Гам-КОВИД-Вак

Плехова Н.Г., Ситдикова Т.А., Дубий А.А., Михайлов А.О.,
Просекова Е.В.

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

Резюме. Аберрантный иммунный ответ во время инфекции SARS-CoV-2, определяет клиническую картину, тяжесть заболевания и прогрессирование COVID-19. Цель исследования – дать оценку состояния SARS-CoV-2 специфического Т-клеточного ответа при вирусном заболевании COVID-19 и вакцинации Гам-КОВИД-Вак.

Представлена комплексная оценка иммунного ответа со сравнительной характеристикой диагностической информативности определения антител к RBD-домену Spike-белка SARS-CoV-2 и специфических эффекторных CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов к антигенам SARS-CoV-2 у невакцинированных, вакцинированных препаратом Гам-КОВИД-Вак здоровых лиц и пациентов, перенесших инфекцию COVID-19.

Установлено, что антитела IgG к RBD-домену спайк-белка SARS-CoV-2 вырабатываются с частотой от 73% до 92% случаев у вакцинированных и переболевших COVID-19. Количество эффекторных CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, отвечающих на стимуляцию антигенами SARS-CoV-2 продукцией цитокина IFN γ , варьировало в зависимости от внесенного антигена, и имело тенденцию к более высоким значениям у вакцинированных лиц. У не вакцинированных и не болевших COVID-19 здоровых лиц, контактировавших с инфицированными пациентами обнаружен Т-клеточный ответ к нуклеопротеинам коронавируса SARS-CoV-2.

Для адекватной оценки противовирусного и поствакцинального иммунного ответа к COVID-19 необходимо исследование не только гуморального звена по наличию антител, но и определение функционально активных специфических Т-лимфоцитов к антигенам белков SARS-CoV-2.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, COVID-19, антигены SARS-CoV-2, вакцинация

Адрес для переписки:

Плехова Наталья Геннадьевна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.
Тел./факс: 8 (423) 242-97-78.
E-mail: pl_nat@hotmail.com

Address for correspondence:

Plekhova Natalya G.
Pacific State Medical University
690002, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakov ave., 2.
Phone/fax: 7 (423) 242-97-78.
E-mail: pl_nat@hotmail.com

Образец цитирования:

Н.Г. Плехова, Т.А. Ситдикова, А.А. Дубий,
А.О. Михайлов, Е.В. Просекова «Оценка
специфического Т-клеточного иммунного ответа
к SARS-CoV-2 при коронавирусной инфекции
COVID-19 и вакцинопрофилактике Гам-КОВИД-Вак»
// Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 3. С. 267-274. doi: 10.46235/1028-7221-1111-EOS
© Плехова Н.Г. и соавт., 2022

For citation:

N.G. Plekhova, T.A. Sitdikova, A.A. Dubiy, A.O. Mikhailov,
E.V. Prosekova "Evaluation of specific T cell immune
response to SARS-CoV-2 in COVID-19 infection and following
Gam-COVID-Vac vaccine prophylaxis", Russian Journal of
Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,
Vol. 25, no. 3, pp. 267-274.
doi: 10.46235/1028-7221-1111-EOS
DOI: 10.46235/1028-7221-1111-EOS

EVALUATION OF SPECIFIC T CELL IMMUNE RESPONSE TO SARS-CoV-2 IN COVID-19 INFECTION AND FOLLOWING Gam-COVID-Vac VACCINE PROPHYLAXIS

Plekhova N.G., Sitdikova T.A., Dubiy A.A., Mikhailov A.O., Prosekova E.V.

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. An aberrant immune response during SARS-CoV-2 infection has been shown to determine the clinical features, disease severity, and progression of COVID-19 infection. This work aimed for comprehensive assessment of the immune response by comparative evaluation of diagnostic significance of the antibodies to RBD domain of the SARS-CoV-2 spike protein, as well as detection of effector CD4⁺ and CD8⁺T cells specific to SARS-CoV-2 antigens. The study was performed in unvaccinated persons, healthy individuals vaccinated with Gam-COVID-Vac, and in the patients who have had COVID-19 infection. We have found that IgG antibodies to the RBD domain of the SARS-CoV-2 spike protein are detectable at a frequency of 73% to 92% of cases in vaccinated persons and COVID-19 convalescents. The numbers of effector CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes responding to stimulation with SARS-CoV-2 antigens by producing the IFN γ cytokine varied depending on the introduced antigen and tended to be higher in vaccinated individuals. In non-vaccinated healthy persons who contacted with COVID-19 patients, T cell response to the SARS-CoV-2 nucleoproteins was revealed. For adequate assessment of antiviral and post-vaccination immune response to COVID-19, it would be necessary to study not only humoral immune response by the presence of antibodies, but also functionally active specific T lymphocytes directed for SARS-CoV-2 protein antigens.

Keywords: T lymphocytes, COVID-19, SARS-CoV-2, antigens, vaccination

Введение

Адаптивный иммунитет к SARS-CoV-2 возникает в течение 7-10 дней после заражения с одновременной активацией Т-клеток. Антитела, продуцируемые В-клетками, особенно нейтрализующие, при высоком титре создают иммунитет для предотвращения повторного заражения SARS-CoV-2, тогда как Т-клетки могут оказывать влияние на тяжесть заболевания, сокращая его продолжительность и способствуя быстрому выздоровлению пациентов. Количество специфических для SARS-CoV-2 CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток памяти достигает максимума через 14 дней после инфицирования и выявляется на протяжении более от трех до шести месяцев [7]. Известно небольшое количество работ, подтверждающих четкую корреляцию между иммунным ответом Т-клеток и тяжестью течения заболевания COVID-19. Тем не менее продолжающееся появление новых вариантов коронавируса с высокой способностью ускользать от антител подчеркивает необходимость более глубокого понимания защитной роли Т-клеток с привлечением более совершенных методов для оценки их активности в более широкой популяции, а также выявления обследуемых лиц, у которых пул специфических

Т-клеток памяти сформирован в недостаточной мере.

Показано появление в острый период инфекции COVID19 в крови пациентов субпопуляций ICOS⁺PD-1⁺CD4⁺Т-фолликулярных хелперных клеток (Tfh), а также активированных CD38⁺HLA-DR⁺CD4⁺ и CD38⁺HLA-DR⁺CD8⁺Т-клеток, уровень которых сохраняется до периода выздоровления, что указывает на участие этих лимфоцитов в разрешении от заболевания [1]. Ранее для определения специфичных для SARS-CoV-2 Т-клеток в качестве стимулятора мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) пациентов с COVID-19 использовали «мегапулы» пептида SARS-CoV-2, который связывается с общими аллелями HLA-I и HLA-II12 [2]. Активация CD8⁺Т-клеток белком SARS-CoV-2 была определена по степени экспрессии рецепторов CD69, CD137, а для CD4⁺Т-лимфоцитов по OX40⁺ и CD137⁺. Такие SARS-CoV-2 реактивные Т-клетки были обнаружены у 70% пациентов с COVID-19 в острой форме и у 100% в период выздоровления [4, 11]. Кроме того, стимуляция *in vitro* МКПК пациентов с COVID-19 перекрывающимися пептидами SARS-CoV-2 приводит к клональной экспансии специфичных для SARS-CoV-2 CD8⁺ и CD4⁺Т-клеток, продуцирующих цитокины IFN γ и TNF α [6]. Причем такие реак-

тивные Т-клетки были обнаружены у > 20% обследованных, не инфицированных SARS-CoV-2, что предполагает некоторый уровень перекрестной реактивности с Т-клетками, индуцированных ранее циркулировавшими коронавирусами, вызывающими простуду HCoV-OC43, HCoV229E, HCoV-NL63, HCoV-NKU116 или другими патогенами [11]. Также показано, что среди лиц, которые встречались с SARS-CoV-2 (от тяжело больных до «бессимптомных» и членов семей больных COVID-19), антитела класса G обнаруживались только у 60%, тогда как специфические Т-клетки выявлялись в 93% случаев. Эти данные указывают на важность выявления SARS-CoV-2 специфических Т-клеток в качестве показателя долгосрочной иммунной защиты при заболевании COVID-19, тогда как серологическое тестирование не отражает разнообразие и полноту иммунных реакций на SARS-CoV-2 [8].

Цель исследования – дать оценку состояния SARS-CoV-2 специфического Т-клеточного ответа при вирусном заболевании COVID-19 и вакцинации Гам-КОВИД-Вак.

Материалы и методы

Оценка специфических показателей адаптивного иммунитета проводилась у 75 человек (средний возраст $42,75 \pm 10,45$ лет) следующих групп: 1 – здоровые лица, не болевшие COVID-19 и не вакцинированные (5 человек); 2 – здоровые лица, вакцинированные Гам-КОВИД-Вак («Спутник V» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия, 10 человек); 3 – невакцинированные, заболевшие COVID-19, острый период (10 человек); 4 – вакцинированные лица, заболевшие COVID-19, острый период (10 человек); 5 – лица, заболевшие COVID-19, невакцинированные, период реабилитации (15 человек); 6 – лица, вакцинированные, заболевшие COVID-19, период реабилитации (25 человек). Оценку антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов «SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ» и «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Для выявления Т-лимфоцитов, специфически отвечающих на антигены вируса SARS-CoV-2, использовался набор Тигра-Тест® SARS-CoV-2 (АО «Генериум», Россия), версия иммуноферментного метода IGRA ELISpot (Interferon Gamma Release Assay, Enzyme-Linked SPOT analysis). Данная тест система предназначена для выявления Т-клеток в модели *in vitro*, где в качестве стимуляторов продукции клетками интерферона гамма (IFN γ) используются антигены вируса SARS-CoV-2. Для выделения лимфоцитов использовали метод седимен-

тации в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина. Клетки одного образца в концентрации $3,0 \times 10^6$ кл/мл в бессывороточной питательной среде AIM-V® AlbuMAX® (BSA) GIBCO™ (Инвитроген, США) последовательно разносили в четыре лунки планшета с иммобилизованными на их мембране моноклональными антителами к IFN γ . В качестве отрицательного контроля использовалась первая лунка, в которую не вносился индуктор цитокина, во второй содержался антиген 1 (Spike-белок SARS-CoV-2), в третьей – антиген 2 (пептиды белков N, M, ORF3a и ORF7a) и в четвертой – раствор позитивного контроля. После чего планшет с клетками инкубировали в течении 16-20 ч в термостате при температуре 37 °С и 5% содержании CO $_2$. После инкубации удаляли суспензию клеток, пятикратно отмывали мембраны фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) и вносили 50 мкл раствора антител к IFN γ , конъюгированных с щелочной фосфатазой. Оставляли при комнатной температуре на 40-50 мин, повторяли этапы отмывки от невключившегося продукта реакции и добавляли хромогенный субстрат для фермента нитросиний тетразолия хлорид на 7-10 мин до появления интенсивно окрашенных пятен в положительном контроле. Для остановки ферментативной реакции промывали лунки 4 раза дистиллированной водой. Подсчет количества спотов (пятен) на мембране лунки проводился с помощью микроскопа Levenhuk DTX (Россия). При правильной постановке теста в лунках с отрицательным контролем количество спотов не должно превышать 14. Критерий положительного результата теста по наличию спотов в лунках, куда были внесены антигены 1 и 2, при этом их число в лунках с антигенами (с учетом вычета числа спотов в отрицательном контроле) должно составлять более 12. Такой результат свидетельствовал, что образец содержит Т-клетки, специфически сенсibilизированные антигенами коронавируса SARS-CoV-2, при количестве спотов положительного контроля выше 100.

Полученные данные обрабатывали с помощью пакета программ Microsoft Excel 2018 (Microsoft Inc., США). Проверка на нормальное распределение количественных показателей выборок проводилась по критерию Шапиро–Уилка. При обработке данных использовались методы непараметрической статистики при коэффициенте вариации больше 30%. Deskриптивные статистики представлены как Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$), где Me – медиана, $Q_{0,25}$ – нижний и $Q_{0,75}$ – верхний квартили. Оценку различий средних значений в попарно несвязанных выборках проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Критическое значение уровня статистической

значимости (p) при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Продукция специфически активированными эффекторными $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитами цитокина $IFN\gamma$ в тесте IGRA ELISpot позволяет производить количественный учет клеток, отвечающих на стимуляцию антигенами SARS-CoV-2 (рис. 1). Определено наличие IgG к вирусу у двух здоровых лиц (40%), не болевших COVID-19 и не вакцинированных, но контактировавших с инфицированными пациентами. При стимуляции пептидами N, M, ORF3a и ORF7a (антиген 2) наличие продуцирующих $IFN\gamma$ Т-лимфоцитов установлено у всех обследованных лиц (100%), тогда как при внесении антигена 1 (Spike-белок SARS-CoV-2) такие клетки были обнаружены в меньшем количестве (60%, рис. 2А). У вакцинированных здоровых лиц, не имеющих в анамнезе перенесенной инфекции COVID-19, у трех человек (37,5%) определено наличие IgG-антител к RBD-домену Spike-белка SARS-CoV-2, эффекторных Т-лимфоцитов к нему у 90% и к пептидам N, M, ORF3a и ORF7a у 50%. В острый период инфекции у не вакцинированных лиц антитела IgG обнаружены у 80%, продуцирующие

$IFN\gamma$ Т-лимфоциты после контакта с антигеном 1 у 20% и с антигеном 2 у 30% (рис. 2В). У вакцинированных больных COVID-19 эти показатели составили 40%, 100% и 50% соответственно (рис. 2Г). В пятой группе у невакцинированных лиц, ранее перенесших COVID-19, наличие IgG-антител к RBD-домену Spike-белка SARS-CoV-2 определялось у 11 пациентов (73%), специфических Т-лимфоцитов к Spike-белку

(антиген 1) у 87,7%, к пептидам N, M, ORF3a и ORF7a у 100% (рис. 2Д). В шестой группе у вакцинированных лиц, перенесших COVID-19, наличие IgG-антител определялось у 23 пациентов (92%), специфических Т-лимфоцитов к антигену 1 у 84% к белкам N, M, ORF3a и ORF7a у 96% (рис. 2Е).

Таким образом, количество эффекторных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, отвечающих на стимуляцию антигенами SARS-CoV-2 продукцией цитокина $IFN\gamma$ в тесте IGRA ELISpot, варьировало и имело тенденцию к более высоким значениям у вакцинированных обследуемых. Медиана значений количества спотов для первой группы при стимуляции антигеном 1 составила 30,6 (6,0-62,0), антигеном 2 – 161,6 (109,0-156,0); для второй – 118,8 (11,0-302,0) и 51,5 (6,0-149,0); для третьей – 27,7 (8,0-104,0) и 53,2 (3,0-182,0); для четвертой – 112,5 (15,0-351,0) и 48,0 (3,0-206,0); для пятой – 50,0 (8,0-208,0) и 87,2 (18,0-250,0); для шестой – 69,6 (5,0-331,0) и 66,0 (6,0-187,0) соответственно. Причем, если у вакцинированных Гам-КОВИД-Вак количество эффекторных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов было высоким при стимуляции Spike-белком, то у невакцинированных и не болевших COVID-19 после контакта с белками N, M, ORF3a и ORF7a. В период ремиссии как после вакцинации, так и без нее, число таких клеток при стимуляции антигенами значимо не различалось ($p > 0,05$).

Нами показано, что антитела IgG к RBD-домену спайк-белка SARS-CoV-2 вырабатываются с частотой от 73% до 92% случаев у вакцинированных и переболевших COVID-19, что согласуется с данными других исследователей [5]. При сравнительной оценке клеточного иммуни-

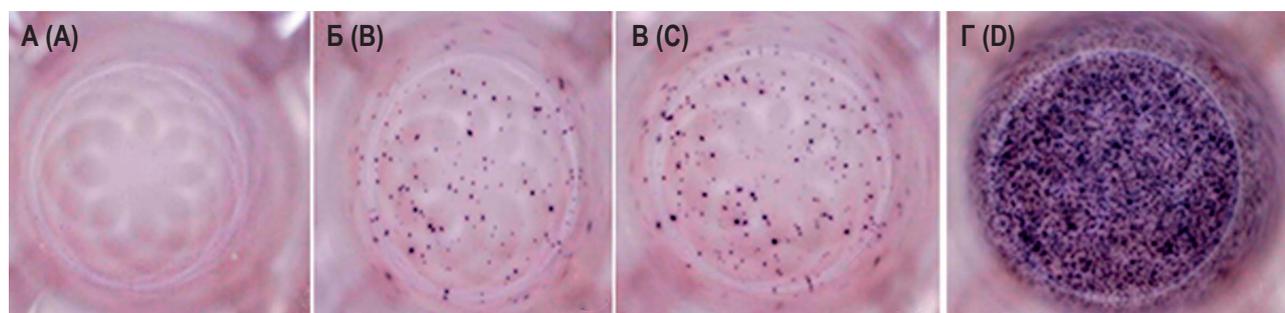


Рисунок 1. Результат положительного ТиграТест® SARS-CoV-2 анализа

Примечание. А – лунка отрицательного контроля. Б – лунка с позитивной реакцией Т-лимфоцитов на стимуляцию антигеном 1. В – лунка с позитивной реакцией Т-лимфоцитов на стимуляцию антигеном 2. Г – лунка с положительным контролем.

Figure 1. Result of a positive TigerTest® SARS-CoV-2 assay

Note. A, negative control well; B, well with a positive reaction of T lymphocytes to stimulation with antigen 1; C, well with a positive reaction of T lymphocytes to stimulation with antigen 2; D, well with a positive control.

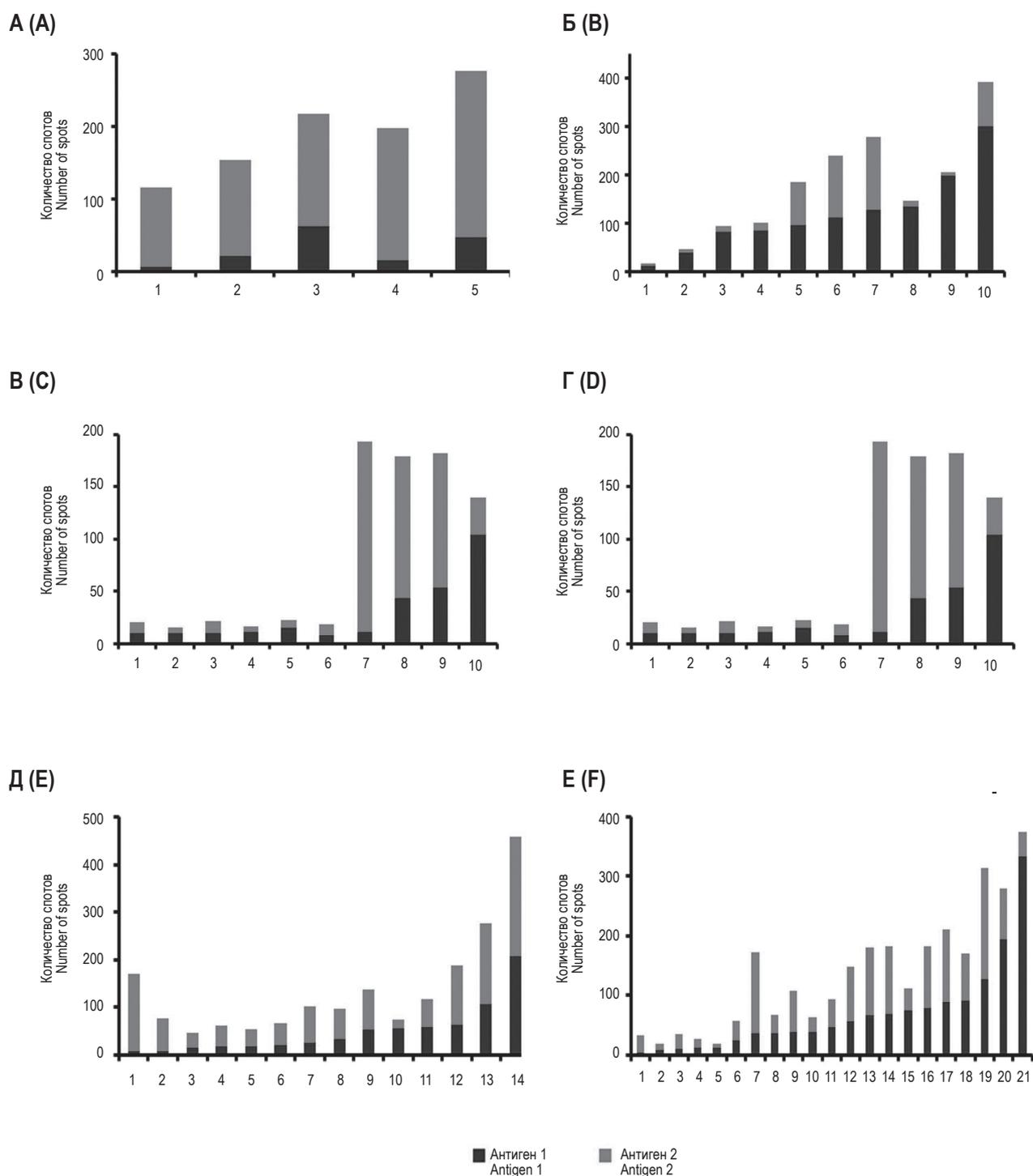


Рисунок 2. Показатели количества эффекторных CD4⁺ и CD8⁺ T-лимфоцитов по результатам Тигра-Тест® SARS-CoV-2 для здоровых лиц, невакцинированных и не болевших COVID-19 (А), вакцинированных Гам-КОВИД-Вак и не болевших COVID-19 (Б), невакцинированных, заболевших COVID-19 (В), вакцинированных, заболевших COVID-19 (Г), невакцинированных, заболевших COVID-19, период реабилитации (Д), вакцинированных, заболевших COVID-19, период реабилитации (Е)

Figure 2. Indicators of the number of effector CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes according to the results of the Tигра-Тест® SARSCoV-2 for healthy individuals not vaccinated and not infected by the COVID-19 (A), vaccinated with Gam-COVID-Vac and not infected by the COVID-19 (B), unvaccinated, infected by the COVID-19 (C), vaccinated, infected by the COVID-19 (D) unvaccinated, infected by the COVID-19, rehabilitation period (E), vaccinated, infected by the COVID-19, rehabilitation period (F)

тета среди лиц, кто так или иначе встречался с вирусом COVID-19, антитела класса G обнаружены от 37,5%, тогда как специфические Т-клетки к антигенам SARS-CoV-2 выявлялись в 93% случаев. Реактивность Т-клеток связана с легким исходом при многих инфекциях, так как они создают пулы долговременной памяти, которые преимущественно направлены на эпитопы антигенов, включающие консервативные пептиды. С этой позиции интерес представляют полученные нами данные о различиях в количестве эффекторных CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, продуцирующих цитокин IFN γ , в зависимости от внесенного антигена. Так, обнаружен Т-клеточный ответ к нуклеопротеинам коронавируса SARS-CoV-2 у невакцинированных и не болевших COVID-19 здоровых лиц. Длительная устойчивая перекрестная реактивность Т-клеток с такими вирусными антигенами SARS-CoV-2 у обследованных, не имевших в анамнезе SARS и COVID-19 и не контактировавших с людьми, у которых эти заболевания были показана и другими исследователями [2]. Инфицирование бета-коронавирусами индуцирует многоспецифический и длительный Т-клеточный иммунитет против общего структурного для них N-белка. Эти клетки имеют ключевое значение при низком уровне антител или появлении новых вариантов коронавирусов, их избегающих, которые могут распознавать. Как

указывает Sekine T. с соавт. [9], SARS-CoV-2 – специфические Т-клетки критически важны для долгосрочной иммунной защиты от COVID-19, и одного только серологического исследования может быть недостаточно для комплексной оценки иммунной защиты от SARS-CoV-2 [5, 9, 10], что и было подтверждено нашими исследованиями.

Заключение

Идентификация специфических иммунных сигналов предоставляет информацию, детализирующую физиологический иммунный ответ и иммунопатогенез заболевания, что позволяет индивидуализировать профилактические и терапевтические программы. Для адекватной оценки противовирусного и поствакцинального иммунного ответа к COVID-19 необходимо исследование не только гуморального звена по наличию антител, но и определение функционально активных специфических Т-лимфоцитов к антигенам белков SARS-CoV-2. Наличие в вакцине Гам-КОВИД-Вак в качестве антигенной детерминанты Spike-белок позволяет рекомендовать для оценки напряженности поствакцинального иммунитета определение функционально активных Т-лимфоцитов, специфически отвечающих на антигены вируса SARS-CoV-2 с применением технологий IGRA ELISpot.

Список литературы / References

1. Потеряев Д.А., Аббасова С.Г., Игнатьева П.Е., Стрижакова О.М., Колесник С.В., Хамитов Р.А. Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест[®] SARS-CoV-2 // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2021. Т. 21, № 3. С. 178-192. [Poteryaev D.A., Abbasova S.G., Ignatyeva P.E., Strizhakova O.M., Kolesnik S.V., Khamitov R.A. Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects, using TigraTest[®] SARS-CoV-2 ELISPOT kit. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2021, Vol. 21, no. 3, pp. 178-192. (In Russ.)]
2. Bastos M.L., Tavaziva G., Abidi S.K., Campbell J.R., Haraoui L.P., Johnston J.C., Lan Z., Law S., MacLean E., Trajman A., Menzies D., Benedetti A., Ahmad K.F. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2020, Vol. 370, m2516. doi: 10.1136/bmj.m2516.
3. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G., Yuan Z., Feng Z., Zhang Y., Wu Y., Chen Y. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827.
4. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jadi R.S., Marrama D., de Silva A.M., Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S., Sette A. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*, 2020, 181, pp. 1489-1501.e15.
5. Gudbjartsson D.F., Norddahl G.L., Melsted P., Gunnarsdottir K., Holm H., Eythorsson E., Arnthorsson A.O., Helgason D., Bjarnadottir K., Ingvarsson R.F., Thorsteinsdottir B., Kristjansdottir S., Birgisdottir K., Kristinsdottir A.M., Sigurdsson M.I., Arnadottir G.A., Ivarsdottir E.V., Andresdottir M., Jonsson F., Agustsdottir A.B., Stefansson K. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 383, no. 18, pp. 1724-1734.
6. Habel J.R., Nguyen T.H.O., van de Sandt C.E., Juno J.A., Chaurasia P., Wragg K., Koutsakos M., Hensen L., Jia X., Chua B., Zhang W., Tan H.X., Flanagan K.L., Doolan D.L., Torresi J., Chen W., Wakim L.M., Cheng A.C., Doherty P.C., Petersen J., Kedzierska K. Suboptimal SARS-CoV-2-specific CD8⁺ T cell response associated with the prominent HLA-A*02:01 phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, Vol. 117, pp. 24384-24391.

7. Kedzierska K., Thomas P.G. Count on us: T cells in SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell Rep. Med.*, 2022, Vol. 3, no. 3, 100562. doi: 10.1016/j.xcrm.2022.100562.
8. Le Bert N., Tan A.T., Kunasegaran K., Tham C., Hafezi M., Chia A., Chng M., Lin M., Tan N., Linster M., Chia W.N., Chen M.I., Wang L.F., Ooi E.E., Kalimuddin S., Tambyah P.A., Low J.G., Tan Y.J., Bertoletti A. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*, 2020, Vol. 584, no. 7821, pp. 457-462.
9. 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., Sönnernborg A., 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.
10. Thevarajan, I., Nguyen, T.H.O., Koutsakos, M., Druce, J., Caly, L., van de Sandt, C.E., Jia, X., Nicholson, S., Catton, M., Cowie, B., Tong S.Y.C., Lewin S.R., Kedzierska K. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, pp. 453-455.
11. Weiskopf D., Schmitz K.S., Raadsen M.P., Grifoni A., Okba N.M.A., Endeman H., van den Akker J.P.C., Molenkamp R., Koopmans M.P.G., van Gorp E.C.M., Haagmans B.L., de Swart R.L., Sette A., de Vries R.D. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci. Immunol.*, 2020, 5, eabd2071. doi: 10.1126/sciimmunol.abd2071.

Авторы:

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

Ситдикова Т.А. — к.м.н., преподаватель кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Authors:

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

Sitdikova T.A., PhD (Medicine), Lecturer, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Дубий А.А. — студент, факультет общественного здоровья ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Михайлов А.О. — к.м.н., научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

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

Dubiy A.A., Student, Faculty of Public Health, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Mikhailov A.O., PhD (Medicine), Research Associate, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

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

Поступила 13.05.2022
Принята к печати 28.05.2022

Received 13.05.2022
Accepted 28.05.2022

СОПРЯЖЕННОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ И СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Просекова Е.В., Долгополов М.С., Турянская А.И., Сабыныч В.А.

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

Резюме. Исследование генов, контролирующей активность цитокинов, одна из важных задач в выявлении предрасположенности и раскрытии патогенетических звеньев инициации, течения заболеваний. При аллергической бронхиальной астме у детей среди патогенетических механизмов определяющее значение имеют генетические предикторы, ассоциированные с дифференцировкой и функционированием Т-хелперов, aberrантной продукцией цитокинов и дисрегуляцией иммунного ответа. Цель – оценка сопряженности полиморфных генотипов и содержания в сыворотке крови цитокинов различных профилей Т-хелперов у детей с аллергической бронхиальной астмой.

Обследовано 175 детей в возрасте от 3 до 11 лет, из них 75 с верифицированным диагнозом аллергической бронхиальной астмы (АБА) и 100 сопоставимых по полу здоровых сверстников. Всем детям проведено общеклиническое и аллергологическое обследование. В сыворотке крови иммуноферментным методом определяли содержание цитокинов Th1-, Th2- и Th17-профилей. Образцы ДНК, выделенные из периферической венозной крови, использовали материалом для молекулярно-генетического анализа. С помощью метода аллель-специфичной полимеразной цепной реакции исследовали следующие точки мутаций: IFN γ (T-874 A), IL-4 (C-589 T), IL-6 (C-174 G), IL-17A (G-197 A), TNF α (G-308 A). Проводили анализ структуры и встречаемости полиморфизмов генов цитокинов и рассчитывали коэффициент отношения шансов риска болезни. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программы Statistica 10 методами описательной, параметрической и непараметрической статистики, сравнения несвязанных групп по качественным признакам при равновесии Харди–Вайнберга с критерием Хи-квадрат (χ^2).

Проведенные исследования выявили различия в структуре и встречаемости полиморфных генотипов, сопряженных с aberrантной продукцией, цитокинов различных Th-профилей среди детей с аллергической бронхиальной астмой. Сравнительный анализ частот мутантных аллелей и генотипов цитокинов различных Th-профилей с определением их содержания в сыворотке крови детей, с аллергической бронхиальной астмой, выявил преобладание гомозиготных генотипов IFN γ A874A, IL-4 T589T, IL-6 G174G, IL-17A A197A, TNF α A308A. Исследования полиморфизмов генов, особенностей продукции и содержания цитокинов Т-хелперов-1, Т-хелперов-2, Т-хелперов-17 профилей при бронхиальной астме у детей выявили различия в структуре и встречаемости мутантных аллелей, ассо-

Адрес для переписки:

Просекова Елена Викторовна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
690066, Россия, г. Владивосток, пр. Красного знамени,
162д, кв. 68.
Тел.: 8 (924) 237-55-08.
E-mail: gades.med@mail.ru

Address for correspondence:

Prosekova Elena V.
Pacific State Medical University
690066, Russian Federation, Vladivostok,
Krasnogo znamenii ave., 162d, apt 68.
Phone: 7 (924) 237-55-08.
E-mail: gades.med@mail.ru

Образец цитирования:

Е.В. Просекова, М.С. Долгополов, А.И. Турянская, В.А. Сабыныч «Сопряженность полиморфизмов генов и содержания цитокинов в сыворотке крови у детей с аллергической бронхиальной астмой» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 275–282. doi: 10.46235/1028-7221-1115-AOG

© Просекова Е.В. и соавт., 2022

For citation:

E.V. Prosekova, M.S. Dolgoplov, A.I. Turyanskaya, V.A. Sabynych “Association of gene polymorphism and cytokine content in the blood serum in children with allergic bronchial asthma”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 275–282. doi: 10.46235/1028-7221-1115-AOG

DOI: 10.46235/1028-7221-1115-AOG

цирированных с aberrантной продукцией цитокина, вариативностью риска развития аллергопатологии и реализации определенного фенотипа болезни.

Ключевые слова: генотипы, цитокины, аллергическая бронхиальная астма, дети, полиморфизм генов, предикторы

ASSOCIATION OF GENE POLYMORPHISM AND CYTOKINE CONTENT IN THE BLOOD SERUM IN CHILDREN WITH ALLERGIC BRONCHIAL ASTHMA

Prosekova E.V., Dolgoplov M.S., Turyanskaya A.I., Sabynych V.A.

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. The study of genes controlling cytokine activities of is among important tasks when assessing predisposition and revealing pathogenetic links of initiation and course of clinical disorders. Aberrant production of cytokines and dysregulation of immune response may be considered genetic predictors associated with differentiation and functioning of T helpers, being of decisive importance in pathogenesis of pediatric allergic bronchial asthma. Our objective was to evaluation of associations between polymorphic genotypes and serum levels of cytokines of various T helper profiles in the children with allergic bronchial asthma.

We have observed 175 children aged 3 to 11 years. Of them, we have examined 75 patients diagnosed with allergic bronchial asthma (ABA) as well as 100 healthy children matched for age and gender. All children underwent general clinical and allergological examination. The contents of cytokines attributed to Th1, Th2 and Th17 profiles were determined in blood serum by means of ELISA technique. DNA samples isolated from peripheral venous blood were used for molecular genetic analysis. Using allele-specific PCR technique, the following mutation points were investigated: IFN γ (T-874 A), IL-4 (C-589 T), IL-6 (C-174 G), IL-17A (G-197 A), TNF α (G-308 A). The analysis of distribution and occurrence of the cytokine gene polymorphisms was carried out, and the odds ratio of the disease risk were calculated. Statistical data processing was carried out using the program “Statistica 10” by methods of descriptive, parametric and non-parametric statistics, comparison of unrelated groups was performed by qualitative characteristics of Hardy–Weinberg equilibrium, and with Chi-square test (χ^2).

These studies have revealed differences in patterns and occurrence of polymorphic genotypes associated with aberrant production of cytokines typical for various Th profiles among the children with allergic bronchial asthma. A comparative analysis of the mutant allele frequencies and cytokine genotypes of various Th profiles, along with determination of the cytokine contents in blood serum of children with allergic bronchial asthma revealed a predominance of homozygous IFN γ 874A, IL-4 589T, IL-6 174G, IL-17A 197A, and TNF α 308A genotypes. Studies of gene polymorphisms, features of production and content of the cytokines specific for T helpers 1, T helpers 2, T helpers 17 profiles in bronchial asthma in the children revealed differences in distribution and occurrence of mutant alleles associated with aberrant cytokine production, variable risk of developing allergic pathology and development of the distinct disease phenotype.

Keywords: genotypes, cytokines, allergic bronchial asthma, children, gene polymorphism, predictors

Введение

В мире наблюдается неуклонный рост распространенности и ранней реализации аллергических заболеваний, что определяет их в группу социально значимых заболеваний. По данным международных и национальных согласительных документов в настоящее время более 360 млн человек страдают аллергическими заболеваниями,

из них 14% дети [3, 7, 9]. В патогенезе аллергических заболеваний определяющая роль принадлежит комплексу иммунопатологических механизмов, включающих избыточную продукцию антител и пролиферацию сенсibilизированных Т-лимфоцитов, сопровождающихся развитием воспаления с повреждением собственных тканей. На формирование типа иммунного ответа влияет большой спектр факторов, включая ге-

нетическую предрасположенность, нарушение регуляции и синтеза цитокинов [1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10]. Бронхиальная астма относится к многофакторным воспалительным заболеваниям, имеет сложную этиологию, зависящую от множества генетических факторов, контроль которого требует понимания различных механизмов иммунопатогенеза [3, 8, 11, 12, 13, 14]. Мутации в генах цитокинов, определяющие дефекты продукции и рецепции отдельных цитокинов, составляют значительную часть иммуноопосредованных механизмов развития и прогрессирования патологических процессов при аллергических заболеваниях [1]. Индукция выработки цитокинов антигеном и локальная концентрация метаболитов в лимфоидной ткани определяет дифференцировку Т-хелперов по пути Th1, Th2, Th17. Одним из механизмов, определяющих вариабельность продукции цитокинов, является наличие однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с изменением синтеза биохимических продуктов при различных аллергических заболеваниях [5, 7, 13, 14].

Исследование генов, контролирующих активность цитокинов, важная задача в выявлении предрасположенности и раскрытии патогенетических звеньев инициации, течения заболеваний. Поиск генетических предикторов аллергической бронхиальной астмы занимает важное место среди актуальных задач медицины и направлений научных исследований. Анализ генетических предикторов реализации аллергической бронхиальной астмы, предрасположенности к IgE-опосредованному ответу на антигены и дисрегуляции иммунного ответа позволит прогнозировать фенотипические особенности течения и терапии заболевания. Приведенные обстоятельства определили актуальность цели и задач настоящего исследования.

Цель – оценка сопряженности полиморфных генотипов и содержания в сыворотке крови цитокинов различных профилей Т-хелперов у детей с аллергической бронхиальной астмой.

Материалы и методы

Контингент исследования составили 175 детей в возрасте от трех до одиннадцати лет, в том числе 75 с верифицированным диагнозом аллергической бронхиальной астмы и 100 сопоставимых по полу здоровых сверстников. Верификация диагноза выполнена в соответствии с национальной программой «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика», международным

согласительным документом «Global strategy for asthma management and prevention» [10]. При верификации диагноза учитывали наследственный анамнез и анамнез заболевания, проводили аллергологическое обследование (скарификационные пробы, определение общего и специфического IgE к бытовым, эпидермальным, пыльцевым аллергенам в сыворотке крови). Дети с аллергической бронхиальной астмой наблюдались в Городском аллерго-респираторном центре, здоровые сверстники обследованы в Центре Здоровья для детей и взрослых КГБУЗ «Владивостокский клиничко-диагностический центр», главный врач А.А. Кабиева. Наличие АБА и письменного согласия родителей обосновывали включение ребенка в группу исследования. В работе соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации и Правилами клинической практики в Российской Федерации и Приказ Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Дизайн исследования одобрен Междисциплинарным комитетом по этике ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, информационные согласия подписаны.

При молекулярно-генетическом анализе материалом служили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической венозной крови наборами Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США). Для исследования однонуклеотидных полиморфизмов генов цитокинов применяли метод полимеразной цепной реакции с генотипированием полиморфизмов. Амплификацию проводили, используя стандартные наборы праймеров научно-производственной фирмы «Литех» – SNP (Москва). Визуализацию продуктов амплификации выполняли с помощью электрофореза в окрашенном бромистым этидием агарозном геле. Фотофиксацию проводили с помощью системы гель-документирования VersaDoc Model 4000 (Bio-Rad, США). В исследовании выбраны следующие точки мутаций: интерферона гамма (IFN γ) – T-874 A, интерлейкина-4 (IL-4) – C-589 T, интерлейкина-6 (IL-6) – C-174 G, интерлейкина-17A (IL-17A) – G-197 A, фактора некроза опухолей альфа (TNF α) – G-308A.

Содержание интерлейкинов (IL-4, IL-6, IL-17A), цитокинов (TNF α , IFN γ) в сыворотке крови определяли иммуноферментным твердофазным методом с использованием реактивов ООО «Компания Алкор Био» (г. Санкт-Петербург), Bender Medsystems GmbH (Австрия) и АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) в соответствии с инструкцией

фирмы-производителя. Результаты представлены в пикограммах в миллилитре (пг/мл).

Анализировали полученные результаты, используя методы описательной статистики и программы Statistica 10, с подсчетом: коэффициента отношения шансов (OR), доверительного интервала (CI), коэффициента достоверности показателя и различий (p) с критическим уровнем значимости $p < 0,05$. Объем выполненных исследований позволил оценить результаты с достоверностью 95-99%. При обработке цифровых данных применяли методы сравнение несвязанных групп по качественным признакам, проводили оценку соответствия распределений генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга и в сравнении распределений частот генотипов и аллелей в двух субпопуляциях использовали критерий Хи-квадрат (χ^2).

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования у детей с АБА в сравнении с данными здоровых сверстников выявили различия в структуре и встречаемости полиморфных генотипов цитокинов различных Th-профилей. Частоты генотипов по каждому исследованному гену были протестированы на

отсутствие различий в генотипах у здоровых детей и детей с АБА с расчетом критерия χ^2 . Оценка встречаемости генетических полиморфизмов генов цитокинов у детей с аллергической бронхиальной астмой выявила высокую распространенность гомозиготных генотипов цитокинов профиля Th1 – $IFN\gamma$ A874A, и гомозиготных генотипов цитокинов Th2 и Th17, IL-4 T589T, IL-6 C174G, IL-17A G197A, $TNF\alpha$ G308A (табл. 1).

Анализ структуры и встречаемости полиморфизмов промоторной части генов IL-4, IL-6, IL-17A, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ показал наличие и значимость корреляционной зависимости аллельных вариантов генов и продукции соответствующих цитокинов.

Рядом авторов предложен механизм, опосредующий реализацию факторов риска с развитием аллергического заболевания через aberrантную продукцию цитокинов различных Th1/Th2/Th17 профилей и генетическое регулирование, связанное с выраженностью иммунного ответа на антигенное воздействие [1, 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14].

Характеристики взаимосвязи генотипа и уровня в сыворотке крови цитокинов с высокой патогенетической значимостью при реализации аллергического воспаления в органах дыхания определили наиболее высокое содержание цито-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И ЗДОРОВЫХ СВЕРСТНИКОВ

TABLE 1. CHARACTERIZATION OF CYTOKINE GENE POLYMORPHISMS IN CHILDREN WITH ALLERGIC BRONCHIAL ASTHMA AND HEALTHY PEERS

Цитокин / полиморфизм Cytokine / polymorphism	Генотипы Genotypes	Группы наблюдения Observation groups	
		Здоровые дети Healthy children (n = 100)	Дети с АБА Children with ABA (n = 75)
$IFN\gamma$ 874T/A	ТТ	32 (32,00%)	8 (10,70%)
	ТА	56 (56,00%)	39 (52,00%)
	АА	12 (12,00%)	28 (37,33%)
Частота встречаемости аллеля Allele frequency	Т	120 (60,00%)	55 (37,00%)
	А	80 (40,00%)	95 (63,00%)
OR (CI 95%)		2,59 (1,67-4,00)	
Критерий χ^2 Criterion χ^2		18,66; $p < 0,01$	
IL-4 589C/T	СС	75 (75,00%)	12 (16,70%)
	СТ	20 (20,00%)	40 (53,30%)
	ТТ	5 (5,00%)	23 (30,00%)
Частота встречаемости аллеля Allele frequency	С	170 (85,00%)	64 (42,70%)
	Т	30 (15,00%)	86 (57,30%)

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Цитокин / полиморфизм Cytokine / polymorphism	Генотипы Genotypes	Группы наблюдения Observation groups	
		Здоровые дети Healthy children (n = 100)	Дети с АБА Children with ABA (n = 75)
OR (CI 95%)	19,30 (11,23-33,31)		
Критерий χ^2 Criterion χ^2	56,97; p < 0,001		
IL-6 174 G/C	CC	33 (33,00%)	7 (9,33%)
	CG	60 (60,00%)	44 (58,67%)
	GG	7 (7,00%)	24 (32,00%)
Частота встречаемости аллеля Allele frequency	C	126 (63,00%)	58 (54,00%)
	G	74 (37,00%)	92 (46,00%)
OR (CI 95%)	2,71 (1,73-4,18)		
Критерий χ^2 Criterion χ^2	20,34; p < 0,001		
IL-17A 197 G/A	GG	34 (34,00%)	5 (6,70%)
	GA	56 (56,00%)	40 (53,30%)
	AA	10 (10,00%)	30 (40,00%)
Частота встречаемости аллеля Allele frequency	G	124 (62,00%)	50 (33,00%)
	A	76 (38,00%)	100 (67,00%)
OR (CI 95%)	0,51 (0,32-0,71)		
Критерий χ^2 Criterion χ^2	28,22; p < 0,001		
TNFα 308G/A	GG	40 (40,00%)	15 (20,00%)
	GA	40 (40,00%)	35 (46,60%)
	AA	20 (20,00%)	25 (33,40%)
Частота встречаемости аллеля Allele frequency	G	120 (60,00%)	65 (43,30%)
	A	80 (40,00%)	85 (56,70%)
OR (CI 95%)	1,96 (1,27-3,01)		
Критерий χ^2 Criterion χ^2	9,55; p = 0,05		

Примечание. OR – коэффициент отношения шансов, CI – доверительный интервал.

Note. OR, odds ratio; CI, confidence interval.

кина у детей со следующими гомозиготными генотипами: по IL-4 с TT, IL-6 с GG, TNF α с AA, IFN γ с TT, IL-17A с AA, как в группе наблюдения, так и в группе контроля. Наиболее низкие показатели соответствующего цитокина в сыворотке крови определены у детей с генотипами: по IL-4 с CC, по IL-6 с CC, по TNF α с GG, IFN γ с AA, IL-17A с GG (рис. 1).

Проведенные исследования выявили ассоциации aberrантной продукции IL-4, IL-6, IL-17A, TNF α , IFN γ с полиморфными вариантами про-

моторных регионов генов, что свидетельствует о генетической детерминированности уровня синтеза данных цитокинов. Определена взаимосвязь заболевания и генотипа (p < 0,001) с эффектом парного взаимодействия с высокой статистической значимостью.

Заключение

Таким образом, в проведенном нами анализе генетической вариации генов цитокинов выявил

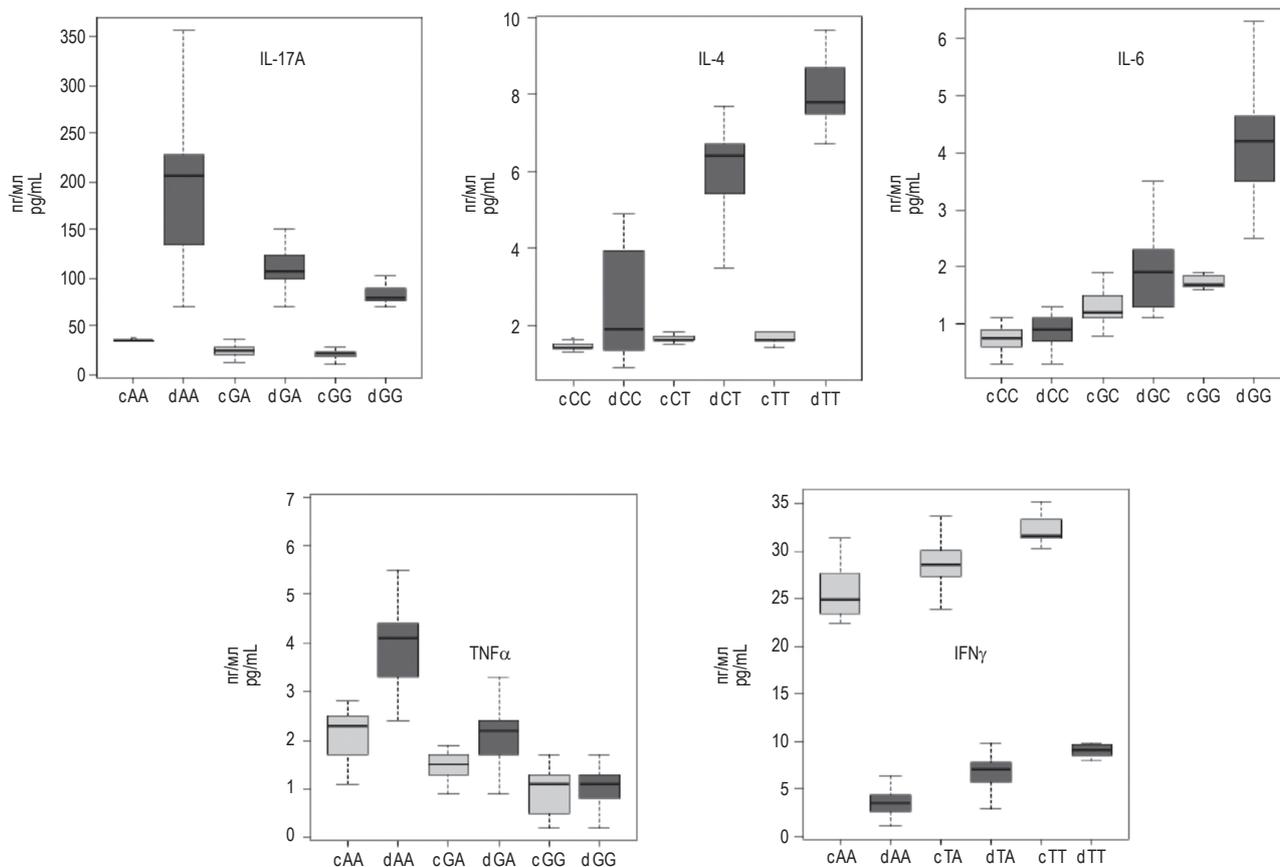


Рисунок 1. Сопряженность полиморфных генотипов и содержание цитокинов в сыворотке крови

Примечание. с – здоровые дети, d – дети с аллергической бронхиальной астмой.

Figure 1. Association of polymorphic genotypes and the content of cytokines in blood serum

Note. c, healthy children; d, children with allergic bronchial asthma.

ассоциативные связи между полиморфными вариантами генотипов и измененным синтезом цитокинов, проиллюстрировал информативность определения однонуклеотидных полиморфизмов генов цитокинов как дополнительных диагностических предикторов риска развития и реализации аллергической бронхиальной астмы у детей.

Исследования полиморфизмов генов, особенностей продукции и содержания цитокинов Th1/Th2/Th17 профилей при бронхиальной астме у детей выявили различия в структуре и встреча-

емости мутантных аллелей, ассоциированных с измененной продукцией цитокина, вариативностью риска развития и реализации аллергического фенотипа болезни.

Проведенное исследование предоставляет информацию о значимости функциональных полиморфизмов генов цитокинов как предикторов, ассоциированных с риском развития и распространенности аллергического воспаления дыхательных путей и фенотипическими особенностями болезни.

Список литературы / References

1. Брагина Е.Ю., Фрейдин М.Б., Бабушкина Н.П., Гараева А.Ф., Колоколова О.В., Жалсанова И.Ж., Пузырев В.П. Анализ генов цитокиновой сети в развитии «обратной» коморбидности для бронхиальной астмы и туберкулеза // Медицинская генетика, 2017. Т. 16, № 1. С. 20-24. [Bragina E.Yu., Freidin M.B., Babushkina N.P., Garaeva A.F., Kolokolova O.V., Zhalsanova I.Z., Puzyrev V.P. Analysis of cytokine network genes in the development of “reverse” comorbidity for bronchial asthma and tuberculosis. *Meditinskaya genetika = Medical Genetics*, 2017, Vol. 16, no. 1, pp. 20-24. (In Russ.)]

2. Касохов Т.Б., Цораева З.А., Мерденова З.С., Касохова В.В., Мазур А.И. Роль иммунной системы в развитии бронхиальной астмы у детей, проживающих в зоне экологического неблагополучия, и методы лечения [Электронный ресурс] // Современные проблемы науки и образования, 2016. № 3. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=24412>. [Kasokhov T.B., Tsoraeva Z.A., Merdenova Z.S., Kasokhova V.V., Mazur A.I. The role of the immune system in the development of bronchial asthma in children living in the zone of ecological trouble, and methods of treatment [Electronic resource]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* = *Modern Problems of Science and Education*, 2016, no. 3. (In Russ.)] Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=24412>.
3. Курбачева О.М., Жестков А.В., Нагаткин Д.А., Кулагина В.В., Нагаткина О.В. Современный взгляд на иммунопатогенез бронхиальной астмы // Российский аллергологический журнал, 2016. № 2. С. 10-14. [Kurbacheva O.M., Zhestkov A.V., Nagatkin D.A., Kulagina V.V., Nagatkina O.V. Modern view on the immunopathogenesis of bronchial asthma. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal* = *Russian Allergology Journal*, 2016, no. 2, pp. 10-14. (In Russ.)]
4. Симбирцев А.С. Иммунофармакологические аспекты системы цитокинов // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 84-95. [Simbirtsev A.S. Immunopharmacological aspects of the cytokine system. *Byulleten sibirskoy meditsiny* = *Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 84-95. (In Russ.)]
5. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.]
6. Смольникова М.В., Фрейдин М.Б., Смирнова С.В. Гены цитокинов как генетические маркеры атопической бронхиальной астмы с контролируемым и неконтролируемым течением // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 605-614. [Smolnikova M.V., Freidin M.B., Smirnova S.V. Cytokine genes as genetic markers of controlled and uncontrolled atopic bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 605-614. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-605-614.
7. Фрейдин М.Б., Огородова Л.М., Пузырев В.П. Патогенетика аллергических болезней: монография. Новосибирск: изд-во Сиб. отд. РАН, 2015. 149 с. [Freidin M.B., Ogorodova L.M., Puzyrev V.P. Pathogenetics of allergic diseases: monograph. Novosibirsk: Publishing House of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2015. 149 p.]
8. de Silva M.J., de Santana M.B.R., Tosta B.R., Espinheira R.P., Alcantara-Neves N.M., Barreto M.L., Figueiredo C.A., Costa R.D.S. Variants in the IL17 pathway genes are associated with atopic asthma and atopy makers in a South American population. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 15, 28. doi: 10.1186/s13223-019-0340-7.
9. Global strategy for asthma management and prevention: Global Initiative for Asthma (GINA): report 2019. 201 p. Available at: www.ginasthma.org (Date of application: 12.05.2022).
10. Hirose K., Iwata A., Tamachi T., Nakajima H. Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway. *Immunol. Rev.*, 2017, Vol. 278, no. 1, pp. 145-161.
11. Shumna T.Y., Fedosieieva O.S., Zinchenko T.P., Nedelska S.M., Voznyi O.V., Kamyshnyi O.M. Characteristics of interleukin-4 gene (C-589T, rs2243250) polymorphism in children with bronchial asthma and allergic rhinitis with isolated or allergic rhinitis-induced comorbid malocclusion. *Zaporozhye Medical Journal*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 723-732.
12. Zhai C., Li S., Feng W., Wang J., Wang Q., Chai L., Zhang Q., Yan X., Li M. Association of interleukin-17a rs2275913 gene polymorphism and asthma risk: a meta-analysis. *Arch. Med. Sci.*, 2018, Vol. 14, no. 6, pp. 1204-1211.
13. Zhang Y., Hua L., Liu Q. H., Gan Y., Wu M., Bao Y., Chen Q., Zhang J. Household mold exposure interacts with inflammation-related genetic variants on childhood asthma: a case-control study. *BMC Pulm. Med.*, 2021, Vol. 21, no. 1, 114. doi: 10.1186/s12890-021-01484-9.
14. Zhao W. Neutralization of interleukin-17 suppresses allergic rhinitis symptoms by downregulating Th2 and Th17 responses and upregulating the Treg response. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 14, pp. 22361-22369.

Авторы:

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

Долгополов М.С. — ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, аспирант ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Authors:

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

Dolgopolov M.S., Assistant Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Турянская А.И. — ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, аспирант ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Сабыныч В.А. — к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Turyanskaya A.I., Assistant Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Sabynych V.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 13.05.2022
Отправлена на доработку 29.05.2022
Принята к печати 09.06.2022

Received 13.05.2022
Revision received 29.05.2022
Accepted 09.06.2022

ЭКСПРЕССИЯ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗ CD39 И CD73 В ПОПУЛЯЦИЯХ CD4⁺ ЛИМФОЦИТОВ У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ

Радыгина Т.В.¹, Купцова Д.Г.¹, Петричук С.В.¹, Семикина Е.Л.^{1,2},
Фисенко А.П.¹

¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Пуриnergическая система играет важную роль в регуляции функционирования иммунной системы. Внеклеточный АТФ относится к неинфекционным сигналам опасности (DAMP), обладает провоспалительным эффектом и модулирует иммунный ответ. Конечный продукт расщепления АТФ – аденозин играет важную роль в ограничении воспалительного ответа. Активность экзонуклеотидаз CD39 и CD73 обеспечивает баланс АТФ и аденозина в очаге воспаления. Экспрессия CD39 и CD73 характеризуется большой вариабельностью. По данным литературы, исследования проводились либо на трансгенных мышах, либо с участием взрослых здоровых доноров. Количество клеток, экспрессирующих CD39 и CD73, в популяциях Т-лимфоцитов у здоровых детей не проводилось. Цель – изучить особенности экспрессии CD39 и CD73 в различных субпопуляциях CD4⁺ лимфоцитов у условно здоровых детей разного возраста.

Обследовано 45 условно здоровых детей в возрасте от 3,7 до 17,5 (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) – 12,4 (10-16,1)) лет. Оценку количества CD4⁺ клеток, количество регуляторных Т-лимфоцитов (Treg – CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}), активированных Т-хелперов (Tact – CD4⁺CD25⁺CD127^{high}) и Th17-лимфоцитов (CD4⁺CD161⁺CD3⁺), экспрессирующих CD39 и CD73, проводили методом проточной цитометрии.

Количество клеток, экспрессирующих CD39 и CD73, зависит от конкретной субпопуляции. Наибольшее количество CD39⁺ клеток наблюдалось в Treg, а наибольшее количество CD73⁺ клеток – в Tact. В Th17-лимфоцитах достоверной разницы между количеством клеток, экспрессирующих CD39 и CD73, выявлено не было. Показано увеличение относительного количества Th17-клеток, экспрессирующих CD73, и снижение относительного количества Tact, экспрессирующих CD39 с возрастом. Отмечено, что относительное и абсолютное количество CD39⁺Th17-клеток, относящихся к супрессорной субпопуляции, с возрастом снижалось, так же как и общее количество Treg клеток. Для Treg,

Адрес для переписки:

Радыгина Татьяна Вячеславовна
ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения РФ
119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2, стр. 1
Тел: 8 (499) 134-13-98.
Факс: 8 (499) 134-70-01.
E-mail: radigina.tv@nczd.ru

Address for correspondence:

Radygina Tatyana V.
National Medical Research Center of Children's Health
119991, Russian Federation, Lomonosovskiy ave., 2, bldg 1.
Phone: 7 (499) 134-13-98.
Fax: 7 (499) 134-70-01.
E-mail: radigina.tv@nczd.ru

Образец цитирования:

Т.В. Радыгина, Д.Г. Купцова, С.В. Петричук,
Е.Л. Семикина, А.П. Фисенко «Экспрессия
эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в популяциях
CD4⁺ лимфоцитов у условно здоровых детей»
// Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 3. С. 283-290. doi: 10.46235/1028-7221-1155-EOC
© Радыгина Т.В. и соавт., 2022

For citation:

T.V. Radygina, D.G. Kuptsova, S.V. Petrichuk, E.L. Semikina,
A.P. Fisenko "Expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases
in CD4⁺ lymphocyte populations in healthy children", Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 283-290.
doi: 10.46235/1028-7221-1155-EOC
DOI: 10.46235/1028-7221-1155-EOC

CD39⁺Treg, CD73⁺Treg, CD39⁺Th17 выявлено снижение абсолютных показателей с возрастом, что согласуется с возрастной динамикой снижения абсолютного количества лимфоцитов и CD4⁺ клеток.

Полученные данные об особенностях экспрессии эктонуклеотидаз в функционально различных популяциях CD4⁺ лимфоцитов важно учитывать при исследовании детей разных возрастных групп с иммуноопосредованными заболеваниями.

Ключевые слова: популяции лимфоцитов, CD4⁺ лимфоциты, Treg, Th17, Tact, CD39, CD73, дети

EXPRESSION OF CD39 AND CD73 ECTONUCLEOTIDASES IN CD4⁺ LYMPHOCYTE POPULATIONS IN HEALTHY CHILDREN

Radygina T.V.^a, Kuptsova D.G.^a, Petrichuk S.V.^a, Semikina E.L.^{a,b}, Fisenko A.P.^a

^a National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

^b I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Purinergic system plays an important role in functional regulation of immune system. Extracellular ATP belongs to non-infectious danger signals (DAMP), has a pro-inflammatory effect and modulates the immune response. The end product of ATP breakdown, adenosine, plays an important role in limiting the inflammatory response. The activity of ectonucleotidase CD39 and CD73 supports the balance of ATP and adenosine at the site of inflammation. CD39 and CD73 expression is characterized by high variability. From the literature data, appropriate studies were carried out either in transgenic mice, or with adult healthy donors. The number of cells expressing CD39 and CD73 in T lymphocyte populations has not been evaluated in healthy children. Hence, our aim was to study the features of CD39 and CD73 expression in various subpopulations of CD4⁺ lymphocytes in apparently healthy children of different ages.

We examined 45 healthy children aged 3.7 to 17.5 years (Me (Q_{0.25}-Q_{0.75}) – 12.4 (10-16.1)). The numbers of CD4⁺ cells, regulatory T lymphocytes (Treg – CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}), activated T helpers (Tact – CD4⁺CD25⁺CD127^{high}), and Th17 lymphocytes (CD4⁺CD161⁺CD3⁺) expressing CD39 and CD73 were evaluated by the flow cytometry.

The number of cells expressing CD39 and CD73 depends on specific cell subpopulation. The highest content of CD39⁺ cells was observed in Tregs, and maximal amounts of CD73⁺ cells were found among Tact subset. In the Th17 lymphocyte subpopulation, there was no significant difference between the number of cells expressing CD39 and CD73. E have also shown an increase in the relative number of Th17 cells expressing CD73, along with age-dependent decrease in the relative number of Tact cells expressing CD39. An age-dependent decrease in absolute values with age was revealed for Treg, CD39⁺Treg, CD73⁺Treg, CD39⁺Th17, thus being consistent with age-related decrease in absolute numbers of lymphocytes and CD4⁺ cells.

The obtained data concerning specific pattern of ectonucleotidases expression in functionally different populations of CD4⁺ lymphocytes should be taken into account when studying children with immune-mediated diseases from different age groups.

Keywords: lymphocyte subsets, CD4⁺, Treg, Th17, Tact, CD39, CD73, children

Введение

В последнее десятилетие интенсивно изучается пуриnergическая система регуляции иммунной системы. Пуриnergическая система оказывает существенное влияние на межклеточные взаимодействия, секрецию цитокинов и хемокинов, образование активных форм кислорода, шеддинг поверхностных антигенов, осуществляя таким образом точную «настройку» иммунной систе-

мы [4]. АТФ и аденозин являются пуриnergическими медиаторами, которые высвобождаются во внеклеточное пространство в ответ на разного рода нарушения, в том числе метаболические, и действуют как сенсорные и эфферентные сигналы для формирования иммунных ответов [13, 14, 15]. Молекула АТФ в зависимости от концентрации может действовать как иммуностимулятор и как иммунодепрессант, в то же время аденозин

выполняет только функцию иммуносупрессора. Практически все иммунные клетки экспрессируют рецепторы P2 и P1, с которыми взаимодействуют АТФ и аденозин соответственно. Таким образом, пуринергическая система участвует в регуляции всех звеньев иммунной системы [8].

Ключевыми молекулами пуринергической системы регуляции являются эктонуклеотидазы CD39 и CD73 – ферменты, под действием которых АТФ в ходе последовательных реакций гидролизуется до аденозина. После высвобождения АТФ во внеклеточное пространство CD39 (экто-нуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза 1, E-NTPDase1) превращает АТФ в АМР, а затем CD73 (экто-5'-нуклеотидаза, Ecto5'NTase) дефосфорилирует АМР в аденозин. Экспрессия CD39 и CD73 на лимфоцитах претерпевает динамические изменения при различных патологических процессах: инфекции, СПИД, аутоиммунные заболевания, атеросклероз, ишемически-реперфузионное повреждение, онкологические заболевания [5, 6, 10, 12].

В последние годы большое внимание уделяется изучению экспрессии эктонуклеотидаз при патологических состояниях, но работ, посвященных изучению CD39 и CD73 у здоровых людей, крайне мало. Так было показано, что у взрослых доноров CD39 конститутивно экспрессируется на более чем 90% В-клеток, более 90% моноцитов, на 20-30% CD4⁺Т-клеток (включая Т-клетки памяти и Treg), менее 5% CD8⁺Т-клеток и на 2-5% NK-клеток. CD73 экспрессируется на 75% В-клеток, 50% CD8⁺Т-клеток, 10% CD4⁺Т-клеток и 2-5% NK-клеток [11]. Показано также, что В-клетки, Treg, Th17-клетки, NK-клетки и супрессорные клетки миелоидного происхождения могут коэкспрессировать CD39 и CD73 [3]. Описано, что экспрессия CD39 и CD73 у взрослых зависит от популяции Т-лимфоцитов и от возраста человека [1]. Например, количество клеток, экспрессирующих CD73 на лимфоцитах снижается с возрастом [9]. Исследования по изучению количества клеток, экспрессирующих CD39 и CD73 у здоровых детей, не проводились. В связи с этим **цель настоящего исследования** – изучить особенности экспрессии CD39 и CD73 в различных субпопуляциях CD4⁺ лимфоцитов у условно здоровых детей разного возраста.

Материалы и методы

Было обследовано 45 условно здоровых детей в возрасте 12,4 (10-16,1) лет. Критериями исключения являлись: наличие в стандартном клиническом и/или биохимическом лабораторном ис-

следовании результатов, выходящих за диапазон референсных значений; наличие каких-либо острых состояний или обострения хронических; наличие в анамнезе травм, аутоиммунных, онкологических и психических заболеваний.

Обследование пациентов проводилось согласно этическим нормам и регулирующим документам Российской Федерации. Исследование получило одобрение локального этического комитета. Перед исследованием было получено информированное согласие родителей в соответствии с Хельсинкской декларацией. Образцы венозной крови для иммунологических тестов получали путем забора из локтевой вены натошак в пробирки BD Vacutainer® с антикоагулянтом К₂ЭДТА.

Иммунофенотипирование лимфоцитов и оценка количества клеток, экспрессирующих рецепторы пуринергического сигналинга (CD39 и CD73), в популяциях Т-клеток проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии (Novocyte, ACEA Biosciences, США). Использовали панель моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами: CD4-FITC (cat. A07750, Beckman Coulter, США), CD127-PE (cat. IM 10980U, Beckman Coulter, США), CD25-PC7 (cat. A52882, Beckman Coulter, США), CD161-PE (cat. IM 3450, Beckman Coulter, США), CD3-PC5 (cat. A07749, Beckman Coulter, США), CD39-APC-Cy7 (Clone A1, cat. RT2241130 Sony Biotechnology, США), CD73-APC-Cy7 (Clone AD2, cat. RT2320110, Sony Biotechnology, США). Количество клеток с CD39⁺ и CD73⁺ в регуляторных Т-клетках (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}), активированных Т-хелперах (Tact – CD4⁺CD25⁺CD127^{high}), Th17-лимфоцитах (CD4⁺CD161⁺CD3⁺) оценивали с помощью пошагового гейтирования. Тактика гейтирования для выделения Treg и Tact, несущих CD39 и CD73, следующая: 1 – выделение «лимфоидного» региона по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; 2 – выделение CD4 позитивных лимфоцитов; 3 – выделение Treg по маркерам (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}); 4 – выделение Tact по маркерам (CD4⁺CD25^{high}CD127^{high}); 5 – далее в составе выделенных регионов оценивался процент клеток, экспрессирующих CD39 и CD73: субпопуляции CD39⁺Treg, CD73⁺Treg, CD39⁺Tact, CD73⁺Tact.

Тактика гейтирования для выделения Th17, несущих CD39 и CD73, следующая: 1 – выделение «лимфоидного» региона по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; 2 – выделение двойной позитивной популяции по маркерам CD3 и CD4; 3 – выделение Th17-популяции (CD3⁺CD4⁺CD161⁺); 4 – далее в со-

стае выделенных регионов оценивался процент клеток, экспрессирующих CD39 и CD73: субпопуляции CD39⁺Th17, CD73⁺Th17.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 7.0 (StatSoft, США). Описательная статистика количественных признаков представлена в формате: медиана (нижние и верхние квартили) – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Достоверность различий между группами оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Для выявления связи между исследованными показателями и возрастом использовали коэффициент корреляции Пирсона (r). Статистически значимыми считали различия при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Было проанализировано количество клеток, экспрессирующих CD39⁺ и CD73⁺ в популяциях Т-лимфоцитов у детей. Наибольшее количество CD39⁺ отмечалось в популяции Treg и колебалось от 19% до 49%. Зарубежными авторами было показано, что у взрослых здоровых доноров этот показатель варьировал от 10% до 60% [7]. Относительное количество клеток, несущих CD73, в популяции Tact у обследованных детей составляло от 7% до 35%. Сравнение популяций лимфоцитов, несущих CD39 и CD73, показало, что

наибольший процент CD39⁺ клеток наблюдался в Treg, а в Tact наоборот количество клеток с CD73⁺ достоверно превалировало над CD39⁺ (табл. 1, рис. 1). Что касается популяции Th17-лимфоцитов, то достоверной разницы между количеством клеток, экспрессирующих CD39 и CD73 выявлено не было.

Корреляционный анализ зависимости популяций Т-лимфоцитов от возраста показал, что относительное количество Treg не зависело от возраста (r = -0,15; p = 0,328), а абсолютное количество Treg снижалось с возрастом (r = -0,45; p = 0,002). Относительное количество Th17 с возрастом увеличивалось (r = 0,47; p = 0,002), при этом абсолютное количество от возраста не зависело (r = -0,06; p = 0,708). Что касается активированных Т-хелперов, то относительное (r = 0,86; p = 0,000) и абсолютное (r = 0,63; p = 0,000) их количество увеличивалось с возрастом. Представленные результаты согласуются с ранее полученными данными в более широком возрастном диапазоне [2].

Получены различия в возрастной динамике содержания малых популяций лимфоцитов (Treg, Th17, Tact) и клеток, экспрессирующих CD39 и CD73. Так, относительное количество CD39⁺Treg не изменялось с возрастом, так же как и общее количество Treg, при этом относительное коли-

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ И АБСОЛЮТНОЕ КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗЫ CD39 И CD73 В ПОПУЛЯЦИЯХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. RELATIVE NUMBER AND ABSOLUTE COUNT OF CELLS EXPRESSING CD39 AND CD73 ECTONUCLEOTIDASES IN POPULATIONS OF T LYMPHOCYTES IN HEALTHY CHILDREN, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Популяции Populations	Ферменты Enzymes		p
	CD39	CD73	
% от Treg % from Treg	34,2 (27,2-39,1)	8,7 (6,9-12,5)	0,000
Treg, кл/мкл Treg cells/μl	26,5 (18,2-30,9)	7,3 (3,1-9,7)	0,000
% от Tact % from Tact	5 (4,4-7,6)	17,6 (11,9-21,5)	0,000
Tact, кл/мкл Tact cells/μl	6,8 (5,5-8,8)	23,5 (13,7-31,5)	0,000
% от Th17 % from Th17	9,7 (8,6-12,1)	10,2 (7,3-14,4)	1,000
Th17, кл/мкл Th17, cells/μL	12,2 (11,4-14,4)	12,7 (8,6-17,6)	0,900

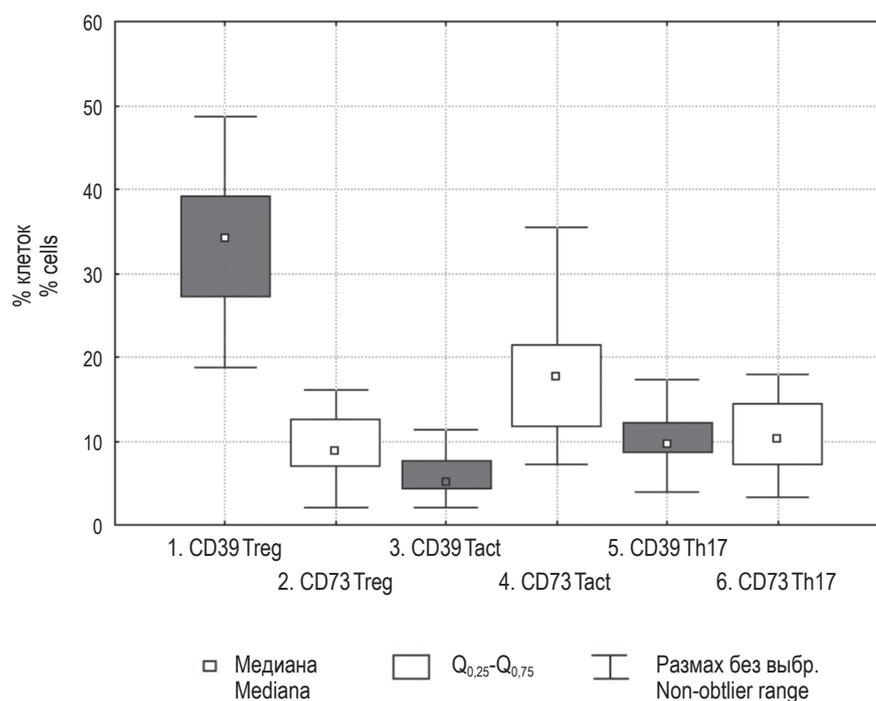


Рисунок 1. Относительное количество клеток, экспрессирующих CD39 и CD73, в популяциях Treg, Tact, Th17
 Figure 1. Relative number of cells expressing CD39 and CD73 in Treg, Tact, Th17 populations

ТАБЛИЦА 2. ЗАВИСИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ CD39 И CD73 ОТ ВОЗРАСТА В ПОПУЛЯЦИЯХ Т-КЛЕТОК У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ (ПО ПРОЦЕНТАМ И АБСОЛЮТНЫМ ПОКАЗАТЕЛЯМ)

TABLE 2. DEPENDENCE OF CD39 AND CD73 EXPRESSION FROM AGE IN T CELL POPULATIONS IN HEALTHY CHILDREN (BY PERCENTAGE AND ABSOLUTE COUNT)

Популяции Populations	Возраст Age	Фермент Enzymes	
		CD39	CD73
Относительное количество, % Relative numbers, %			
Treg	$r = -0,15; p = 0,328$	$r = 0,16; p = 0,290$	$r = -0,51; p = 0,000$
Th17	$r = 0,47; p = 0,002$	$r = -0,40; p = 0,006$	$r = 0,42; p = 0,004$
Tact	$r = 0,86; p = 0,000$	$r = -0,49; p = 0,000$	$r = 0,16; p = 0,294$
Абсолютное количество, кл/мкл Abs, cells/μL			
Treg	$r = -0,45; p = 0,002$	$r = -0,44; p = 0,002$	$r = -0,67; p = 0,000$
Th17	$r = -0,06; p = 0,708$	$r = -0,44; p = 0,003$	$r = 0,35; p = 0,190$
Tact	$r = 0,63; p = 0,000$	$r = -0,13; p = 0,391$	$r = 0,47; p = 0,001$

чество CD73⁺Treg достоверно снижалось с возрастом (табл. 2).

Абсолютное количество клеток CD39⁺Treg и CD73⁺Treg достоверно снижалось с возрастом, так же как и абсолютное количество Treg. Для популяции Th17 получено, что относительное количество CD73⁺Th17 с возрастом увеличивалось, повторяя возрастную динамику общей популяции Th17, а относительное количество CD39⁺Th17 с возрастом снижалось. Интересно отметить, что популяция Th17, экспрессирующая эктонуклеотидазу CD39, относится к супрессорной субпопуляции – supTh17; снижение с возрастом уровня клеток этой субпопуляции согласуется с возрастной динамикой снижения уровня Treg. Для большинства исследованных субпопуляций (Treg, CD39⁺Treg, CD73⁺Treg, CD39⁺Th17) выявлена динамика умеренного снижения абсолютных чисел с возрастом, что согласуется с известной возрастной динамикой снижения абсолютного уровня всех лимфоцитов и CD4⁺ в том числе. В связи с этим мы предполагаем, что анализ абсолютных чисел имеет меньшее значение по сравнению с относительными показателями, которые позволяют оценивать равновесие субпопуляций. Возрастная динамика повышения абсолютных чисел CD73⁺Tact и всей популяции Tact

отличалась от других субпопуляций лимфоцитов, что вызывает определенный интерес для дальнейшего изучения.

Заключение

Оценка количества клеток малых популяций CD4⁺ лимфоцитов, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, показала, что уровень экспрессии зависит от конкретной субпопуляции клеток. Наибольшее количество клеток, несущих CD39, наблюдалось в популяции Treg, а наибольшее количество клеток, несущих CD73 – в популяции Tact, что отражает особенности пуринаргической регуляции данных популяций. У детей, так же как и у взрослых, наблюдается большая вариабельность показателей, однако для ряда поверхностных маркеров показана существенная возрастная динамика. Наиболее выраженными изменениями с возрастом являются увеличение относительного количества Th17-клеток, экспрессирующих CD73, и снижение относительного количества Th17 и Tact, экспрессирующих CD39. Описанные особенности эктонуклеотидаз на малых популяциях CD4⁺ лимфоцитов должны учитываться при проведении исследований у детей разных возрастных групп с иммуноопосредованными заболеваниями.

Список литературы / References

1. Головкин А.С., Серебрякова М.К., Жидулева Е.В., Муртазалиева П.М., Титов В.А., Иртыга О.Б., Моисеева О.М., Кробинец И.И., Кудрявцев И.В. Экспрессия рецепторов пуринаргического сигналинга на Т-лимфоцитах периферической крови здоровых доноров // Трансляционная медицина, 2017. № 4. С. 46-60. [Golovkin A.S., Serebryakova M.K., Zhiduleva E.V., Murtazaliev P.M., Titov V.A., Irtuga O.B., Moiseeva O.M., Krobinec I.I., Kudryavtsev I.V. Purinergic signaling receptors expression on peripheral T-lymphocytes of healthy donors. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*, 2017, Vol. 4, no. 5, pp. 46-60. (In Russ.)]
2. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Петричук С.В., Закиров Р.Ш., Курбатова О.В., Копыльцова Е.А., Комах Ю.А. Изменение уровня субпопуляций Т-регуляторных клеток и Т-хелперов 17 в периферической крови здоровых людей в зависимости от возраста // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 409-420. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Petrichuk S.V., Zakirov R.S., Kurbatova O.V., Kopyltsova E.A., Komakh Yu.A. Age-dependent changes of T-regulatory and Th17 subset levels in peripheral blood from healthy humans. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 409-421. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-409-421.
3. Allard B., Longhi M., Robson S., Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol. Rev.*, 2017, Vol. 276, pp. 121-144.
4. Antonioli L., Pacher P., Vizi E., Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.*, 2013, Vol. 19, no. 6, pp. 355-367.
5. Bastid J., Cottalorda-Regairaz A., Alberici G., Bonnefoy N., Eliaou J.-F., Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*, 2013, Vol. 32, no. 14, pp. 1743-1751.
6. Bönner F., Borg N., Burghoff S., Schrader J. Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 4, e34730.
7. Borsellino G., Kleinewietfeld M., di Mitri D., Sternjak A., Diamantini A., Giometto R., Höpner S., Centonze D., Bernardi G., Dell'Acqua M., Rossini P., Battistini L., Röttschke O., Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 2007, Vol. 110, no. 4, pp. 1225-1232.

8. di Virgilio F., Vuerich M. Purinergic signaling in the immune system. *Auton. Neurosci.*, 2015, Vol. 191, pp. 117-123.
9. Guzman-Flores J.M., Cortez-Espinosa N., Cortés-García J.D., Vargas-Morales J.M., Cataño-Cañizalez Y.G., Rodríguez-Rivera J.G., Portales-Perez D.P. Expression of CD73 and A2A receptors in cells from subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology*, 2015, Vol. 220, no. 8, pp. 976-984.
10. Nikolova M., Carriere M., Jenabian M.-A., Limou S., Younas M., Kök A., Huë S., Seddiki N., Hulin A., Delaneau O., Schuitemaker H., Herbeck J., Mullins J., Muhtarova M., Bensussan A., Zagury J.-F., Lelievre J.-D., Lévy Y. CD39/adenosine pathway is involved in AIDS progression. *PLoS Pathog.*, 2011, Vol.7, no. 7, e1002110. doi: 10.1371/journal.ppat.1002110.
11. Resta R., Yamashita Y., Thompson L.F. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev.*, 1998, Vol. 161, pp. 95-109.
12. Schetinger M.R., Morsch V.M., Bonan C.D., Wyse A. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors*, 2007, Vol. 31, no. 2, pp. 77-98.
13. Sperlagh B., Baranyi M., Haskó G., Vizi E.S. Potent effect of interleukin-1 beta to evoke ATP and adenosine release from rat hippocampal slices. *J. Neuroimmunol.*, 2004, Vol. 151, no. 1-2, pp. 33-39.
14. Sperlagh B., Haskó G., Németh Z., Vizi E.S. ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z/P2X7 receptors. *Neurochem. Int.*, 1998, Vol. 33, no. 3, pp. 209-215.
15. Sperlagh B., Vizi E.S. The role of extracellular adenosine in chemical neurotransmission in the hippocampus and Basal Ganglia: pharmacological and clinical aspects. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2011, Vol. 11, no. 8, pp. 1034-1046.

Авторы:

Радыгина Т.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Купцова Д.Г. — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Петричук С.В. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии лабораторного отдела НИИ педиатрии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Radygina T.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Kuptsova D.G., Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Petrichek S.V., PhD, MD (Biology), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Семикина Е.Л. — д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии, заведующий лабораторным отделом ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Фисенко А.П. — д.м.н., профессор, директор ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Semikina E.L., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, Head, Laboratory Department, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Fisenko A.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Поступила 15.05.2022

Отправлена на доработку 29.05.2022

Принята к печати 16.06.2022

Received 15.05.2022

Revision received 29.05.2022

Accepted 16.06.2022

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ СЕПСИСЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДА

Савочкина А.Ю., Полторак А.Е., Никушкина К.В., Зотова М.А.

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

Резюме. В современном понимании сепсис – это прежде всего патология иммунной системы, вызванная основной инфекцией, с индивидуально развившейся реакцией организма хозяина. Таким образом, сепсис не следует классифицировать как отдельный про- или противовоспалительный синдром, а скорее как переменный континуум накладывающихся иммунных механизмов. Роль врожденного иммунитета при сепсисе, вероятно, является ведущей, так как именно он отвечает за ранний по времени и неспецифический ответ на любой чужеродный агент. Характер взаимосвязи может определять состояние иммунной системы. Для более глубокого изучения механизмов противоинфекционной защиты, был проведен анализ взаимосвязей между иммунологическими показателями периферической крови у больных сепсисом в зависимости от исхода заболевания. В цельной периферической крови больных сепсисом определяли общее количество лейкоцитов, нейтрофилов, с подсчетом лейкоцитарной формулы и количества нейтрофильных внеклеточных ловушек. В сыровотке крови изучали уровни прокальцитонина, пептидил-аргинин-деиминазы 4 и цитокинов методом твердофазного иммуноферментного анализа. Для изучения взаимосвязей между показателями врожденного иммунитета использовали корреляционный анализ, который проводили методом ранговой корреляции по Спирмену.

При проведении корреляционного анализа сильных корреляционных связей между иммунологическими показателями периферической крови у пациентов с сепсисом не выявлено, независимо от исхода заболевания.

При благоприятном исходе выявлено 10 взаимосвязей, при неблагоприятном исходе – 7 взаимосвязей. Все обнаруженные взаимосвязи средней силы.

Независимо от исхода сепсиса установлены достоверные взаимосвязи между количеством лейкоцитов и уровнем нейтрофильных внеклеточных ловушек, также выявлены положительные взаимосвязи между провоспалительными цитокинами IL-1 – IL-6, TNF – IL-18, однако при благоприятном исходе эти связи – достоверные, а при летальном исходе они становятся слабее и теряют свою значимость.

Из выявленных взаимосвязей наиболее интересны взаимосвязи при благоприятном исходе сепсиса с IL-10, который является противовоспалительным цитокином и координирует врожденные иммунные реакции. При летальном исходе отсутствуют взаимосвязь с IL-10.

Так как IL-10 – цитокин с противовоспалительными свойствами, который ограничивает иммунный ответ на патогены и тем самым предотвращает повреждение хозяина. Возможно, в связи с этим, взаимосвязи (их сила и достоверность) IL-10 с другими иммунологическими показателями периферической крови при сепсисе могут влиять на исход заболевания.

Ключевые слова: сепсис, врожденный иммунитет, взаимосвязи, прокальцитонин, цитокины, пептидил-аргинин-деиминаза 4

Адрес для переписки:

Зотова Мария Александровна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (909) 072-30-55.
E-mail: zotova.chel@mail.ru

Address for correspondence:

Zotova Maria A.
South-Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (909) 072-30-55.
E-mail: zotova.chel@mail.ru

Образец цитирования:

А.Ю. Савочкина, А.Е. Полторак, К.В. Никушкина,
М.А. Зотова «Анализ взаимосвязей между
показателями врожденного иммунитета при
сепсисе в зависимости от исхода» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 291–294.
doi: 10.46235/1028-7221-1123-RBT
© Савочкина А.Ю. и соавт., 2022

For citation:

A. Yu. Savochkina, A. E. Poltorak, K. V., Nikushkina
M. A. Zotova “Relationships between the indices of innate
immunity in sepsis depend on clinical outcomes”, Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 291–294.
doi: 10.46235/1028-7221-1123-RBT
DOI: 10.46235/1028-7221-1123-RBT

RELATIONSHIPS BETWEEN THE INDICES OF INNATE IMMUNITY IN SEPSIS DEPEND ON CLINICAL OUTCOMES

Savochkina A.Yu., Poltorak A.E., Nikushkina K.V., Zotova M.A.

South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. At the present time, sepsis is primarily considered a disorder of the immune system caused by dominant infection, manifesting with individual response reaction of the host organism. Hence, sepsis should not be classified as a distinct pro- or anti-inflammatory syndrome, but rather as a variable continuum of overlapping immune mechanisms. The role of innate immunity in sepsis is probably the leading one, since it exerts an early and nonspecific response to any foreign agent. The nature of appropriate relationships may determine current state of the immune system. To perform a deeper study of the anti-infectious protective mechanisms, we have evaluated the relationships between the immunological parameters of peripheral blood in patients with sepsis, depending on the outcome of the disease. Total number of leukocytes, and neutrophils was determined in whole peripheral blood of the patients with sepsis, along with calculation of leukocyte counts and numbers of neutrophil extracellular traps. Serum levels of procalcitonin, peptidyl-arginine deiminase 4, and cytokines were studied by ELISA assay. To study the relationship between the indices of innate immunity, we used correlation analysis, which was carried out by the Spearman rank criterion. When conducting the statistical analysis, strong correlations between the immunological parameters of peripheral blood in patients with sepsis were not revealed, regardless of the outcome of the disease. In cases of favorable outcome, 10 relationships were identified, with an unfavorable outcome, 7 relationships were registered. All the relationships were of medium strength. Regardless of clinical outcome of sepsis, the significant relationships were established between the number of leukocytes and the level of neutrophil extracellular traps; positive relationships were also found between pro-inflammatory cytokines IL-1 – IL-6, TNF – IL-18. However, these relationships were significant in cases with favorable outcome, while becoming weaker and losing their significance for the group with lethal outcomes.

Among the revealed relationships, the most interesting finding was an association between favorable outcome of sepsis with IL-10 contents, which is an anti-inflammatory cytokine coordinating the innate immune response. In lethal outcomes, such relationship with IL-10 was not revealed. IL-10, a cytokine with anti-inflammatory properties may limit the immune response to pathogens and, thus, potentially prevent damage to the host. Therefore, the relationship between IL-10 and other immunological parameters of peripheral blood in sepsis may affect the outcome of this condition.

Keywords: sepsis, innate immunity, relationships, procalcitonin, cytokines, peptidyl-arginine deiminase 4

Введение

Сепсис является одной из самых обсуждаемых проблем современной медицины. Это связано прежде всего с увеличением частоты его возникновения и высокой смертностью, достигающей даже в ведущих клиниках 40% при сепсисе и 80-90% при септическом шоке [7].

Основы современной концепции сепсиса были заложены в 90-х годах прошлого столетия. В 1991 году R. Vone предложил рассматривать сепсис как системную воспалительную реакцию организма больного на инфекцию [2].

Сепсис является мультидисциплинарной проблемой. Действительно, надеяться на успех в лечении сепсиса можно только при слаженной командной работе врачей различных специальностей: анестезиологов-реаниматологов, хирургов, терапевтов, клинических лабораторных диагностов, клинических фармакологов и др. [4].

Понимание причин и патофизиологических основ сепсиса постоянно менялось в течение последних десятилетий. В современном понимании сепсис – это прежде всего патология иммунной

системы, вызванная основной инфекцией, с индивидуально развившейся реакцией хозяина. Таким образом, сепсис не следует классифицировать как отдельный про- или противовоспалительный синдром, а, скорее, как переменный континуум накладывающихся иммунных механизмов. В то время как при раннем сепсисе преобладает чрезмерная иммунная реакция, которая быстро компенсируется, часто приводя к иммунной дисфункции, делая хозяина восприимчивым к вторичным инфекциям [5].

С позиций иммунологии биологическая роль воспаления заключается в концентрации различных защитных факторов в зоне повреждения для ликвидации патогенного материала и последующего восстановления структуры и функции поврежденной ткани [1].

Реакция иммунной системы на патоген или повреждение всегда начинается с включения механизмов врожденного иммунитета. При этом скорость запуска компонентов врожденной защиты составляет секунды, минуты или часы, а система приобретенного иммунитета включается лишь при неэффективности врожденных механизмов защи-

ты. Главным местом реализации как врожденного, так и адаптивного иммунитета является очаг воспаления. Роль врожденного иммунитета при сепсисе, вероятно, является ведущей, так как именно он отвечает за ранний по времени и неспецифический ответ на любой чужеродный агент [1].

Для более глубокого изучения механизмов противоинфекционной защиты был проведен анализ взаимосвязей между иммунологическими показателями периферической крови у больных сепсисом. Характер взаимосвязи может определять состояние иммунной системы. Наличие сильных корреляционных связей свидетельствует об устойчивом состоянии иммунной системы, а уменьшение силы взаимосвязей характеризует неустойчивое состояние иммунной системы и возможность ее функционального срыва.

Цель – провести анализ взаимосвязей между показателями врожденного иммунитета при сепсисе в первые сутки заболевания в зависимости от исхода.

Материалы и методы

Работа выполнена в НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральского государственного медицинского университета» Министерства здравоохранения Российской Федерации. В исследовании участвовали 44 пациента с сепсисом (20 женщины и 24 мужчины) группу сравнения составили 20 условно здоровых лиц. Пациенты с сепсисом были разделены на 2 группы в зависимости от исхода: в 1-ю группу (n = 25) включены пациенты с благоприятным исходом, во 2-ю группу (n = 19) – пациенты с летальным исходом. Материалом для исследования служила цельная периферическая кровь и полученная из нее сыворотка крови. В цельной периферической крови определяли общее количество лейкоцитов, нейтрофилов, с подсчетом лейкоцитарной формулы, и количество нейтрофильных внеклеточных ловушек. Нейтрофильные внеклеточные ловушки определяли согласно патенту № 271555 от 02.03.2020 г. «Способ обнаружения внеклеточной ДНК в цельной периферической крови». Для изучения уровней прокальцитонина, пептидил-аргинин-деиминазы 4 и цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем.

Для изучения взаимосвязей между показателями врожденного иммунитета использовали корреляционный анализ, который проводили методом ранговой корреляции по Спирмену.

Результаты и обсуждение

При проведении корреляционного анализа на первые сутки заболевания сильных корреляционных связей между иммунологическими показателями периферической крови у пациентов с сепсисом не выявлено, независимо от исхода заболевания (табл. 1, 2).

ТАБЛИЦА 1. ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ СЕПСИСЕ У ПАЦИЕНТОВ С БЛАГОПРИЯТНЫМ ИСХОДОМ НА 1-е СУТКИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 1. RELATIONSHIP BETWEEN THE INDICATORS OF INNATE IMMUNITY IN SEPSIS IN PATIENTS WITH A FAVORABLE OUTCOME ON THE 1st DAY OF THE DISEASE

Пациенты с благоприятным исходом (n = 25) Patients with a favorable outcome (n = 25)		
Показатели Indicators	Коэффициент корреляции (ρ) Correlation coefficient (ρ)	p
НВЛ – IL-1 NET – IL-1	-0,385	0,058
Лейкоциты – IL-1 White blood cells – IL-1	-0,392	0,053
IL-1 – IL-6	0,482	0,015
TNF – IL-18	0,428	0,033
Лейкоциты – IL-10 White blood cells – IL-10	0,421	0,036
TNF – IL-10	0,584	0,009
PAD4 – IL-6	0,345	0,091
PAD4 – IL-18	-0,358	0,079
НВЛ – PAD4 NET – PAD4	0,401	0,047
Лейкоциты – НВЛ White blood cells – NET	0,599	0,002

ТАБЛИЦА 2. ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ СЕПСИСЕ У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕТАЛЬНЫМ ИСХОДОМ НА 1-е СУТКИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 2. RELATIONSHIP BETWEEN THE INDICATORS OF INNATE IMMUNITY IN SEPSIS IN PATIENTS WITH FATAL OUTCOME ON THE 1st DAY OF THE DISEASE

Пациенты с летальным исходом (n = 19) Patients with fatal outcome (n = 19)		
Показатели Indicators	Коэффициент корреляции (ρ) Correlation coefficient (ρ)	p
IL-1 – IL-18	-0,531	0,019
IL-6 – IL-10	0,379	0,062
IL-6 – PAD4	0,457	0,049
TNF – IL-18	0,419	0,074
Лейкоциты – IL-18 White blood cells – IL-18	0,428	0,067
НВЛ – TNF NET – TNF	0,536	0,018
Лейкоциты – НВЛ White blood cells – NET	0,514	0,024

При благоприятном исходе выявлено 10 взаимосвязей, при неблагоприятном исходе – 7. Все обнаруженные взаимосвязи средней силы.

Независимо от исхода сепсиса установлены достоверные взаимосвязи между количеством лейкоцитов и уровнем НВЛ, также выявлены положительные взаимосвязи между провоспалительными цитокинами IL-1 – IL-6; TNF – IL-18, однако при благоприятном исходе эти связи – достоверные, а при летальном исходе они становятся слабее и теряют свою значимость.

Взаимосвязь между TNF и НВЛ (при летальном исходе) можно объяснить тем, что TNF является сильным активатором, который использовали для создания экспериментальной модели сепсиса [3], а при сепсисе увеличивается количество нейтрофилов и образование НВЛ.

Наиболее интересные взаимосвязи при благоприятном исходе сепсиса с IL-10, который является противовоспалительным цитокином и координирует врожденные иммунные реакции. При летальном исходе отсутствуют взаимосвязь с IL-10 не является достоверной.

Выводы

IL-10 – цитокин с противовоспалительными свойствами, который ограничивает иммунный ответ на патогены и тем самым предотвращает повреждение хозяина [6]. В связи с этим взаимосвязи (их сила и достоверность) IL-10 с другими иммунологическими показателями периферической крови при сепсисе могут влиять на исход заболевания.

Список литературы / References

1. Черешнев В.А., Шмагель К.В. Иммунология: учебник. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Центр стратегического партнерства, 2014. 520 с. [Chereshnev V.A., Shmagel K.V. Immunology: textbook. 4th ed., rev. and suppl.]. Moscow: Center for Strategic Partnership, 2014. 520 p.
2. Bone R.C. Toward an epidemiology and history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA*, 1992, Vol. 268, no. 24, pp. 3452-3455.
3. Ghezzi P., Cerami A. Tumor necrosis factor as a pharmacological target. *Methods Mol. Med.*, 2004, Vol. 98, pp. 1-8.
4. Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.-L., Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.*, 2003, Vol. 29, pp. 530-538.
5. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 18, no. 2, 134-147.
6. Saraiva M., O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 3, pp. 170-181
7. Shankar-Hari M., Phillips G.S., Levy M.L., Seymour C.W., Liu V.X., Deutschman C.S., Angus D.C., Rubenfeld G.D., Singer M., Sepsis Definitions Task Force. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016, Vol. 315, no. 8, pp. 775-787.

Авторы:

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

Полторак А.Е. – старший лаборант кафедры госпитальной хирургии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

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

Зотова М.А. – к.б.н., старший научный сотрудник НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

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

Poltorak A.E., Senior Laboratory Assistant, Department of Hospital Surgery, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

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

Zotova M.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Immunology, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 14.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 14.05.2022
Accepted 29.05.2022

ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА, НЕ ИНФИЦИРОВАННЫХ SARS-CoV-2

Савчук К.С.¹, Симбирцев А.С.²

¹ ООО «Центр акушерства и гинекологии № 1», г. Челябинск, Россия

² ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Сахарный диабет (СД) – распространенное хроническое неинфекционное заболевание, является наиболее значимым сопутствующим заболеванием при вирусной инфекции SARS-CoV-2. Доля больных СД среди заболевших COVID-19 составляет до 25,0% в Российской Федерации. СД утяжеляет течение COVID-19, что характеризуется большей выраженностью и стойкостью легочных повреждений, увеличением потребности больных в иммуносупрессивной, глюкокортикоидной и комбинированной противовирусной терапии, удлинением периода реабилитационных мероприятий. Активно изучаются особенности патогенеза тяжелого течения вирусной инфекции SARS-CoV-2 при СД. Определены негативное влияние гипергликемии на течение инфекции; прямое цитотоксическое и опосредованное повреждение панкреатических β-клеток, с дальнейшей активацией провоспалительных механизмов; кумуляция и прогрессирование характерного для СД и COVID-19 генерализованного воспаления, включая нарушения продукции цитокинов; влияние вируса SARS-CoV-2 на ренин-ангиотензин-альдостероновую систему, с угнетением секреции инсулина и усилением инсулинорезистентности. Хроническое воспаление и нарушение иммунного ответа могут быть одними из основных механизмов ассоциации между СД 2-го типа и COVID-19. Важно определить системные воспалительные нарушения у больных СД 2-го типа, которые могут ассоциироваться с большей тяжестью заболевания и иметь негативное прогностическое значение. Цель работы – исследовать концентрацию некоторых цитокинов в сыворотке у больных СД 2-го типа, не инфицированных SARS-CoV-2.

В исследовании включено 20 пациентов с СД 2-го типа, контрольная группа – 11 клинически здоровых добровольцев. Концентрацию в сыворотке 13 цитокинов оценивали при помощи мультиплексного анализа на иммуноанализаторе MAGPIX-100 с использованием набора для мультиплексного анализа Merck (Германия) в соответствии с инструкцией фирмы.

Установлено повышение концентрации в сыворотке у больных СД 2-го типа по сравнению с контрольной группой ключевых провоспалительных цитокинов: CX3CL1, TNFα, IFNγ, IL-8, IL-17A, MIP-1α и MIP-1β. Выявлено снижение концентрации в сыворотке IL-4. Уровень в сыворотке у больных СД 2-го типа иммунорегуляторных цитокинов изменяется разнонаправленно: снижается IL-5, повышается IL-12p70, IL-17, не изменяется концентрация IL-2, IL-13.

Комплексный анализ концентрации цитокинов в сыворотке позволит повысить клиническую значимость оценки концентрации цитокинов в сыворотке в качестве прогностических и диагностических маркеров, терапевтической мишени при СД 2-го типа, в том числе и при инфицировании SARS-CoV-2.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, цитокины, SARS-CoV-2, корреляция

CYTOKINE SYSTEM IN THE PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS NON-INFECTED WITH SARS-CoV-2

Savchuk K.S.^a, Simbirtsev A.S.^b

^a Center for Obstetrics and Gynecology No. 1, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Diabetes mellitus (DM) is a common chronic non-communicable disease, being the most significant comorbidity in SARS-CoV-2 viral infection. The proportion of DM patients among those with COVID-19

Адрес для переписки:

Савчук Ксения Сергеевна
ООО «Центр акушерства и гинекологии № 1»
454048, Россия, г. Челябинск, ул. Яблочкина, 3.
Тел.: 8 (951) 452-19-69.
E-mail: ksenyasavchuk@gmail.com

Address for correspondence:

Savchuk Ksenia S.
Center for Obstetrics and Gynecology No. 1
454048, Russian Federation, Chelyabinsk, Yablochkin str., 3
Phone: 7 (951) 452-19-69.
E-mail: ksenyasavchuk@gmail.com

Образец цитирования:

К.С. Савчук, А.С. Симбирцев «Показатели системы цитокинов у больных сахарным диабетом 2-го типа, не инфицированных SARS-CoV-2» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 295–298.
doi: 10.46235/1028-7221-1129-CSI

© Савчук К.С., Симбирцев А.С., 2022

For citation:

K.S. Savchuk, A.S. Simbirtsev “Cytokine system in the patients with type 2 diabetes mellitus non-infected with SARS-CoV-2”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 295–298.
doi: 10.46235/1028-7221-1129-CSI

DOI: 10.46235/1028-7221-1129-CSI

is up to 25.0% in the Russian Federation. In presence of DM, clinical course of COVID-19 is characterized by greater severity and persistence of pulmonary damage, an increased need for immunosuppressive, glucocorticoid and combined antiviral therapy in COVID-19 patients, and with prolonged rehabilitation period. Pathogenetic effects of DM on severe course of the SARS-CoV-2 viral infection are being actively studied. The following factors were considered, e.g., negative impact of hyperglycemia on the course of infection; direct cytotoxic and indirect damage to pancreatic β -cells with further activation of pro-inflammatory mechanisms; cumulation and progression of generalized inflammation common to DM and COVID-19 including impaired production of cytokines; influence of SARS-CoV-2 virus on the renin-angiotensin-aldosterone system causing inhibition of insulin secretion and increased insulin resistance. Chronic inflammation and impaired immune response may be among the main mechanisms of association between type 2 DM (T2DM) and COVID-19. It is important to identify systemic inflammatory disorders in patients with type 2 diabetes, which may be associated with greater disease severity, being of negative prognostic value. The aim of the present work was to investigate concentrations of some serum cytokines in the patients with type 2 diabetes not infected with SARS-CoV-2.

The study included 20 patients with type 2 diabetes; the control group consisted of 11 clinically healthy volunteers. The serum concentration of 13 cytokines was assessed by multiplex analysis on a MAGPIX-100 immunoanalyzer using a Merck multiplex analysis kit (Germany), in accordance with the manufacturer's instructions.

Increased serum concentrations in T2DM patients were found, as compared with the control group for some key pro-inflammatory cytokines: CX3CL1, TNF α , IFN γ , IL-8, IL-17A, MIP-1 α , and MIP-1 β . We have also revealed a decrease in serum concentrations of IL-4. Serum immunoregulatory cytokines in the T2DM were found to be changed in different directions: a decrease in IL-5, along with increase of IL-12p70 and IL-17, whereas the serum contents of IL-2, IL-13 did not change.

A comprehensive analysis of serum cytokine concentrations may increase clinical significance of assessing serum cytokine concentrations as prognostic and diagnostic markers, as well as therapeutic targets in type 2 DM, like as in SARS-CoV-2 infection.

Keywords: diabetes mellitus type 2, cytokines, SARS-CoV-2, correlation

Введение

Согласно последним данным, численность больных сахарным диабетом (СД) в мире за последние 10 лет увеличилась более чем в 2 раза и к концу 2019 г. превысила 463 млн человек. В РФ на 01.01.2021 г. больных с СД 4,79 млн (3,23% населения), из них 4,43 млн – с СД 2-го типа [1]. Согласно современным представлениям, в патогенезе СД 2-го типа имеют значение провоспалительные и противовоспалительные цитокины и хемокины. Так, с повышением концентрации провоспалительных цитокинов в крови многие исследователи связывают инсулинорезистентность при СД2, а также появление и утяжеление сосудистых осложнений. Цитокины вызывают дисфункцию эндотелия с повышением экспрессии молекул адгезии и продукции хемокинов, миграции моноцитов, нейтрофилов, лимфоцитов в очаг атеросклеротического поражения. Развитие сердечно-сосудистых катастроф, связанных с дестабилизацией атеросклеротических бляшек, реализуется за счет индукции апоптоза, деградации внеклеточного матрикса, что ведет к разрыву бляшки и образованию тромба. При новой коронавирусной инфекции (COVID-19) сопутствующий СД 2-го типа отягощает течение и ухудшает исход COVID-19. Активно изучаются особенности патогенеза тяжелого течения вирусной инфекции SARS-CoV-2 при СД и включают взаимное наложение и усугубление характерных для СД и COVID-19 системных воспалительных сдвигов, включая нарушения продукции цитокинов. На данный момент в литературе представлены многочисленные, зачастую противоречивые сведения об изменении концентрации в сыворотке цитокинов, имеющих значение в патогенезе

СД 2-го типа. Комплексный анализ концентрации цитокинов в сыворотке позволит повысить клиническую значимость оценки концентрации цитокинов в сыворотке в качестве прогностических и диагностических маркеров, терапевтической мишени при СД 2-го типа до инфицирования SARS-CoV-2.

Цель работы – исследовать цитокиновый профиль в крови у больных СД 2-го типа, не инфицированных SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Исследование проведено на 20 пациентах (5 мужчинах и 15 женщинах) с СД 2-го типа в возрасте 54,0 (49,0; 57,0) лет в отделении эндокринологии МАУЗ ОТКЗ ГКБ № 1 г. Челябинска.

Критерии включения: СД 2-го типа и подписанное информированное добровольное согласие. Критерии исключения: наличие подтвержденного инфицирования SARS-CoV-2 в анамнезе, острые нарушения мозгового и коронарного кровообращения, лимфопролиферативные заболевания, злокачественные новообразования. Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России. Все пациенты, включенные в исследование, получали сахароснижающую терапию. Только пероральную сахароснижающую терапию (группа бигуанидов, сульфонилмочевины) получали 11 (55,0%) пациента, сочетание пероральной сахароснижающей терапии и инсулинотерапии – 8 (40,0%) пациентов, только инсулинотерапию – 1 (5,0%) пациентов. Контрольную группу составили клинически здоровые добровольцы (груп-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)
TABLE 1. SERUM CYTOKINE CONCENTRATION, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Measures	Группа здоровых добровольцев Group of healthy volunteers (n = 11)	Группа больных СД 2-го типа Group of patients with DM type 2 (n = 20)	p
CX3CL1, пг/мл CX3CL1, pg/mL	23,400 (19,770-27,000)	30,680 (27,630-38,695)	$p_1 < 0,050$
GM-CSF, пг/мл GM-CSF, pg/mL	3,210 (1,190-5,310)	4,675 (2,825-6,863)	$p_1 < 0,050$
IFNγ, пг/мл IFN γ , pg/mL	3,860 (3,720-5,630)	5,570 (3,888-7,700) 6,043 \pm 0,407	$p < 0,050$
IL-2, пг/мл IL-2, pg/mL	0,635 (0,595-0,730)	0,650 (0,558-0,863)	$p = 0,269$
TNFα, пг/мл TNF α , pg/mL	3,000 (2,320-3,400)	4,375 (3,380-5,048)	$p < 0,050$
IL-12p70, пг/мл IL-12p70, pg/mL	0,820 (0,690-1,270)	1,445 (1,308-1,680)	$p < 0,050$
IL-17A, пг/мл IL-17A, pg/mL	3,170 (1,940-4,040)	3,700 (2,160-5,745)	$p < 0,050$
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	5,700 (3,250-8,340) 6,763 \pm 1,000	7,905 (6,913-14,085) 10,327 \pm 0,879	$p < 0,050$
IL-5, пг/мл IL-5, pg/mL	1,460 (0,980-2,210) 1,892 \pm 0,333	0,935 (0,500-1,900) 1,178 \pm 0,119	$p < 0,050$
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	11,960 (10,540-16,700) 15,495 \pm 1,707	7,675 (4,943-12,680) 10,433 \pm 1,660	$p < 0,050$
IL-13, пг/мл IL-13, pg/mL	2,240 (1,210-3,330) 2,679 \pm 0,379	1,240 (0,728-2,013) 1,441 \pm 0,140	$p < 0,050$
MIP-1α, пг/мл MIP-1 α , pg/mL	2,445 (1,580-3,490) 2,688 \pm 0,284	4,200 (3,298-4,980) 4,577 \pm 0,311	$p < 0,050$
MIP-1β, пг/мл MIP-1 β , pg/mL	4,830 (2,410-7,810) 5,177 \pm 0,516	10,000 (6,588-14,110) 10,242 \pm 0,783	$p < 0,050$

па 1, n = 11), сопоставимые по возрасту и полу с основной группой. Диагноз СД соответствовал Алгоритмам специализированной медицинской помощи больным СД (2019).

Концентрацию в сыворотке 13 цитокинов: CX3CL1, GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, TNF α , MIP-1 α , MIP-1 β оценивали при помощи мультиплексного анализа на иммуноанализаторе MAGPIX-100 с использованием набора для мультиплексного анализа "Merck" (Германия) в соответствии с инструкцией фирмы. Результаты обрабатывали с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics, version 19.0. Описание выборок представлено в формате «Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)», где Me – медиана, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ – значение нижнего и верхнего квартиля соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием критериев Манна–Уитни. Для выявления взаимосвязей между параметрами

использовали коэффициент корреляции Спирмена. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Нами установлено повышение концентрации в сыворотке у больных СД 2-го типа по сравнению с контрольной группой ключевых провоспалительных цитокинов: CX3CL1, TNF α , IFN γ , IL-8, IL-17A, MIP-1 α и MIP-1 β (табл. 1). Наряду с этим, снижается концентрация в сыворотке IL-4. Согласно современным представлениям, СД 2-го типа является хроническим гетерогенным заболеванием воспалительной природы. Инсулинорезистентность как основной патогенетический механизм развития СД 2-го типа в том числе связана с эффектами провоспалительных цитокинов, хемокинов. Так, повышенный уровень в крови TNF α вызывает инсулинорезистентность в адипоцитах и периферических тканях, нарушая

передачу сигналов инсулина через фосфорилирование серина [4]. $IFN\gamma$, основным источником которого выступают $Th1$, ослабляет передачу сигналов инсулина, накопление липидов и дифференцировку в адипоцитах человека посредством активации пути JAK/STAT. По результатам мета-анализа, концентрация в сыворотке фракталкина (CX3CL1) у пациентов с СД 2-го типа значительно увеличивается [2]. MIP-1 α и MIP-1 β увеличивают хемотаксис, экспрессию интегринов и адгезию к эндотелиоцитам моноцитов и Т-клеток, усиливают пролиферацию, секрецию IL-2 и экспрессию его рецептора Т-клетками. IL-17 оказывает потенцирующее действие на воспаление в панкреатических островках и способствует деструкции бета-клеток CD8⁺ лимфоцитами [3, 5]. Снижение продукции IL-4 $Th2$ -лимфоцитами при СД 2-го типа может носить компенсаторный характер, ограничивать синтез макрофагами провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , активных форм кислорода, азота. Уровень в сыворотке у больных СД 2-го типа иммунорегуляторных цитокинов изменяется разнонаправ-

ленно: снижается IL-5, повышается IL-12p70, IL-17, не изменяется концентрация IL-2, IL-13. Ахмад и соавт. показали, что уровень IL-5 в плазме снижается у людей с СД, но повышается у больных с СД и ожирением [6]. Снижение секреции $Th2$ -зависимых цитокинов у пациентов с СД вносит вклад в формирование провоспалительного фенотипа.

Заключение

По результатам проведенного нами исследования при оценке 13 цитокинов сыворотки у больных СД 2 типа зафиксирован выраженный дисбаланс цитокинового профиля в сторону преобладания провоспалительных цитокинов (CX3CL1, GM-CSF, TNF α , IL-12p70, IL-8), ограничения противовоспалительного цитокина IL-5. В дальнейшем планируется изучение звеньев патогенеза СД и выявление схожих изменений при COVID-19 и механизмов их взаимного отягощения – ключевой фактор для прогнозирования осложнений и обоснования оптимального лечения сочетанной патологии.

Список литературы / References

1. Дедов И.И., Шестакова М.В., Майоров А.Ю., Викулова О.К., Галстян Г.Р., Кураева Т.Л., Петеркова В.А., Смирнова О.М., Старостина Е.Г., Суркова Е.В., Сухарева О.Ю., Токмакова А.Ю., Шамхалова М.Ш., Ярек-Мартынова И.Р., Артемова Е.В., Бешлиева Д.Д., Бондаренко О.Н., Волеводз Н.Н., Григорян О.Р., Гомова И.С., Джемилова З.Н., Есаян Р.М., Ибрагимова Л.И., Калашников В.Ю., Кононенко И.В., Лаптев Д.Н., Липатов Д.В., Мотовилин О.Г., Никонова Т.В., Роживанов Р.В., Шестакова Е.А. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова. 9-й выпуск // Сахарный диабет, 2019. Т. 22, № 1S1. С. 1-144. [Dedov I.I., Shestakova M.V., Mayorov A.Y., Vikulova O.K., Galstyan G.R., Kuraeva T.L., Peterkova V.A., Smirnova O.M., Starostina E.G., Surkova E.V., Sukhareva O.Y., Tokmakova A.Y., Shamkhalova M.S., Jarek-Martynova I.R., Artemova E.V., Beshlieva D.D., Bondarenko O.N., Volevodz N.N., Grigoryan O.R., Gomova I.S., Dzhemilova Z.N., Esayan R.M., Ibragimova L.I., Kalashnikov V.Y., Kononenko I.V., Laptev D.N., Lipatov D.V., Motovilin O.G., Nikonova T.V., Rozhivanov R.V., Shestakova E.A. Standards of specialized diabetes care. Edited by Dedov I.I., Shestakova M.V., Mayorov A.Yu. 9th edition. *Sakharnyyy diabet = Diabetes Mellitus*, 2019, Vol. 22, no. 1S1, pp. 1-144. (In Russ.)]
2. Abdel-Moneim A., Bakery H.H., Allam G. The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, Vol. 101, pp. 287-292.
3. Pan X., Kaminga A.C., Wen S.W., Liu A. Chemokines in prediabetes and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 622438. doi: 10.3389/fimmu.2021.622438.
4. Pirola L., Ferraz J.C., World J. Role of pro- and anti-inflammatory phenomena in the physiopathology of type 2 diabetes and obesity. *Biol. Chem.*, 2017, Vol. 8, no. 2, pp. 120-128.
5. Schinzari F., Tesaro M., Campia U., Cardillo C. Vasc. Pharmacol. Increased fractalkine and vascular dysfunction in obesity and in type 2 diabetes. Effects of oral antidiabetic treatment. *Vascul. Pharmacol.*, 2020, Vol. 128-129, 106676. doi: 10.1016/j.vph.2020.106676.
6. Ye J., Wang Y., Wang Z., Liu L., Yang Z., Wang M., Xu Y., Ye D., Zhang J., Lin Y., Ji Q., Wan J. Roles and mechanisms of interleukin-12 family members in cardiovascular diseases: opportunities and challenges. *Front. Pharmacol.*, 2020, Vol. 11, 129. doi: 10.3389/fphar.2020.00129.

Авторы:

Савчук К.С. — врач-эндокринолог ООО «Центр акушерства и гинекологии № 1», г. Челябинск, Россия
Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий лабораторией медицинской биотехнологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Savchuk K.S., Clinical Endocrinologist, Center for Obstetrics and Gynecology No. 1, Chelyabinsk, Russian Federation
Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Medical Biotechnology, Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 14.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 14.05.2022
Accepted 29.05.2022

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ КАК БИОМАРКЕРЫ "INFLAMM-AGEING"

Садек А.¹, Храмцова Ю.С.², Юшков Б.Г.²

¹ ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

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

Резюме. Считается, что большинство механизмов старения в той или иной степени связаны с воспалением. С возрастом развивается уникальная форма хронического воспаления – "inflamm-ageing". Механизм развития этого явления на сегодняшний день до конца не ясен из-за отсутствия надежных критериев его оценки. Одной из систем, участвующих в ускорении возрастных изменений в организме, является иммунная система. Она же принимает непосредственное участие в процессе воспаления. В патогенезе последнего одно из центральных мест занимает реакция тучных клеток. Особого внимания заслуживает роль тучных клеток в ремоделировании тканей, что является основной характеристикой проблем старения. Таким образом, процесс старения может повлиять на функцию тучных клеток, а тучные клетки, в свою очередь, могут ускорить процесс старения, что в итоге и приведет к развитию различных возрастных заболеваний. Все это дает основание рассматривать "inflamm-ageing" в качестве одного из показателей старения, а тучные клетки как индикатор этого процесса. С целью проверки предложенной гипотезы проведено исследование по определению возрастных морфофункциональных изменений популяций тучных клеток в различных органах у крыс. На разновозрастных (4 месяца и 2 года) крысах самцах линии Wistar проведена оценка морфофункциональных параметров тучных клеток (количество, синтетическая и функциональная активность, степень созревания) в разных органах животных. В тимусе, надпочечниках и коже с возрастом наблюдается снижение количества тучных клеток и их синтетической активности при значительном повышении их функциональной активности. В желудке, тонком и толстом кишечнике при неизменном количестве тучных клеток отмечается снижение их синтетической и увеличение функциональной активности. Данные изменения приводят к увеличению среднего размера кровеносных сосудов в исследуемых органах. Печень – единственный орган, в котором с возрастом не происходит изменений тучных клеток. При старении наблюдается тенденция увеличения количества незрелых тучных клеток в органах, что указывает на снижение скорости их созревания. Таким образом, в процессе старения происходят изменения количественных и качественных показателей тучных клеток в различных органах у животных. При этом наибольшие изменения наблюдаются в органах, непосредственно участвующих в стресс-реакциях. Данные изменения тучных клеток играют важную роль в формировании феномена "inflamm-ageing", которое происходит при старении, т. к. данные клетки являются неотъемлемым компонентом воспалительных реакций. Развитие этого феномена приводит к накоплению цитокинов и провоспалительных медиаторов в тканях, которые, в свою очередь, и активируют тучные клетки. В то же время повышенная дегрануляция мастоцитов может усиливать процесс "inflamm-ageing". Отмеченное взаимное влияние тучных клеток и "inflamm-ageing" дает возможность рассматривать мастоциты в качестве потенциальных кандидатов в биомаркеры "inflamm-ageing".

Ключевые слова: тучные клетки, дегрануляция, воспаление, старение, ремоделирование тканей, стресс

Адрес для переписки:

Храмцова Юлия Сергеевна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (343) 374-00-70.
E-mail: hramtsova15@mail.ru

Address for correspondence:

Khramtsova Yulia S.
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,
Russian Academy of Sciences
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,
Pervomayskaya str., 106.
Phone: 7 (343) 374-00-70.
E-mail: hramtsova15@mail.ru

Образец цитирования:

А. Садек, Ю.С. Храмцова, Б.Г. Юшков «Тучные клетки как биомаркеры "inflamm-ageing"» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 299-304. doi: 10.46235/1028-7221-1107-MCA

© Садек А. и соавт., 2022

For citation:

A. Sadek, Yu.S. Khramtsova, B.G. Yushkov "Mast cells as biomarkers of inflamm-ageing", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 299-304. doi: 10.46235/1028-7221-1107-MCA

DOI: 10.46235/1028-7221-1107-MCA

MAST CELLS AS BIOMARKERS OF INFLAMM-AGEING

Sadek A.^a, Khramtsova Yu.S.^b, Yushkov B.G.^b

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

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

Abstract. Most mechanisms of ageing are believed to be more or less associated with inflammation. With age, a unique form of chronic inflammation develops which is termed as “inflamm-ageing”. The mechanisms of this process are still not fully clear due to the lack of reliable assessment criteria. Immune system is among those involved in accelerating age-related changes in the body. It also directly participates in the process of inflammation. In its pathogenesis, the reaction of mast cells may be of great importance. The role of mast cells in tissue remodeling deserves special attention, since the latter event is among the main features associated with ageing. Hence, the “inflamm-ageing” is considered a sufficient indicator of ageing, and the mast cells could provide biomarkers of this process. In order to test the proposed hypothesis, the present study was conducted to determine age-related morpho-functional changes in mast cell populations in various organs in rats. Some morpho-functional parameters of mast cells (number, synthetic and functional activity, degree of maturation) in different animal organs were evaluated in male Wistar rats of different ages (4 months and 2 years). We have found the age-dependent changes upon examination of thymus, adrenal glands, and skin, i.e., a decrease in the number of mast cells and their synthetic capacity, along with significantly increased functional activity. In the stomach, small and large intestines, at the constant number of mast cells, we revealed a decrease in their synthetic ability, and increased functional activity. These changes were accompanied by enlargement of blood vessels in the studied organs. Liver is the only organ which did not exhibit any changes in mast cell populations with age. The detected changes in mast cell populations may play an important role in formation of “inflamm-ageing” events, which accompany the ageing processes, because these cells are an integral component of inflammatory response. The progression of “inflamm-ageing” leads to accumulation of cytokines and pro-inflammatory mediators in tissues, which, in turn, activate the mast cells. At the same time, increased degranulation of mastocytes may promote the process of “inflamm-ageing”. The observed mutual influence of mast cells and “inflamm-ageing” makes it possible to consider mastocytes as potential candidates for searching the biomarkers in “inflamm-ageing”.

Keywords: mast cells, degranulation, inflamm-ageing, aging, tissue remodeling, stress

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

Введение

Увеличение продолжительности жизни сопровождается целым комплексом возрастных изменений, в основе которых лежит прогрессирующая неспособность клеток исправлять все ошибки, происходящие в ДНК, что приводит к накоплению мутаций и, в итоге, к изменению функции клеток [5]. Считается, что большинство механизмов старения в той или иной степени связаны с воспалением и с возрастом развивается уникальная форма хронического воспаления – “inflamm-ageing” [2]. Механизм развития этого явления на сегодняшний день до конца не ясен из-за отсутствия надежных критериев его оценки.

Одной из систем, участвующих в ускорении возрастных изменений в организме, является иммунная система. Она же принимает непосред-

ственное участие в процессе воспаления. В патогенезе последнего одно из центральных мест занимает реакция тучных клеток (ТК). Особого внимания заслуживает роль ТК в ремоделировании тканей [4], что является основной характеристикой проблем старения. Процесс ремоделирования ткани ТК происходит из-за действия медиаторов, которые высвобождаются ТК в процессе дегрануляции. Любой дефект в процессе дегрануляции может привести к ремоделированию ткани и вызвать ее повреждение, которое приведет к нарушению функции тканей и органов. Таким образом, процесс старения может повлиять на функцию ТК, а ТК, в свою очередь, могут ускорить процесс старения, что в итоге и приведет к развитию различных возрастных заболеваний. Это дает основание рассматривать “inflamm-ageing” в качестве одного из показателей старения, а ТК как индикатор этого процесса.

С целью проверки предложенной гипотезы и было проведено данное исследование по опре-

делению возрастных морфофункциональных изменений популяций тучных клеток в различных органах у крыс.

Материалы и методы

Исследование проведено на половозрелых крысах-самцах линии Wistar. Животных содержали по 5 в клетке, при температуре 20-22 °С и в свободном доступе к воде и пище. Экспериментальные животные в условиях опыта были разделены на 2 группы: 1) интактные животные в возрасте четырех месяцев ($n = 6$), который соответствует 14-15 годам жизни человека; 2) интактные животные в возрасте двух лет ($n = 11$), который соответствует 60 годам жизни человека. Животных выводили из эксперимента путем передозировки диэтилового эфира. Для гистологического исследования брали следующие органы: тимус, кожу, надпочечники, печень, желудок, тонкий и толстый кишечник. После стандартной гистологической проводки на автомате закрытого типа Shandon Excelsior (MICROM International GmbH, Германия) материал заливали в парафин с помощью станции для заливки биологических тканей парафином ЕС 350. После этого полученные парафиновые блоки нарезали на полуавтоматическом микротоме Thermo scientific Microm HM 450 (MICROM International GmbH, Германия), толщина срезов семенников составляла 4-5 мкм.

Для морфометрических исследований препараты окрашивали гематоксилин-эозином, толуидиновым синим для выявления ТК, оценки их количества и функций, альциановым синим – сафранином для определения степени зрелости ТК. Оценку различных показателей проводили на световом микроскопе Leica DM 5000 B (Leica, Германия), оснащенный камерой Leica DFC 490 (Leica, Германия). Подсчет количественных показателей проводили с использованием программы ImageJ.

Оценка синтетической активности ТК

ТК были классифицированы на 4 типа. К 1-му типу относили клетки с малым содержанием гранул секрета в цитоплазме, который располагается околочелювочно. Тип 2 – клетки с хорошо дифференцированной гранулярностью в цитоплазме и диффузным расположением гранул. Тип 3 – крупные клетки с плотным и диффузным расположением гранул в цитоплазме. К типу 0 относили дегранулированные клетки с признаками нарушения целостности цитоплазматической мембраны и выделения в окружающее тканевое пространство цитоплазматических гранул. Синтетическую активность оценивали с использованием среднего гистохимического коэффициента (СГК), по формуле:

$$\text{СГК} = (3n + 2n + 1n + 0n) / 100,$$

где n – число клеток типа 3, 2, 1 или 0, согласно классификации, приведенной выше, 100 – общее число подсчитанных клеток в группе.

Оценка функциональной активности ТК

Для оценки функциональной активности по выбросу гранул ТК в межклеточное пространство использовали индекс дегрануляции (ИД, %), который рассчитывали по формуле:

$$\text{ИД} = \frac{Д}{Д + Н} \times 100\%,$$

где $Д$ – количество тучных клеток с явными признаками дегрануляции (0-й тип), $Н$ – количество неактивированных тучных клеток.

Оценка зрелости ТК

С использованием окраски альциановый синий – сафранин ТК были разделены на 3 группы: 1) наименее зрелые ТК, характеризующиеся наличием в цитоплазме гранул, окрашенных в синий цвет вследствие сродства их компонентов исключительно к альциановому синему (Alc+ гранулы); 2) клетки промежуточной степени зрелости (имеют фиолетовую окраску), содержащие в цитоплазме как Alc+ гранулы, так и Saf+ гранулы, окрашенные в красный цвет вследствие сродства их компонентов к сафранину; 3) наиболее зрелые ТК, содержащие в цитоплазме исключительно Saf+ гранулы, что придает цитоплазме данных клеток ярко-красную или ярко-малиновую окраску.

Для определения влияния возрастных морфофункциональных изменений тучных клеток на кровеносные сосуды в тканях были сделаны микрофотографии препаратов с помощью камеры Levenhuk M1400 Plus (Levenhuk, США), затем были определены длины большой и малой полуосей и вычислена площадь каждого кровеносного сосуда.

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

Результаты и обсуждение

В работе были исследованы морфофункциональные параметры тучных клеток и кровеносных сосудов различных органов у двух разновозрастных групп: молодых и старых животных.

Тимус

В тимусе животных с возрастом наблюдается снижение общего количества ТК, их синтетической активности, в то время как функциональная активность этих клеток значительно увеличивается (табл. 1). Наблюдаемое уменьшение количества ТК может быть результатом общего воз-

ТАБЛИЦА 1. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТК В ИССЛЕДУЕМЫХ ОРГАНАХ У ЖИВОТНЫХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

TABLE 1. MORPHO-FUNCTIONAL PARAMETERS OF MAST CELLS IN STUDIED ORGANS IN ANIMALS OF DIFFERENT AGES

	Количество ТК в 1 мм ² органа Number of MCs in 1 mm ² of the organ		СГК (усл. ед.) IHC (с. у.)		ИД (%) DI (%)	
	Молодые Young	Старые Old	Молодые Young	Старые Old	Молодые Young	Старые Old
Тимус Thymus	141,50±19,00	88,09±11,38*	2,309±0,120	1,864±0,110*	2,650±1,490	11,114±2,820*
Надпочечник Adrenal gland	46,17±9,53	33,40±5,70	2,330±0,120	1,440±0,970*	2,552±1,210	18,155±4,130*
Желудок Stomach	51,50±2,36	49,73±5,04	2,227±0,080	2,022±0,050*	1,530±0,870	7,291±1,250*
Тонкий кишечник Small bowels	13,50±6,07	10,36±2,56	2,33±0,11	1,72±0,10*	1,12±0,73	10,84±2,18*
Толстый кишечник Large bowels	19,33±9,24	10,73±2,79	2,53±0,11	1,59±0,16*	0,80±0,54	11,68±2,53*
Кожа Skin	192,50±17,77	114,64±9,73*	2,518±0,070	2,080±0,090*	1,846±0,560	7,934±1,390*
Печень Liver	11,83±6,52	17,91±3,37	2,215±0,230	1,876±0,110	11,667±8,330	16,967±4,400

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

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

растного снижения функции и продуктивности иммунной системы [7, 9]. Следует отметить, что данный результат не соответствует некоторым исследованиям, в которых была обнаружена обратная тенденция, заключающаяся в увеличении количества ТК в тимусе с возрастом [8]. Изменения функциональной активности ТК, которые проявляются в увеличении дегрануляции, могут быть вызваны процессом "inflamm-ageing". При этом происходит накопление медиаторов воспаления в тканях, что в свою очередь может привести к активации ТК [3]. В тимусе у старых животных имеется тенденция к росту числа незрелых ТК, в то время как количество зрелых и промежуточных клеток уменьшается, т. е. с возрастом все меньше клеток созревает в органе, что, по-видимому, связано со снижением уровня ростовых факторов в ткани (рис. 1).

Надпочечники

В надпочечниках животных с возрастом не меняется количество ТК, но при этом значительно снижается СГХ и увеличивается ИД (табл. 1). Эти результаты показывают, что ТК могут играть важную роль в возрастных изменениях, происходящих в надпочечниках. Повышенная дегрануляция ТК может быть связана с общим дефек-

том иммунной системы, который развивается в процессе старения, а также с реакцией ТК на норадреналин, выделяемый в ответ на различные стрессовые факторы, количество которых с возрастом увеличивается. Норадреналин может связываться с α -рецепторами тучных клеток и вызывать их дегрануляцию [1].

Желудок

В желудке возрастной разницы в общем количестве ТК не наблюдается. Однако у старых животных отмечается увеличение дегрануляции и снижение синтетической активности ТК (табл. 1). Кроме этого, у старых животных наблюдается значительное увеличение количества незрелых ТК и уменьшение промежуточных клеток, что свидетельствует о замедлении процесса созревания данных клеток в органе (рис. 1).

Кишечник

В тонком и толстом кишечнике получены схожие результаты по морфометрическим показателям ТК. В кишечнике не наблюдается изменений в общем количестве ТК с возрастом, при этом отмечается значительное снижение синтетической функции ТК на фоне увеличения их дегрануляции (табл. 1). Данные по возрастной стимуляции функциональной активности ТК схожи с резуль-

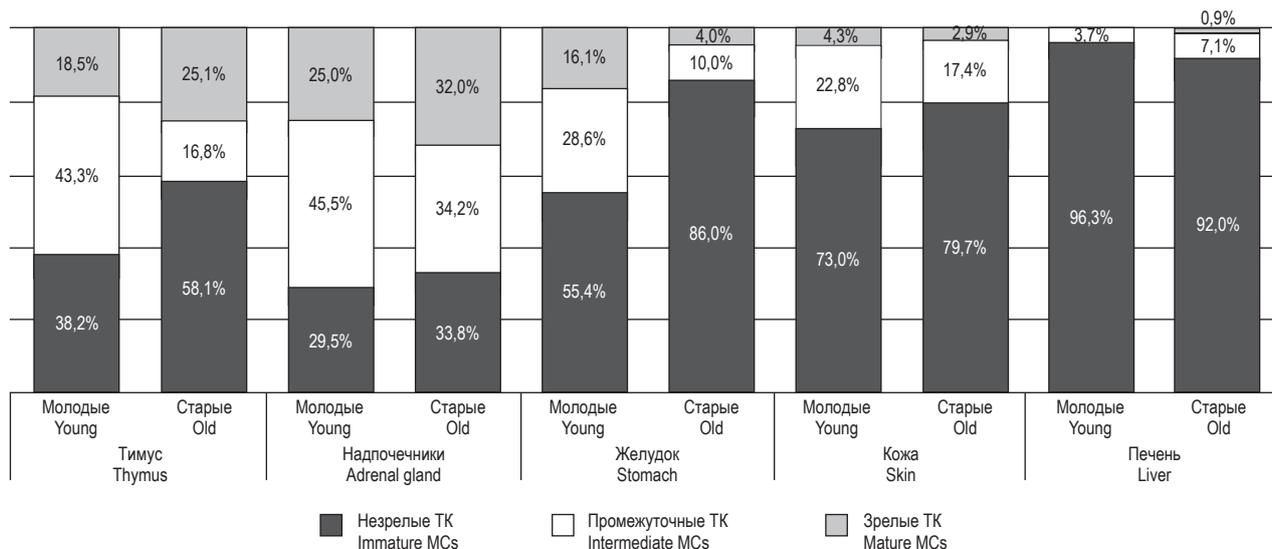


Рисунок 1. Распределение ТК по степени зрелости в органах животных разного возраста

Figure 1. Distribution of MCs by their degree of maturity in the organs of animals of different ages

татами других исследований. Такой повышенный уровень дегрануляции в кишечнике старых животных может быть результатом хронического системного провоспалительного состояния, которое происходит из-за повышения уровня провоспалительных цитокинов, включая IL-1, IL-6, IL-12, TNF α , IFN α , IFN β [6, 11].

Кожа

В коже с возрастом наблюдается снижение общего количества ТК и их синтетической активности при одновременном увеличении дегрануляции (табл. 1). Уменьшение количества ТК в коже может быть результатом снижения экспрессии фактора стволовых клеток в этом органе, наблюдаемом при старении [10]. Разницы в созревании ТК в данной ткани не наблюдается (рис. 1). Результаты по ТК кожи выглядят аналогично тем, которые получены в органах, участвующих непосредственно в стресс-реакциях, особенно в тимусе. Это объясняется тем, что кожа выполняет защитную функцию, в том числе и от влияния различных стрессовых факторов, и при этом очень богата ТК, которые отвечают на возрастные изменения повышением функциональной активности.

Печень

В печени, в отличие от других исследуемых органов, различия в ТК между молодыми и старыми животными не фиксируются (табл. 1). Это может быть обусловлено несколькими причинами. Так, их количество в печени изначально у молодых животных не велико и этого постоянного количества ТК в органе, характеризующихся постепенной небольшой дегрануляцией, достаточно для реализации регуляторных влияний на клетки печени. При этом отмечено, что большинство

ТК в печени являются незрелыми (рис. 1), что свидетельствует о низкой скорости созревания ТК в данном органе вне зависимости от возраста животных. Это может быть связано с низким уровнем факторов в печени, стимулирующих их созревание.

Влияние ТК на сосуды исследуемых органов

Повышение дегрануляции ТК у старых животных во всех изучаемых органах влияет на кровеносные сосуды в них, приводя к увеличению их размеров. Данные изменения происходят во всех органах, кроме печени, в ответ на возрастные изменения популяций ТК. Как известно, кровеносные сосуды легко контролируются ТК, расположенными рядом с ними. Гистамин – медиатор ТК, участвующих в увеличении размера кровеносных сосудов и повышении их проницаемости. Данные изменения важны не только в норме, но и при повреждении тканей. Таким образом, ТК через изменения кровеносных сосудов принимают активное участие в повреждении и ремоделировании тканей, которые происходят с возрастом.

Заключение

В процессе старения происходят изменения количественных и качественных показателей ТК в различных органах у животных. При этом наибольшие изменения наблюдаются в органах, непосредственно участвующих в стресс-реакциях: тимус, надпочечники, ЖКТ. ТК, являясь неотъемлемым компонентом воспаления и одним из важных регуляторов кровеносных сосудов, принимают активное участие в повреждении и ремоделировании тканей, которые происходят с воз-

растом. Следовательно, ТК играют важную роль в формировании феномена "inflamm-ageing", развитие которого приводит к накоплению цитокинов и провоспалительных медиаторов в тканях, которые в свою очередь и активируют ТК [3]. В то же время повышенная дегрануляция ТК может усиливать сам процесс "inflamm-ageing". Таким образом, отмеченное взаимное влияние ТК и

"inflamm-ageing" дает возможность рассматривать ТК, как потенциальные кандидаты в биомаркеры "inflamm-ageing".

Благодарности

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

Список литературы / References

1. Baldwin A.L. Mast cell activation by stress. *Mast Cells – Humana Press*, 2006, pp. 349-360.
2. Franceschi C., Garagnani P., Parini P., Giuliani C., Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2018, Vol. 14, no. 10, pp. 576-590.
3. Franceschi C., Capri M., Monti D., Giunta S., Olivieri F., Sevini F., Panourgia M.P., Invidia L., Celani L., Scurti M., Cevenini E., Castellani G.C., Salvioli S. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech. Ageing Dev.*, 2007, Vol. 128, no. 1, pp. 92-105.
4. Legere S.A., Haidl I.D., Légaré J.-F., Marshall J.S. Mast cells in cardiac fibrosis: new insights suggest opportunities for intervention. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 580. doi: 10.3389/fimmu.2019.00580.
5. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*, 2013, Vol. 153, no. 6, pp. 1194-1217.
6. Magrone T., Jirillo E. The interaction between gut microbiota and age-related changes in immune function and inflammation. *Immun. Ageing*, 2013, Vol. 10, no. 1, pp. 1-6.
7. Montecino-Rodriguez E., Berent-Maoz B., Dorshkind K. Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 3, pp. 958-965.
8. Raica M., Cimpean A.M., Nico B., Guidolin D., Ribatti D. A comparative study of the spatial distribution of mast cells and microvessels in the foetal, adult human thymus and thymoma. *Int. J. Exp. Pathol.*, 2010, Vol. 91, no. 1, pp. 17-23.
9. Simon A.K., Hollander G.A., McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc. Biol. Sci.*, 2015, Vol. 282, no. 1821, 20143085. doi: 10.1098/rspb.2014.3085.
10. Wang Z., Wang Y., Bradbury N., Gonzales Bravo C., Schnabl B., di Nardo A. Skin wound closure delay in metabolic syndrome correlates with SCF deficiency in keratinocytes. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, pp. 1-12.
11. Yu Y., Daly D.M., Adam I.J., Kitsanta P., Hill C.J., Wild J., Shorthouse A., Grundy D., Jiang W. Interplay between mast cells, enterochromaffin cells, and sensory signaling in the aging human bowel. *Neurogastroenterol. Motil.*, 2016, Vol. 28, no. 10, pp. 1465-1479.

Авторы:

Садек Али — аспирант ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

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

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

Authors:

Sadek Ali, Postgraduate Student, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

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

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

Поступила 15.05.2022
Принята к печати 28.05.2022

Received 15.05.2022
Accepted 28.05.2022

ОГРАНИЧЕНИЕ МУТАГЕНЕЗА МИЕЛОКАРИОЦИТОВ ПРИ ОСТРОМ ВНЕШНЕМ ОБЛУЧЕНИИ КАК МЕХАНИЗМ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ МИЛИАЦИНА ПРИ РАДИАЦИОННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

Сарычева Ю.А.¹, Токарева А.А.¹, Шехтман А.Г.¹, Панфилова Т.В.¹,
Пименова Ю.С.¹, Митрофанов Р.А.², Фролов Б.А.¹

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

² ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер», г. Оренбург, Россия

Резюме. На модели острого тотального рентгеновского облучения белых беспородных мышей-самцов изучено антимуtagenное действие растительного тритерпеноида милиацина для характеристики его защитных свойств при радиационной иммуносупрессии. Использованы различные дозы облучения (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 Гр) для опытных (получавших милиацин) и контрольных (получавших растворитель для милиацина) животных. Милиацин вводился трехкратно, внутривентриально в разовой дозе 4,0 мг/кг с 24-часовыми интервалами между введениями, завершившимися за 1 сутки до облучения. Контрольные мыши получали растворитель по аналогичной схеме. В качестве тест-системы использовались миелокарициты, анализ которых проводился через 24 часа после облучения. Милиацин оказывал определенное защитное действие в виде ограничения постлучевой миелоабляции, снижения количества aberrантных клеток и общего числа aberrаций. Протективный эффект тритерпеноида находился в обратной зависимости от дозы облучения и был наиболее выражен при 0,5 Гр. Более высокие значения хроматидных aberrаций при дозах облучения: 1,0 и 2,0 Гр у животных опытной группы по сравнению с контрольной группой мышей могли быть обусловлены антиапоптотическим влиянием тритерпеноида, обеспечивающим большую выживаемость мутагенных клеток с грубыми повреждениями их генетического аппарата. Реализация милиацином защитного эффекта через 24 часа после лучевого воздействия свидетельствует о его влиянии на первичную радиационно-химическую стадию радиационного поражения. Предполагается, что механизм защитного действия тритерпеноида опосредован его ранее показанной антиоксидантной активностью, обусловленной способностью стабилизировать мембраны и нормализовывать экспрессию генов ферментов антиоксидантной защиты. Таким образом, проявление антимуtagenной активности милиацина при воздействии облучения является важной характеристикой его иммунопротекторного эффекта при радиационной иммуносупрессии. По способности ограничивать мутагенный эффект, милиацин может быть отнесен к слабым противолучевым антимутагенам с эффективностью защиты 20-40% в диапазоне доз 0,5-1,0 Гр.

Ключевые слова: миелокарициты, облучение, милиацин, антимуtagenная активность

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Ю.А. Сарычева, А.А. Токарева, А.Г. Шехтман, Т.В. Панфилова, Ю.С. Пименова, Р.А. Митрофанов, Б.А. Фролов «Ограничение мутагенеза миелокарицитов при остром внешнем облучении как механизм защитного действия милиацина при радиационной иммуносупрессии» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 305-312. doi: 10.46235/1028-7221-1149-LMO
© Сарычева Ю.А. и соавт., 2022

For citation:

Yu.A. Sarycheva, A.A. Tokareva, A.G. Shekhtman, T.V. Panfilova, Yu.S. Pimenova, R.A. Mitrofanov, B.A. Frolov "Limited mutagenesis of myelokaryocytes following acute external irradiation as a protective mechanism of miliacin in radiation-induced immunosuppression", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 305-312. doi: 10.46235/1028-7221-1149-LMO
DOI: 10.46235/1028-7221-1149-LMO

LIMITED MUTAGENESIS OF MYELOKARYOCYTES FOLLOWING ACUTE EXTERNAL IRRADIATION AS A PROTECTIVE MECHANISM OF MILIACIN IN RADIATION-INDUCED IMMUNOSUPPRESSION

Sarycheva Yu.A.^a, Tokareva A.A.^a, Shekhtman A.G.^a, Panfilova T.V.^a, Pimenova Yu.S.^a, Mitrofanov R.A.^b, Frolov B.A.^a

^a Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

^b Orenburg Regional Center of Clinical Oncology, Orenburg, Russian Federation

Abstract. Antimutagenic effect of the plant triterpenoid miliacin was studied, in order to characterize its protective properties in a model of acute irradiation immunosuppression using outbred male mice. Ionizing irradiation at different doses (0.5; 1.0; 2.0; 4.0 Gy) was used for experimental (miliacin-treated), and control animals that received the miliacin solvent. Miliacin was administered three times intraperitoneally at a single dose of 4.0 mg/kg with 24-hour intervals between injections. The last dose was applied 1 day before irradiation. Myelokaryocytes served as test objects, the analysis of which was carried out 24 hours after irradiation. Miliacin had a certain protective effect by limiting the post-radiation myeloablation, reducing the number of aberrant cells and the total number of aberrations. Protective effect of triterpenoids showed inverse relation to the radiation dose, being most pronounced at the dose of 0.5 Gy. Higher values of chromatid aberrations at radiation doses of 1.0 and 2.0 Gy in animals from the experimental group *versus* control mice, probably, due to anti-apoptotic effect of the triterpenoid, thus ensuring higher survival rates of mutated cells with severe damage to their genome. The protective effect of miliacin at 24 hours after radiation exposure may indicate its effect on the primary radiochemical stage of radiation injury. It is suggested that the mechanism of protective action of triterpenoid is mediated by its previously shown antioxidant activity, due to its ability to stabilize membranes and normalize expression of genes encoding antioxidant protection enzymes. Thus, the antimutagenic activity of miliacin after irradiation is an important characteristic of its immunoprotective effect during the radiation-induced immunosuppression. With respect to its ability to limit the mutagenic effect, miliacin may be classified as a weak radioprotective antimutagen with a protection efficiency of 20-40% at the dose range of 0.5 to 1.0 Gray.

Keywords: myelokaryocytes, irradiation, miliacin, antimutagenic activity

Введение

Ограничение повреждений генетического аппарата кроветворных клеток под действием факторов среды является приоритетным подходом к предупреждению вторичных иммунодефицитов и связанных с ними осложнений. Поскольку одним из существенных механизмов таких повреждений служит лучевое воздействие, разработка и скрининг противолучевых средств представляются актуальной задачей [6]. Известно, что эффективность этих средств определяется их способностью к блокаде оксидативного стресса и к активации кроветворения [10], т. е. к проявлению оксидомодуляторной и цитомодуляторной активности [7]. В значительной степени такому требованию соответствуют тритерпеноиды – представители изопреноидных соединений,

обладающие широким спектром биологического действия и практическим отсутствием побочных эффектов.

К настоящему времени показано защитное влияние синтетических (CDDO-Me и RTA-408) тритерпеноидов при радиационном поражении мышей, проявляющееся ускоренным восстановлением костномозговых клеток после миелоабляции и снижением гибели тотально облученных животных [13, 14]. Сигнальный путь, опосредующий эти эффекты, связывается с активацией Nrf-2 (Nuclear factor erythroid-2-related factor-2) – фактора транскрипции, индуцирующего механизмы репарации ДНК, антиоксидантной защиты и устойчивости к апоптозу. Обсуждается возможность включения и других сигнальных путей, включая сверхэкспрессию Noth-сигнала, поддерживающего баланс между дифференци-

ровкой и пролиферацией стволовых клеток и их потомков, а также индукцию энхансерсвязывающего белка ССАТ/enhancer-binding protein С, критичного для гранулоцитарной дифференцировки предшественников миелопоэза.

К числу разрабатываемых иммуномодуляторов относится милиацин (3-β-метокси-Δ18-олеанен), для которого в ранее выполненном исследовании был установлен относительно слабый антимуtagenный эффект в условиях его применения до воздействия ионизирующего излучения в дозе 4,0 Гр [8]. Учитывая, что эффективность антимутагена во многом определяется частотой индуцированных aberrаций [9], представляет интерес определение протективной активности тритерпеноида при разной интенсивности мутагенеза.

Целью работы является оценка антимутагенной активности милиацина при использовании различных доз ионизирующего излучения.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 56 особях беспородных мышей-самцов массой 20,0-22,0 г. Тотальное облучение животных проводили на установке «Рентген ТА 150/10» при напряжении 150 кВ, токе на трубке 5 мА, фильтре 0,5 Cu + 1,0Al, тубус прямоугольный 90 × 40 мм, КФР 300 мм. Мощность рентгеновского облучения – 1,43 Гр/100 сек., дозы облучения – 0,5 (45 мониторинговых единиц); 1,0 (79 м/ед); 2,0 (140 м/ед); 4,0 (276 м/ед) Гр. В качестве радиопротектора использован милиацин, полученный из просяного масла и очищенный перекристаллизацией из хлороформа. Для каждой дозы облучения использовали две группы животных: опытную и контрольную. Мышам опытной группы милиацин вводился трехкратно, внутрибрюшинно в разовой дозе 4,0 мг/кг в объеме 0,5 мл, с суточными интервалами между введениями, завершавшимися за 24 часа до облучения. Контрольные животные в эти же сроки подвергались внутрибрюшинному введению растворителя для милиацина: твина 21 ($1,6 \times 10^{-7}$ моль/кг) по аналогичной схеме. Фоновой группой сравнения служили интактные мыши. Количество животных в контрольной и опытной группах составляло 6; в фоновой группе – 8.

Животных опытной и контрольной групп выводили из эксперимента через 24 часа после облучения. За 1 час до забоя для фиксации хромосом в метафазе мышам внутрибрюшинно вводился 0,04% раствор колхицина (0,1 мл/10,0 г веса). Суспензию клеток костного мозга (КМ) получали вымыванием из бедренных костей 0,56% раствором КСI с подсчетом количества миелокариоцитов, изготовлением препаратов и их окраши-

ванием красителем Гимза. Анализ хромосомных нарушений выполняли методом световой микроскопии (10 × 10), исследуя клетки округлой формы с видимым разбросом хромосом и модульным числом 40. В каждом препарате подсчитывали 100 метафазных пластинок (МП), определяли относительное количество метафазных пластинок с aberrациями, общее число aberrаций, количество aberrаций на одну aberrантную пластинку, содержание хромосомных и хроматидных aberrаций. Уровень статистической значимости различий определяли непрямым дисперсионным анализом по критерию Краскела–Уоллиса и выражали в виде $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что содержание миелокариоцитов в бедренной кости у интактных животных находилось в пределах $16,6 \times 10^6$ клеток, что соответствует ранее полученным данным [1]. Эти же мыши характеризовались незначительным относительным содержанием aberrантных клеток (0,22%) и количеством aberrаций – 0,45 на 100 метафазных пластинок. Как следует из таблицы 1, облучение мышей контрольной группы сопровождалось снижением количества миелокариоцитов, интенсивность которого зависела от дозы облучения, составляя по отношению к показателю интактных животных, соответственно: 62,6% (0,5 Гр); 56,02% (1,0 Гр); 51,08% (2,0 Гр); 46,9% (4,0 Гр). На фоне падения общего пула клеток костного мозга отмечался рост содержания метафазных пластинок с aberrациями, а также количества самих aberrаций. Эти сдвиги также были пропорциональны дозе облучения с минимальными значениями соответственно: 54,0% (51,0÷57,0%) и 86,0 (82,0÷88,0) при 0,5 Гр и максимальными значениями: 95,0% (94,0÷96,0%) и 349,0 (341,0÷379,0) при 4,0 Гр. При этом рост числа aberrаций определялся не только увеличением количества aberrантных клеток, но и возрастанием числа самих aberrаций в одной aberrантной клетке с 1,6 (1,6÷1,8) при дозе облучения 0,5 Гр до 3,7 (3,6÷3,9) при дозе 4,0 Гр.

Предварительное введение милиацина не отменяло радиационно-индуцированной убыли миелокариоцитов, роста числа aberrантных пластинок и общего количества самих aberrаций. Сохранялась и динамика этих сдвигов, характеризовавшаяся прямой зависимостью от дозы облучения. Однако выраженность изменений данных параметров была значительно меньшей, чем у животных контрольной группы, составляя 40,0% (39,0÷41,0%) для относительного числа aberrантных клеток и 56,0 (53,0÷60,0) для обще-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ МИЛИАЦИНА НА МУТАГЕНЕЗ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, ИНДУЦИРОВАННОГО РАЗЛИЧНЫМИ ДОЗАМИ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. EFFECT OF MILIACIN ON THE MUTAGENESIS OF MOUSE BONE MARROW CELLS INDUCED BY VARIOUS DOSES OF X-RAY IRRADIATION Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Исследуемые параметры Investigated parameters	Группы животных Group name			
	0,5 Гр 0,5 Gy		1,0 Гр 1,0 Gy	
	контроль control	опыт experience	контроль control	опыт experience
Количество клеток КМ, 10 ⁶ Number of red bone cells, 10 ⁶	10,4 10,0-10,6	12,0* 11,4-12,6	9,3 9,2-9,4	10,2* 9,8-10,4
% метафазных пластинок с аберрациями % of metaphase plates with aberrations	54,0 51,0-57,0	40,0* 39,0-41,0	65,5 65,0-67,0	52,5* 51,0-53,0
Общее число аберраций Total number of aberrations	86,0 82,0-88,0	56,0* 53,0-60,0	107,0 103,0-120,0	85,5* 82,0-87,0
Количество аберраций в 1 аберрантной клетке Number of aberrations in 1 aberrant cell	1,6 1,4-1,7	1,4 1,4-1,5	1,6 1,6-1,8	1,6 1,6-1,7
Аберрации хромосомного типа (%) Chromosomal aberrations (%)	73,0 69,4-75,8	87,4* 83,3-88,9	27,3 25,0-30,5	12,9* 10,6-15,1
Аберрации хроматидного типа (%) Chromatid aberrations (%)	27,0 24,2-30,6	12,6* 11,1-16,7	72,7 69,5-75,0	87,1* 84,9-87,4
	2,0 Гр 2,0 Gy		4,0 Гр 4,0 Gy	
	контроль control	опыт experience	контроль control	опыт experience
Количество клеток КМ, 10 ⁶ Number of red bone cells, 10 ⁶	8,6 8,4-8,8	9,3* 8,9-9,6	7,8 6,9-8,0	8,3* 7,9-8,5
% метафазных пластинок с аберрациями % of metaphase plates with aberrations	76,5 76,0-77,0	63,5* 62,0-65,0	95,0 94,0-96,0	83,0* 80,0-85,0
Общее число аберраций Total number of aberrations	179,5 169,0-182,0	140,5* 138,0-142,0	349,0 341,0-379,0	293,0* 285,0-295,0
Количество аберраций в 1 аберрантной клетке Number of aberrations in 1 aberrant cell	2,4 2,2-2,4	2,2 2,2-2,3	3,7 3,6-3,9	3,5 3,4-3,7
Аберрации хромосомного типа (%) Chromosomal aberrations (%)	23,6 20,7-26,0	14,7* 12,7-18,5	4,8 4,3-4,9	2,8 1,7-4,4
Аберрации хроматидного типа (%) Chromatid aberrations (%)	76,4 74,0-79,3	85,3* 81,5-87,3	95,2 95,1-95,7	97,2 92,3-98,7

Примечание. * – p < 0,05.

Note. *, p < 0.05.

го количества aberrаций при дозе 0,5 Гр и 83,0% (80,0÷85,0%) и 293,0 (285,0÷295,0) при дозе облучения 4,0 Гр. Это обстоятельство свидетельствовало о протективном действии тритерпеноида. Существенно, что эффективность такой протекции убывала по мере увеличения дозы облучения. Так, относительное превышение количества миелокариоцитов в опытной группе животных по сравнению с контрольной составило: 15,4%; 9,6%; 8,1%; 6,4% при дозах облучения, соответственно, 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 Гр. Аналогичный характер изменений соотношения показателей опыт/контроль зарегистрирован и для относительного содержания aberrантных клеток, количество которых у мышей опытных групп, по отношению к контролю, при данных дозах облучения было снижено на: 26,0%; 19,1%; 17,01%; и 12,7%. Для показателя общего числа aberrаций уровень защиты при этих же дозах составил: 34,9%; 20,1%; 21,8% и 16%. Обращает на себя внимание, что милиацин не оказывал влияния на показатель количества aberrаций в одной aberrантной клетке, который у мышей опытной группы не отличался от контрольных животных при всех дозах облучения.

Оценка распределения хромосомных и хроматидных aberrаций среди мышей контрольной и опытной групп показала, что при минимальной дозе облучения (0,5 Гр) в обеих группах доминировали aberrации хромосомного типа, составляя, соответственно, 73,0% (69,4÷75,8%) и 87,4% (83,3÷88,9%). Однако уже при дозе облучения 1,0 Гр регистрировалось преобладание aberrаций хроматидного типа, составившее 72,7% (69,5÷75,0%) в контроле и 87,1% (84,9÷87,4%) в опыте. При дозе 2,0 Гр эти показатели существенно не менялись, достигая максимальных значений при дозе облучения 4,0 Гр, когда относительное содержание aberrаций хроматидного типа в контрольной и опытной группах составило 95,2% (95,1÷95,7%) и 97,2% (92,3÷98,7%).

Обсуждая полученные результаты, важно отметить, что милиацин оказывал определенный защитный эффект в условиях радиационного воздействия, выразившийся в ограничении убыли миелокариоцитов, снижении содержания aberrантных клеток и общего числа aberrаций. Для всех указанных параметров выраженность защиты находилась в обратной зависимости от дозы облучения с максимальными различиями между опытной и контрольной группами при дозе 0,5 Гр и минимальными различиями при дозе 4,0 Гр.

Вместе с тем заключение о противолучевой активности милиацина находится в определенном противоречии с данными, характеризующими удельный вес хроматидных и хромосомных

aberrаций у исследуемых групп животных, в соответствии с которыми содержание хроматидных (более тяжелых) aberrаций при дозах облучения 1,0 Гр и 2,0 Гр в контрольной группе мышей было значительно меньшим, чем в опыте. Разрешение этого противоречия может основываться на представлении о защитном влиянии милиацина, реализуемом путем повышенной устойчивости клеток к апоптозу [4]. Очевидно, что при реализации антиапоптотического влияния тритерпеноида создаются условия для большей выживаемости мутагенных клеток, в том числе и с более грубыми (хроматидными) повреждениями их генетического аппарата, которые у контрольных мышей могли приводить к апоптотической гибели таких клеток и их последующей аутофагии [15].

То обстоятельство, что милиацин реализовывал защиту через 24 часа после лучевого воздействия, может свидетельствовать о его вмешательстве в первичную радиационно-химическую стадию радиационного поражения [11]. При этом механизм защитного действия, вероятнее всего, опосредовался антиоксидантной активностью тритерпеноидов [5], обусловленной его способностью стабилизировать мембраны [12] и нормализовать экспрессию гена глутатионпероксидазы [3]. Соответственно, исходя из бинарной классификации противолучевых средств [7], милиацин может быть отнесен к оксидомодуляторам. Однако не исключается и гибридный механизм его защитного влияния, включающий цитопротекторный эффект в виде повышения устойчивости кроветворных клеток к апоптозу и их способности к восстановлению при действии токсических факторов [1].

Таким образом, результаты работы расширяют представления об иммуномодуляторном действии милиацина [2], опосредуемом его защитным влиянием в отношении мутагенеза кроветворных клеток при экстремальных воздействиях.

Заключение

В целом, полученные данные позволяют заключить, что противолучевая активность милиацина в отношении миелокариоцитов может служить важным механизмом иммунопротективного действия тритерпеноида при радиационном поражении. Вместе с тем, по способности ограничивать мутагенный эффект лучевого воздействия, милиацин может быть отнесен к слабым противолучевым антимутагенам [9], эффективность защитного действия которого, оцениваемая по снижению частоты aberrаций, находилась в пределах 20-40% в диапазоне доз 0,5-1,0 Гр.

Список литературы / References

1. Железнова А.Д., Железнов Л.М., Штиль А.А., Фролов Б.А. Морфологические проявления защитного влияния милиацина в лимфоидных органах при воздействии метотрексата // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2007. Т. 144, № 10. С. 458-463. [Zheleznova A.D., Zheleznov L.M., Shtil A.A., Frolov B.A. Morphological manifestations for the protective effect of miliacin in organs of immunogenesis after treatment with methotrexate. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2007, Vol. 144, no. 10, pp. 458-463. (In Russ.)]
2. Железнова А.Д., Панфилова Т.В., Смолягин А.И., Чайникова И.Н., Штиль А.А., Фролов Б.А. Влияние милиацина на дисфункцию иммунной системы у мышей при действии метотрексата // Иммунология, 2009. № 5. С. 298-302. [Zheleznova A.D., Panfilova T.V., Smolyagin A.I., Chainikova I.N., Shtil A.A., Frolov B.A. The influence of miliacin on dysfunction of the immune system during administration of methotrexate to mice. *Immunologiya = Immunologiya*, 2009, no. 5, pp. 298-302. (In Russ.)]
3. Калинина О.В., Колотова Е.С., Панфилова Т.В., Штиль А.А., Фролов Б.А. Природный тритерпеноид милиацин предотвращает вызванный метотрексатом окислительный стресс и нормализует экспрессию генов сур-2e1 и глутатионредуктазы в печени // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2013. № 1. С. 70-74. [Kalinina O.V., Kolotova E.S., Panfilova T.V., Shtil A.A., Frolov B.A. The natural triterpenoid miliacin prevents methotrexate-induced oxidative stress and normalizes the expression of genes encoding the cytochrome P-450 2e1 isoform and glutathione reductase in the liver. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy*, 2013, no. 1, pp. 70-74. (In Russ.)]
4. Панфилова Т.В., Штиль А.А., Полосухина Е.Р., Барышников А.Ю., Фролов Б.А. Влияние тритерпеноида милиацина на чувствительность лимфоцитов тимуса и селезенки к апоптозу, индуцированному дексаметазоном // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2003. Т. 57, № 10. С. 382-385. [Panfilova T.V., Shtil A.A., Polosukhina E.R., Baryshnikov A.Yu., Frolov B.A. Effect of the triterpenoid miliacin on the sensitivity of thymus and spleen lymphocytes to dexamethasone-induced apoptosis. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2003, Vol. 57, no. 10, pp. 382-385. (In Russ.)]
5. Панфилова Т.В., Штиль А.А., Фролов Б.А. Тритерпеноид милиацин снижает индуцированное стрессом ПОЛ // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2006. Т. 141, № 6. С. 633-635. [Panfilova T.V., Shtil A.A., Frolov B.A. Triterpenoid miliacin inhibits stress-induced lipid peroxidation. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2006, Vol. 141, no. 6, pp. 633-635. (In Russ.)]
6. Рождественский Л.М. Актуальные вопросы поиска и исследования противолучевых средств // Радиационная биология. Радиоэкология, 2013. Т. 53, № 5. С. 513-520. [Rozhdestvensky L.M. Topical issues of the search and research of anti-radiation agents. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology*, 2013, Vol. 53, no. 5, pp. 513-520. (In Russ.)]
7. Рождественский Л.М. Классификация противолучевых средств в аспекте их фармакологического сигнала и сопряженности со стадией развития лучевого поражения // Радиационная биология. Радиоэкология, 2017. Т. 57, № 2. С. 117-135. [Rozhdestvensky L.M. Classification of radiation countermeasures in the aspect of their pharmacological effects and association with radiation injury progressing. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology*, 2017, Vol. 57, no. 2, pp. 117-135. (In Russ.)]
8. Сарычева Ю.А., Токарева А.А., Штиль А.А., Кольванова М.А., Морозов В.Н., Панфилова Т.В., Фролов Б.А. Оценка антимуtagenного эффекта тритерпеноида милиацина у мышей при воздействии ионизирующего излучения // Российский иммунологический журнал, 2020. № 9. С. 81-82. [Sarycheva Yu.A., Tokareva A.A., Shtil A.A., Kolyvanova M.A., Morozov V.N., Panfilova T.V., Frolov B.A. Evaluation of triterpenoid miliacin-related antimutagenic effect in mice exposed to ionizing radiation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2020, no. 9, pp. 81-82. (In Russ.)]
9. Семенов В.В., Студенцова И.А. Количественные и качественные критерии оценки эффективности антимутагенов в эксперименте // Вестник РАМН, 1993. № 3. С. 16-20. [Semenov V.V., Studentsova I.A. Quantitative and qualitative criteria for evaluating the efficiency of antimutagens in the experiment. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* 1993, no. 3, pp. 16-20. (In Russ.)]
10. Симбирцев А.С., Кетлинский С.А. Перспективы использования цитокинов и индукторов синтеза цитокинов в качестве радиозащитных препаратов // Радиационная биология. Радиоэкология, 2019. Т. 59, № 2. С. 170-176. [Simbirtsev A.S., Ketlinsky S.A. Perspectives for cytokines synthesis inducers as radioprotectors. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology*, 2019, Vol. 59, no. 2, pp. 170-176. (In Russ.)]
11. Сычева Л.П., Лисина Н.И., Щеголева Р.А., Рождественский Л.М. Антимуtagenное действие противолучевых препаратов в эксперименте на мышцах // Радиационная биология. Радиоэкология, 2019. Т. 59, № 4. С. 388-393. [Sycheva L.P., Lisina N.I., Shchegoleva R.A., Rozhdestvensky L.M. Antimutagenic effect of anti-radiation

drugs in an experiment on mice. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology*, 2019, Vol. 59, no. 4, pp. 388-393. (In Russ.)]

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

13. Goldman D.C., Alexeev V., Lash E., Guha C., Rodeck U., Fleming W.H. The triterpenoid RTA408 is a robust mitigator of hematopoietic acute radiation syndrome in mice. *Radiat. Res.*, 2015, Vol. 183, no. 3, pp. 338-344.

14. Kim J.-H., Thimmulappa R.K., Kumar V., Cui W., Kumar S., Kombairaju P., Zhang H., Margolick J., Matsui W., Macvittie T., Malhotra S., Biswal S. NRF2-mediated Notch pathway activation enhances hematopoietic reconstitution following myelosuppressive radiation. *J. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 124, no. 2, pp. 730-741.

15. Satyamitra M., Ney P., Graves J., Mullaney C., Srinivasan V. Mechanism of radioprotection by δ -tocotrienol: pharmacokinetics, pharmacodynamics and modulation of signaling pathways. *Br. J. Radiol.*, 2012, Vol. 85, pp. 1093-1103.

Авторы:

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

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

Шехтман А.Г. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой лучевой диагностики, лучевой терапии, онкологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Authors:

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

Tokareva A.A., Senior Teacher, Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Shekhtman A.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Radiation Diagnostics, Radiation Therapy, Oncology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

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

Пименова Ю.С. — ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Митрофанов Р.А. — заведующий отделением радиотерапии № 1 ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер», г. Оренбург, Россия

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

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

Pimenova Yu.S., Assistant Professor, Department of Pathological Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Mitrofanov R.A., Head, Department of Radiotherapy No. 1, Orenburg Regional Center of Clinical Oncology, Orenburg, Russian Federation

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

Поступила 16.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 16.05.2022
Accepted 29.05.2022

ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИОННОГО И СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СПЕКТРА ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ

Сафронова Э.А., Рябова Л.В.

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

Резюме. Обследованы 23 пациента в возрасте от 40 до 65 лет (средний возраст $54,52 \pm 6,72$) с диагнозом «острый коронарный синдром» при поступлении, которым в экстренном или отсроченном порядке выполнено стентирование КА в течение ближайших суток. Все пациенты в качестве сопутствующего заболевания имели гипертоническую болезнь. В процессе дообследования определялся тропонин крови, выполнялось ЭКГ в динамике. Диагноз «острый инфаркт миокарда с подъемом ST» выставлен 7 пациентам, без подъема ST – 6 больным, у остальных была нестабильная стенокардия (риск по Грейс от 75 до 150 баллов, в среднем, $107,7 \pm 27,16$ балла). Для оценки иммунного статуса, в частности популяционного и субпопуляционного звена лимфоцитов, стандартизированной технологией использовали метод проточной цитометрии на цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter, США). Определяли: 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⁺ (TNK-клетки), CD45⁺, CD3⁺, CD16⁺, CD56⁺ (натуральные киллеры), CD45⁺, CD3⁺, CD19⁺CD5⁺ (В-лимфоциты), CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺ (активированные хелперы, ранняя активация лимфоцитов), CD45⁺, CD3⁺, HLA-DR (активированные Т-лимфоциты – поздняя активация лимфоцитов). Полученные данные свидетельствуют о том, что у пациентов с острым коронарным синдромом по сравнению с контрольной группой, повышены относительные показатели субпопуляций Т-хелперов, Т-лимфоцитов ранней и поздней активации, а также В-лимфоцитов. Одновременно имеется тенденция к повышению абсолютных значений данных показателей. Субпопуляция TNK-лимфоцитов оказалась статистически значимо повышена как в относительных, так и абсолютных величинах, в то время как CD45⁺CD3⁺CD19⁺ ($p < 0,01$) и Т-цитотоксические лимфоциты ($p < 0,001$) в % отношении снизились и имели ту же тенденцию в абсолютных величинах. За счет повышения Т-хелперов и снижения цитотоксических Т-лимфоцитов выросло соотношение CD4/CD8 лимфоцитов почти в два раза ($p < 0,001$). В общем анализе крови у пациентов с острым коронарным синдромом имеется тенденция к лейкоцитозу ($10,15 \pm 5,22$) с палочкоядерным сдвигом влево.

Ключевые слова: острый коронарный синдром, проточная цитометрия, лимфоциты, иммунорегуляторный индекс, стентирование коронарных артерий, коронарография

Адрес для переписки:

Сафронова Элеонора Аркадьевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (908) 051-21-36.
E-mail: safronovaeleonora68@gmail.com

Address for correspondence:

Safronova Eleonora A.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (908) 051-21-36.
E-mail: safronovaeleonora68@gmail.com

Образец цитирования:

Э.А. Сафронова, Л.В. Рябова «Оценка популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов у пациентов с острым коронарным синдромом» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 313-320.
doi: 10.46235/1028-7221-1135-AOL

© Сафронова Э.А., Рябова Л.В., 2022

For citation:

E.A. Safronova, L.V. Ryabova "Assessment of lymphocyte populations and their subsets in the patients with acute coronary syndrome", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 313-320.
doi: 10.46235/1028-7221-1135-AOL

DOI: 10.46235/1028-7221-1135-AOL

ASSESSMENT OF LYMPHOCYTE POPULATIONS AND THEIR SUBSETS IN THE PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME

Safronova E.A., Ryabova L.V.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. We examined 23 patients aged 40 to 65 years (mean age 54.52 ± 6.72) with a diagnosis of acute coronary syndrome (ACS) at admission, who underwent emergency or delayed coronary stenting a day later. All patients had arterial hypertension as a concomitant disease. Upon additional examination, blood troponin levels were determined, ECG was performed in the time dynamics. Acute myocardial infarction with ST elevation was diagnosed in 7 patients, infarction without ST elevation, in 6 patients, the unstable angina rest, in the rest of this group (Grace risk from 75 to 150 points, on average, 107.7 ± 27.16 points). To assess the immune status, especially, lymphocyte populations and subsets we used standardized techniques, i.e., flow cytometric assays with Navios cytofluorimeter (Beckman Coulter, USA). The following subpopulations were determined: CD45⁺ (panleukocyte marker for gating lymphocytes), CD45⁺, CD3⁺ (T cells), CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺ (helper inducers), CD45⁺, CD3⁺, CD8⁺ (cytotoxic T cells), CD45⁺, CD3⁺CD16⁺, CD56⁺ (TNK cells) CD45⁺, CD3⁻, CD16⁺, CD56⁺ (natural killer cells), CD45⁺, CD3⁻, CD19⁺CD5⁺ (B cells), CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺ (activated helpers, early activation phase), CD45⁺, CD3⁺, HLA-DR (activated T lymphocytes – late activation phase). The data obtained indicate that the relative indices of T helper subpopulations, T cells at early and late activation step, and B lymphocytes were increased in the patients with acute coronary syndrome, compared with control group. At the same time, there is a trend for increasing absolute values of these indexes. The subpopulation of TNK lymphocytes proved to be significantly increased both in relative and absolute values, whereas percentages of CD45⁺CD3⁺CD19⁻ ($p < 0.01$) and T cytotoxic lymphocytes ($p < 0.001$) were decreased and showed the same trend in absolute terms. The ratio of CD4/CD8 lymphocytes was almost doubled ($p < 0.001$), due to increased content of T-helpers and decrease in cytotoxic T lymphocytes. In clinical blood analyses of ACS patients a tendency for leukocytosis was shown, (10.15 ± 5.22), with a shift to the band forms.

Keywords: acute coronary syndrome, flow cytometry, lymphocytes, immunoregulatory index, coronary artery stenting, coronarography

Введение

На данный момент среди неинфекционных заболеваний лидирующие позиции занимает ишемическая болезнь сердца (ИБС). Одной из частых инвалидизирующих состояний у больных с ИБС являются перенесенные острые инфаркты миокарда (ОИМ), высокие функциональные классы стенокардии. Среди лиц трудоспособного возраста большую роль в структуре смертности занимают ОИМ и инсульты. В основе ИБС в подавляющем большинстве случаев лежит стенозирующий коронарный атеросклероз. В работах Rao V.H. и соавт. [9] показано, что в состав атеросклеротических бляшек входят гладкомышечные клетки, Т-лимфоциты, макрофаги. При этом в интиме клеток сосудов откладывается кальций, холестерин, липиды. В исследовании Karadimou G. и соавт. [6] представлено, что при инфильтрации зоны атеросклеротического поражения Т-лимфоцитами, макрофага-

ми может быть ОИМ или ишемический инсульт. С.Г. Щербак и соавт. [4] показали, что в генезе атеросклероза может играть значимую роль как врожденный, так и приобретенный иммунитет. В исследованиях Grufman H. и соавт. [5] было продемонстрировано, что при атеросклерозе существует неинфекционный воспалительный процесс, который приводит к отеку, инфильтрации иммунными клетками бляшек сосудов. При увеличении толщины интимо-медиального слоя наблюдается увеличение CD3⁺, CD4⁺, CD45RA⁻CD45RO⁺CCR7⁻ и уменьшение числа нативных Т-лимфоцитов, что позиционируется как ранний признак атеросклероза, что послужило одним из выводов мультиэтнического исследования атеросклероза – проиллюстрированного в работе Olson N.S. и соавт. [8].

Частота и профиль субпопуляций лимфоцитов в коронарной артерии были исследованы Luberan N. и соавт. у 33 пациентов с инфарктом миокарда и сравнивались с их системными цир-

кулирующими аналогами [7]. В образцах внутрикоронарной и артериальной периферической крови изучали субпопуляции Т-клеток, включающие CD4⁺CD28^{null}, активированные и регуляторные Т-клетки, фенотипы TH1/TH2/TH17, NK- и В-клетки. По представленным данным, количество CD4⁺CD28^{null} Т-лимфоцитов было значительно увеличено в интракоронарной крови по сравнению с периферической кровью (3,7 против 2,9 %, $p < 0,0001$). Кроме того, у пациентов с более чем 6-часовой длительностью ОИМ с подъемом сегмента ST (ОИМ пST) наблюдались более высокие уровни CD4⁺CD28^{null} Т-клеток, что позволяет предположить, что данная субпопуляция может быть связана с более интенсивным повреждением миокарда. Редкая субпопуляция NK CD3⁻CD16⁺CD56⁻ клеток также была увеличена в образцах внутрикоронарной крови (5,6% против 3,9%, $p = 0,006$). Выявленные данные показали, что конкретные субпопуляции иммунных клеток с провоспалительным профилем в коронарном русле были увеличены по сравнению с их циркулирующими аналогами, что свидетельствует о патофизиологической роли этих клеток в нестабильности бляшек, тромбах и повреждении миокарда.

В работе Афанасьевой О.И. и соавт. [1] было показано, что независимым фактором риска развития быстро прогрессирующего атеросклероза является повышение липопротеина А в сочетании с увеличением Th17 и одновременным снижением CD4.

В исследовании Пылаевой Е.А. и соавт. [3] было продемонстрировано, что у пациентов с трехсосудистым поражением коронарных артерий в сравнении с пациентами без ангиографически значимых поражений артерий наблюдалось снижение регуляторных Т-лимфоцитов и повышение Th17-клеток. Индекс отношения регуляторных Т-лимфоцитов к Th был выше у пациентов с ОИМ в анамнезе.

Целью настоящего исследования явилось определение изменений в соотношении субпопуляций лимфоцитов у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС), подвергшихся стентированию коронарных артерий (КА).

Материалы и методы

Обследованы 23 пациента в возрасте от 40 до 65 лет (средний возраст $54,52 \pm 6,72$) с диагнозом «ОКС» при поступлении, которым в экстренном или отсроченном порядке выполнено стентирование КА в течение ближайших суток. Все пациенты в качестве сопутствующего заболевания имели гипертоническую болезнь. С учетом ос-

новного заболевания (острый коронарный синдром), гипертоническая болезнь была 3-й стадии, 4-й степени риска. В процессе дообследования — определялся тропонин крови, выполнялось ЭКГ в динамике. Диагноз «ОИМ с подъемом ST» (пST) выставлен 7 пациентам, ОИМ без подъема ST (ОИМ бпST) — 6 больным, у остальных была нестабильная стенокардия (риск по Грейс от 75 до 150 баллов, в среднем, $107,7 \pm 27,16$ балла). 2 пациентам с ОИМ бпST установлено по 3 стента с лекарственным покрытием (ЛП), 3 больным ОИМ бпST и 3 с ОИМ пST имплантировано по 1 стенту с ЛП, всем остальным с ОИМ — по 2 стента с ЛП. Из лиц с нестабильной стенокардией установлено по 2 стента 2 пациентам, остальным — по 1 стенту с ЛП.

Для оценки иммунного статуса, в частности популяционного и субпопуляционного звена лимфоцитов стандартизированной технологией [2] использовали метод проточной цитометрии на цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter, США). Определяли: 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⁺ (TNK-клетки) CD45⁺, CD3⁻, CD16⁺, CD56⁺ (натуральные киллеры), CD45⁺, CD3⁻, CD19⁺CD5⁺ (В-лимфоциты), CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺ (активированные хелперы, ранняя активация лимфоцитов), CD45⁺, CD3⁺, HLA-DR (активированные Т-лимфоциты — поздняя активация лимфоцитов).

Результаты и обсуждение

Полученные данные, отраженные в таблице 1, свидетельствуют о том, что у пациентом ОКС по сравнению с контрольной группой [2], повышены относительные показатели субпопуляций Т-хелперов, Т-лимфоцитов ранней и поздней активации, а также В-лимфоцитов. Одновременно имеется тенденция к повышению абсолютных значений данных показателей. Субпопуляция TNK-лимфоцитов оказалась статистически значимо повышена как в относительных, так и абсолютных величинах, в то время как CD45⁺CD3⁺CD19⁻ ($p < 0,01$) и Т-цитотоксические лимфоциты ($p < 0,001$) в % отношении снизились и имели ту же тенденцию в абсолютных величинах. За счет повышения Т-хелперов и снижения цитотоксических Т-лимфоцитов выросло соотношение CD4/CD8-лимфоцитов почти в два раза ($p < 0,001$).

Кроме того, нужно отметить, что при рассмотрении показателей общего анализа крови у

ТАБЛИЦА 1. ПОПУЛЯЦИИ И СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ (n = 23) В СРАВНЕНИИ С КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППОЙ (n = 18)

TABLE 1. POPULATIONS AND SUBPOPULATIONS OF LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME (n = 23) IN COMPARISON WITH THE CONTROL GROUP (n = 18)

Показатель Indicator	Диапазон значений (min-max) контрольной группы Range of values (min-max) of the control group n = 18	Средние значения контрольной группы Mean values of the control group n = 18	Диапазон значений (min-max) пациентов с ОКС Range of values (min-max) of patients with ACS n = 23	Средние значения пациентов с ОКС Average values of patients with ACS n = 23	Уровень различий Level of difference t p
Т-лимфоциты (CD45⁺CD3⁺CD19⁺), отн. (%) T lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺), rel. (%)	61-85	76,25±1,71	47,9-82,0	68,33±1,73**	t = 3,26 p = 0,0024
Т-лимфоциты (CD45⁺CD3⁺CD19⁺) абс. 10⁶ кл/мл T lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺) abs. 10 ⁶ cells/mL	946-2079	1447,56±96,10	273-2356	1303,26±147,93	t = 0,82 p = 0,418
Т-хелперы (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), отн. (%) T helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), rel. (%)	35-55	41,79±1,20	32,5-68,0	51,02±1,82***	t = 4,23 p = 0,00014
Т-хелперы (CD45⁺CD3⁺CD4⁺) абс. 10⁶ кл/мл T helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺) abs. 10 ⁶ cells/mL	576-1336	737,50±45,17	226-1670	949,04±102,36	t = 1,89 p = 0,066
Т-цитотоксические (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), отн. (%) T cytotoxic (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺), rel. (%)	19-35	28,99±1,80	7,2-34,4	19,77±1,53***	t = 3,90 p = 0,00038
Т-цитотоксические (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) абс. 10⁶ кл/мл T cytotoxic (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺) abs. 10 ⁶ cells/mL	372-974	534,22±39,08	48-1166	399,91±65,94	t = 1,75 p = 0,087
Соотношение CD/CD8-лимфоцитов, усл.ед. Ratio of CD/CD8 lymphocytes, c. u.	1,5-2,6	1,62±0,13	1,2-7,7	3,13±0,37***	t = 3,85 p = 0,00044

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

Показатель Indicator	Диапазон значений (min-max) контрольной группы Range of values (min-max) of the control group n = 18	Средние значения контрольной группы Mean values of the control group n = 18	Диапазон значений (min-max) пациентов с ОКС Range of values (min-max) of patients with ACS n = 23	Средние значения пациентов с ОКС Average values of patients with ACS n = 23	Уровень различий Level of difference t p
ТНК-лимфоциты (CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺), отн. (%) T-NK lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺), rel. (%)	1-6	1,80±0,31	0,3-14,0	5,57±0,93***	t = 3,85 p = 0,00045
ТНК-лимфоциты (CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺), абс. 10⁶ кл/мл T-NK lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺), abs. 10 ⁶ cells/mL	7-165	31,44±4,89	1-265	112,87±28,82**	t = 2,79 p = 0,00829
НК-лимфоциты (CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺), отн. (%) NK lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺), rel. (%)	8-18	9,40±1,23	1,3-30,4	9,96±1,44	t = 0,30 p = 0,769
НК-лимфоциты (CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺), абс. 10⁶ кл/мл NK lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺), abs. 10 ⁶ cells/mL	123-369	189,11±35,59	17-489	197,35±42,62	t = 0,15 p = 0,883
В-лимфоциты (CD45⁺CD3⁻CD19⁺), отн. (%) B lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺), rel. (%)	7-17	10,46±0,94	4,5-11,5	14,38±1,24*	t = 2,52 p = 0,016
В-лимфоциты (CD45⁺CD3⁻CD19⁺), абс. 10⁶ кл/мл B lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺), abs. 10 ⁶ cells/mL	111-376	205,17±27,09	61-570	261,74±35,85	t = 1,26 p = 0,215
Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺ (ранняя активация), отн. (%) T lymphocytes CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ (early activation), rel. (%)	7-18	3,12±0,86	3,0-12,1	7,80±0,49***	t = 4,73 p = 0,00003

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатель Indicator	Диапазон значений (min-max) контрольной группы Range of values (min-max) of the control group n = 18	Средние значения контрольной группы Mean values of the control group n = 18	Диапазон значений (min-max) пациентов с ОКС Range of values (min-max) of patients with ACS n = 23	Средние значения пациентов с ОКС Average values of patients with ACS n = 23	Уровень различий Level of difference t p
Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺ (ранняя активация), абс. 10⁶ кл/мл T lymphocytes CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ (early activation), abs. 10 ⁶ cells/mL	60-400	63,94±23,04	11-137	73,22±9,59	t = 0,37 p = 0,712
Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ (поздняя активация), отн. (%) T lymphocytes CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ (late activation), rel. (%)	1-6	2,24±0,50	2,3-12,4	6,24±0,64***	t = 4,93 p = 0,000017
Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ (поздняя активация), абс. 10⁶кл/мл T lymphocytes CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ (late activation), abs. 10 ⁶ cells/mL	7-163	43,50±9,58	6-115	58,39±8,13	t = 1,19 p = 0,243

Примечание. * – p < 0,05, ** – p < 0,01, *** – p < 0,001.

Note. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

пациентов с ОКС имеется тенденция к лейкоцитозу (10,15±5,22) с палочкоядерным сдвигом влево. Один из обследованных пациентов с ОИМ, имевший наибольший показатель общего количества лейкоцитов (26,9 × 10⁹/л), умер через 2 недели после поступления в стационар, что можно расценить как неблагоприятный прогностический фактор.

В нашем исследовании было показано, что почти все звенья Т- и В-клеточного иммунитета принимают участие в неинфекционном воспалении, наблюдаемом у пациентов с ОКС. В частности, повысились показатели Т-хелперов, снизились уровни цитотоксических Т-лимфоцитов,

что связано скорее всего с процессом острого воспаления.

Выявленное снижение уровня CD3⁺ лимфоцитов у больных с ОКС отличалось от данных, полученных в работе Olson N.S. и соавт., показавших повышение уровня CD3⁺ лимфоцитов у пациентов с атеросклерозом. Но в то же время обнаружено однонаправленное изменение показателей CD4-лимфоцитов (увеличение) в нашем исследовании и обзоре Olson N.S. и соавт. В то же время в обзоре Афанасьевой О.И. представлены данные по уменьшению уровня CD4-лимфоцитов у больных с быстропрогрессирующим атеросклерозом. Отсутствие достоверности

в абсолютных показателях субпопуляций лимфоцитов скорее всего связано с несколькими причинами, а именно: пока еще незначительной выборкой, наличием очень больших различий в лейкоцитозе пациентов (остроты воспалительного процесса), что сказывается на значительном разбросе показателей (см. табл. 1). При дальнейшем исследовании эти данные будут уточнены.

Учитывая значимые полученные данные, которые в будущем могут быть рассмотрены как прогностические при данной патологии, необходимо продолжить исследование.

Выводы

1. По данным исследования выявлены значимые изменения в соотношении субпопуляций лимфоцитов у пациентов с острым коронарным

синдромом, подвергшихся стентированию коронарных артерий.

2. У пациентов с острым коронарным синдромом наблюдалось относительное повышение числа Т-лимфоцитов хелперов при одновременном снижении Т-цитотоксических лимфоцитов, что привело к увеличению иммунорегуляторного индекса почти в два раза. Также определено относительное снижение CD3-лимфоцитов и рост TNK-лимфоцитов (как относительного, так и абсолютного соотношения).

3. Полученные измененные данные на фоне лейкоцитоза со сдвигом влево определяют реакцию иммунной системы на воспаление, возникающее при остром инфаркте миокарда и нестабильной стенокардии. Все это показывает на необходимость продолжения исследования в данном направлении.

Список литературы / References

1. Афанасьева О.И., Пылаева Е.А., Клесарева Е.А., Потехина А.В., Проваторов С.И., Афанасьева М.И., Красникова Т.Л., Масенко В.П., Арефьева Т.И., Покровский С.Н. Липопротеид(а), аутоантитела к нему и циркулирующие субпопуляции т-лимфоцитов как независимые факторы риска атеросклероза коронарных артерий // *Терапевтический архив*, 2016. Т. 88, № 9. С. 31-38. [Afanasyeva O.I., Pylaeva E.A., Klesareva E.A., Potekhina A.V., Provatorov S.I., Afanasyeva M.I., Krasnikova T.L., Masenko V.P., Arefieva T.I., Pokrovsky S.N. Lipoprotein(a), its autoantibodies, and circulating T lymphocyte subpopulations as independent risk factors for coronary artery atherosclerosis. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2016, Vol. 88, no. 9, pp. 31-38. (In Russ.)]
2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. 2-е изд., доп. и расш. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014. 576 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in medicine and biology. 2nd edition, suppl. and exp.]. Yekaterinburg: RIO Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. 576 p.
3. Пылаева Е.А., Потехина А.В., Проваторов С.И., Раскина К.В., Рулева Н.Ю., Масенко В.П., Ноева Е.А., Красникова Т.Л., Арефьева Т.И. Эффекторные и регуляторные субпопуляции лимфоцитов крови при стабильном течении ишемической болезни сердца // *Терапевтический архив*, 2014. Т. 86, № 9. С. 24-30. [Pylaeva E.A., Potekhina A.V., Provatorov S.I., Raskina K.V., Ruleva N.Iu., Masenko V.P., Noeva E.A., Krasnikova T.L., Aref'eva T.I. Effector and regulatory blood lymphocyte subpopulations in stable coronary artery disease. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2014, Vol. 86, no. 9, pp. 24-30. (In Russ.)]
4. Щербак С.Г., Камилова Т.А., Лебедева С.В., Вологжанин Д.А., Голота А.С., Макаренко С.В., Апалько С.В. Биомаркеры каротидного стеноза // *Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация*, 2021. Т. 3, № 1. С. 104-130. [Shcherbak S.G., Kamilova T.A., Lebedeva S.V., Vologzhanin D.A., Golota A.S., Makarenko S.V., Apalko S.V. Biomarkers of carotid stenosis. *Fizicheskaya i reabilitatsionnaya meditsina, meditsinskaya reabilitatsiya = Physical and Rehabilitation Medicine, Medical Rehabilitation*, 2021, Vol. 3, no. 1, pp. 104-130. (In Russ.)]
5. Grufman H., Gonçalves I., Edsfeldt A., Nitulescu M., Persson A., Nilsson M., Nilsson J. Plasma levels of high-sensitive C-reactive protein do not correlate with inflammatory activity in carotid atherosclerotic plaques. *J. Intern. Med.*, 2014, Vol. 275, no. 2, pp. 127-133.
6. Karadimou G., Folkersen L., Berg M., Perisic L., Discacciati A., Roy J., Hansson G.K., Persson J., Paulsson-Berne G. Low TLR7 gene expression in atherosclerotic plaques is associated with major adverse cardio- and cerebrovascular events. *Cardiovasc. Res.*, 2017, Vol. 113, no. 1, pp. 30-39.

7. Lluberás N., Trías N., Brugnini A., Mila R., Vignolo G., Trujillo P., Durán A., Grille S., Lluberás R., Lens D. Lymphocyte subpopulations in myocardial infarction: a comparison between peripheral and intracoronary blood. *Springerplus*, 2015, Vol. 4, 744. doi: 10.1186/s40064-015-1532-3.
8. Olson N.C., Doyle M.F., Jenny N.S., Huber S.A., Psaty B.M., Kronmal R.A., Tracy R.P. Decreased naive and increased memory CD4⁺ T cells are associated with subclinical atherosclerosis: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 8, e71498. doi: 10.1371/journal.pone.0071498.
9. Rao V.H., Kansal V., Stoupa S., Agrawal D.K. MMP-1 and MMP-9 regulate epidermal growth factor-dependent collagen loss in human carotid plaque smooth muscle cells. *Physiol. Rep.*, 2014, Vol. 2, no. 2, e00224. doi: 10.1002/phy2.224.

Авторы:

Сафронова Э.А. — к.м.н., доцент кафедры поликлинической терапии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Рябова Л.В. — д.м.н., профессор кафедры безопасности жизнедеятельности, медицины катастроф, скорой и неотложной медицинской помощи ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Safronova E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Polyclinic Therapy and Clinical Pharmacology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Ryabova L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Life Safety, Disaster Medicine, Critical and Emergency Medical Care, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 15.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 15.05.2022
Accepted 29.05.2022

ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ДНК- И мРНК-ВАКЦИНЫ, КОДИРУЮЩИЕ ИСКУССТВЕННЫЕ ИММУНОГЕНЫ ВИРУСА ГРИППА

Старостина Е.В., Шарабрин С.В., Рудометов А.П., Литвинова В.Р.,
Боргоякова М.Б., **Бажан С.И.**, Ильичев А.А., Карпенко Л.И.

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. Постоянный антигенный дрейф циркулирующих вирусов гриппа приводит к тому, что сезонные вакцины против гриппа становятся неэффективными и возникает необходимость ежегодного перевыпуска таких вакцин. В связи с этим разработка универсальной гриппозной вакцины приобретает особую актуальность. Перспективным направлением исследований в данной области является создание иммуногенов, состоящих из консервативных фрагментов белков различных штаммов вируса гриппа.

Целью данной работы была оценка иммуногенности ДНК-вакцин и мРНК-вакцин, кодирующих искусственные антигены, состоящие из консервативных фрагментов ствола гемагглютинаина и консервативного белка М2. Ранее нами были получены ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие искусственные иммуногены AgН1, AgН3 и AgМ2, которые содержат консервативные фрагменты стебля гемагглютинаина двух подтипов гриппа А – Н1N1 и Н3N2 и консервативный белок М2. Эти ДНК-вакцины послужили матрицей для синтеза мРНК-вакцин.

Для оценки иммуногенности полученных ДНК- и мРНК-вакцин проводили иммунизацию мышей линии BALB/c путем внутримышечного введения соответствующих препаратов. Оценку гуморального иммунного ответа проводили с помощью ИФА, с использованием в качестве антигенов вирусы гриппа А/Aichi/2/68(Н3N2), А/California/07/2009 и вакцину УЛЬТРИКС, содержащую очищенные белки вируса гриппа Н1N1 и Н3N2. Оценку Т-клеточного иммунного ответа проводили с использованием двух методов: метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) и ELISpot. ICS проводили по определению CD8⁺ и CD4⁺Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN γ . ELISpot проводили с использованием набора mouse IFN γ ELISpot BD. Для стимуляции клеток использовали смесь пептидов, входящих в состав целевых антигенов. Полученные результаты показали, что спроектированные ДНК-вакцинные конструкции вызывали у иммунизированных животных вирус-специфический гуморальный и клеточный ответы. Внутримышечное введение животным голых мРНК-вакцинных конструкций индуцировало слабый гуморальный иммунный ответ, что свидетельствует о необходимости проведения дальнейших работ по улучшению способов доставки.

Ключевые слова: вирус гриппа, универсальная вакцина, ДНК-вакцина, мРНК-вакцина, искусственный белок-иммуноген, Т-клеточный ответ

Адрес для переписки:

Старостина Екатерина Владимировна
ФБУН Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
630559, Россия, Новосибирская обл., р. п. Кольцово.
Тел.: 8 (913) 937-52-05.
E-mail: starostina_ev@vector.nsc.ru

Address for correspondence:

Starostina Ekaterina V.
State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector"
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo.
Phone: 7 (913) 937-52-05.
E-mail: starostina_ev@vector.nsc.ru

Образец цитирования:

Е.В. Старостина, С.В. Шарабрин, А.П. Рудометов,
В.Р. Литвинова, М.Б. Боргоякова, **С.И. Бажан,**
А.А. Ильичев, Л.И. Карпенко «Иммунный ответ на
ДНК- и мРНК-вакцины, кодирующие искусственные
иммуногены вируса гриппа» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 321–326.
doi: 10.46235/1028-7221-1103-IRA
© Старостина Е.В. и соавт., 2022

For citation:

E.V. Starostina, S.V. Sharabrin, A.P. Rudometov,
V.R. Litvinova, M.B. Borgoyakova, **S.I. Bazhan,**
A.A. Ilyichev, L.I. Karpenko "Immune response against DNA- and mRNA
vaccines encoding artificial influenza virus immunogens",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 321–326.
doi: 10.46235/1028-7221-1103-IRA
DOI: 10.46235/1028-7221-1103-IRA

IMMUNE RESPONSE AGAINST DNA- AND mRNA VACCINES ENCODING ARTIFICIAL INFLUENZA VIRUS IMMUNOGENS

Starostina E.V., Sharabrin S.V., Rudometov A.P., Litvinova V.R., Borgoyakova M.B., **Bazhan S.I.**, Ilyichev A.A., Karpenko L.I.

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. Constant antigenic drift of circulating influenza viruses leads to inefficiency of seasonal influenza vaccines, thus requiring annual re-design of these vaccines. Therefore, the development of a universal influenza vaccine is of particular relevance. A promising line of research in this area is to design the immunogens consisting of conserved protein fragments from different influenza viral strains. The aim of this work was to assess immunogenicity of DNA vaccines and mRNA vaccines encoding artificial antigens consisting of conserved hemagglutinin stem fragments and conserved M2 protein. We have obtained DNA vaccine constructs encoding artificial immunogens AgH1, AgH3, and AgM2, which contained conserved fragments of the hemagglutinin stalk from the two subtypes of influenza A – H1N1 and H3N2, and conserved M2 protein. These DNA vaccines were used as templates for the synthesis of mRNA vaccines. To assess immunogenicity of the obtained constructs, BALB/c mice were immunized with DNA and mRNA vaccines by i/m administration. Assessment of the humoral immune response was carried out by ELISA, using influenza viruses A/Aichi/2/68(H3N2), A/California/07/2009 as antigens and the ULTRIX vaccine containing purified antigens of H1N1 and H3N2 influenza viruses. T cell immune response was assessed using two methods: intracellular cytokine staining (ICS) and ELISpot. ICS was performed to determine CD8⁺ and CD4⁺T-lymphocytes producing IFN γ . ELISpot was carried out using the mouse IFN γ ELISpot kit (BD). A peptide mixture which included composition of the target antigens, was used for cell stimulation. The results showed that the designed DNA vaccine constructs induce virus-specific humoral and cellular responses in immunized BALB/c mice. Intramuscular administration of the naked mRNA vaccine constructs induced a weak humoral immune response, thus suggesting a need for further work to improve the delivery approaches.

Keywords: influenza virus, universal vaccine, DNA vaccine, mRNA vaccine, artificial immunogenic protein, T cell response

Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Введение

Основным методом защиты населения от гриппа является вакцинация, поэтому разработка вакцин против гриппа имеет большое значение. На сегодняшний день для защиты населения от вируса гриппа используют аттенуированные (живые) или инактивированные вакцины, одобренные ВОЗ на основе генетического анализа циркулирующих сезонных штаммов вирусов гриппа А и В. Однако из-за высокой изменчивости вируса гриппа такие вакцины не эффективны против дрейфующих сезонных и пандемических вирусов, в результате чего состав гриппозных вакцин необходимо менять каждый год, а процесс производства вакцины против гриппа отнимает много времени. Поэтому многие научные коллективы и фармацевтические компании проводят исследования по разработке универсальных вакцин против вируса гриппа. Существуют разные подхо-

ды, направленные на разработку универсальной вакцины от гриппа. К ним относятся, например, создание рекомбинантных белков-иммуногенов, использование консервативных фрагментов белков вируса гриппа (стебель гемагглютинина, белки NP, PB1, M1 и M2) или разработка новых типов вакцин на основе мРНК [2, 3, 4, 5, 7, 8, 9].

Ранее в нашем институте был проведен теоретический дизайн универсальной противогриппозной вакцины, основанный на разработке искусственных антигенов, состоящих из консервативных фрагментов ствола гемагглютинина и консервативного белка M2 [1]. На основе эукариотических плазмидных векторов были получены ДНК-вакцины, кодирующие гены соответствующих иммуногенов [1].

Помимо ДНК-вакцин, в последние 3-4 года активно развивается другой вид вакцин на основе нуклеиновых кислот, основанных на мРНК [3, 4, 10]. Данный тип вакцин обладает существенным преимуществом перед другими типами вакцин, в том числе и ДНК-вакцинами. Они неинфекционны, способны активировать как клеточный,

так и гуморальный иммунные ответы, быстры в производстве [6]. В отличие от ДНК-вакцин, в случае РНК-вакцин отсутствует потенциальная возможность интеграции в геном клетки. Благодаря возможности легко проводить замену целевого гена в мРНК-вакцине, не изменяя технологию производства, появляется возможность быстро реагировать на появление новых пандемических инфекционных возбудителей, что особенно актуально для вируса гриппа.

Целью данной работы была оценка иммуногенности ДНК-вакцин и мРНК-вакцин, кодирующих искусственные антигены, состоящие из консервативных фрагментов ствола гемагглютинина и консервативного белка М2.

Материалы и методы

Дизайн полиэпитопных антигенов и получение ДНК-вакцин р-AgH1, р-AgH3, и р-AgM2, кодирующих антигены AgH1, AgH3 и AgM2, сконструированные на основе консервативных фрагментов стебля гемагглютинина двух подтипов вируса гриппа А, H1N1 и H3N2, а также консервативного вирусного белка М2, представлено в работе [1]. Перечисленные выше плазмиды были использованы в качестве матрицы для синтеза мРНК-вакцинных конструкций. Синтез РНК, полиаденилирование и кэпирование проводили с помощью набора T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CellScript, США) как рекомендовано производителем. Для повышения эффективности трансляции мРНК, уридин был заменен на псевдоуридин. Очистку мРНК проводили на колонках Monarch® Total RNA Miniprep Kit (New England Biolabs, США).

Для оценки иммуногенности полученных ДНК- и РНК-вакцин проводили иммунизацию мышей инбредной линии BALB/c, препараты вакцин вводили внутримышечно, трехкратно с интервалом две недели. Животным вводили суммарный препарат плазмид р-AgH1, р-AgH3 и р-AgM2 в дозе 100 мкг каждой ДНК-вакцинной конструкции, либо суммарный препарат мРНК-вакцин, кодирующих AgH1, AgH3 и р-AgM2 в дозе 20 мкг каждой мРНК-вакцинной конструкции. На 41-й день проводили забор селезенок у мышей для выделения спленоцитов и кровь для получения сыворотки.

Для оценки Т-клеточного иммунного ответа использовали два метода: метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) и ELISpot. ICS проводили по определению CD8⁺ и CD4⁺Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN γ , с использованием антител PerCP RatAnti-Mouse CD4, FITC RatAnti-Mouse CD8a, PE Hamster Anti-Mouse CD3, APC Rat Anti-Mouse IFN γ , (BD, США) методом проточной цитофлуориметрии, на приборе

ре FACSCalibur (BD, США). ELISpot проводили с использованием набора mouse IFN γ ELISpot фирмы BD (США), согласно инструкции производителя. Для стимуляции клеток использовали смесь пептидов (20 мкг/мл каждого пептида), входящих в состав целевых антигенов. Подсчет количества IFN γ продуцирующих клеток осуществляли с помощью ELISpot-анализатора фирмы Carl Zeiss (Германия). У животных, иммунизированных мРНК-вакцинами, исследовали гуморальный ответ с помощью ИФА. В качестве антигенов для ИФА использовали вакцинный препарат УЛЬТРИКС (ООО «ФОРТ», Россия), содержащий очищенные антигены вируса гриппа H1N1 и H3N2.

Статистический анализ данных выполнен с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Результаты выражены как медиана с диапазоном. Данные были проанализированы с помощью непараметрических тестов (однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса).

Результаты и обсуждение

Для получения более высокого и эффективно иммунного ответа было решено провести иммунизацию животных смесью ДНК-вакцинных конструкций р-AgH1, р-AgH3 и р-AgM2. Через 14 дней после третьей иммунизации проводили выделение селезенки и оценку клеточного ответа методами ELISpot и ICS, а анализ сыворотки проводили с помощью ИФА.

Данные, полученные с помощью метода IFN γ ELISpot, показали, что в группе животных, иммунизированных комбинацией ДНК-вакцинных конструкций, наблюдался статистически значимый ответ Т-лимфоцитов (рис. 1А).

Анализ Т-клеточного ответа с помощью метода ICS показал, что наибольшее количество CD3⁺/CD8⁺ и CD3⁺/CD4⁺ клеток, экспрессирующих внутриклеточный IFN γ после стимуляции вирусными пептидами, было обнаружено в группах животных, иммунизированных комбинацией ДНК-плазмид и вакцинным штаммом вируса гриппа А/Aichi/2/68(H3N2), по сравнению с животными, иммунизированными векторной плазмидой (рис. 1Б).

Гуморальный иммунный ответ исследован методом ИФА с использованием в качестве антигенов вируса гриппа А/Aichi/2/68(H3N2) и А/California/07/2009 в концентрации 1 мкг/мл. Результаты исследований В-клеточного ответа, показали, что иммунизация смесью ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих целевые антигены, индуцировала антитела как к А/Aichi/2/68(H3N2), так и к А/California/

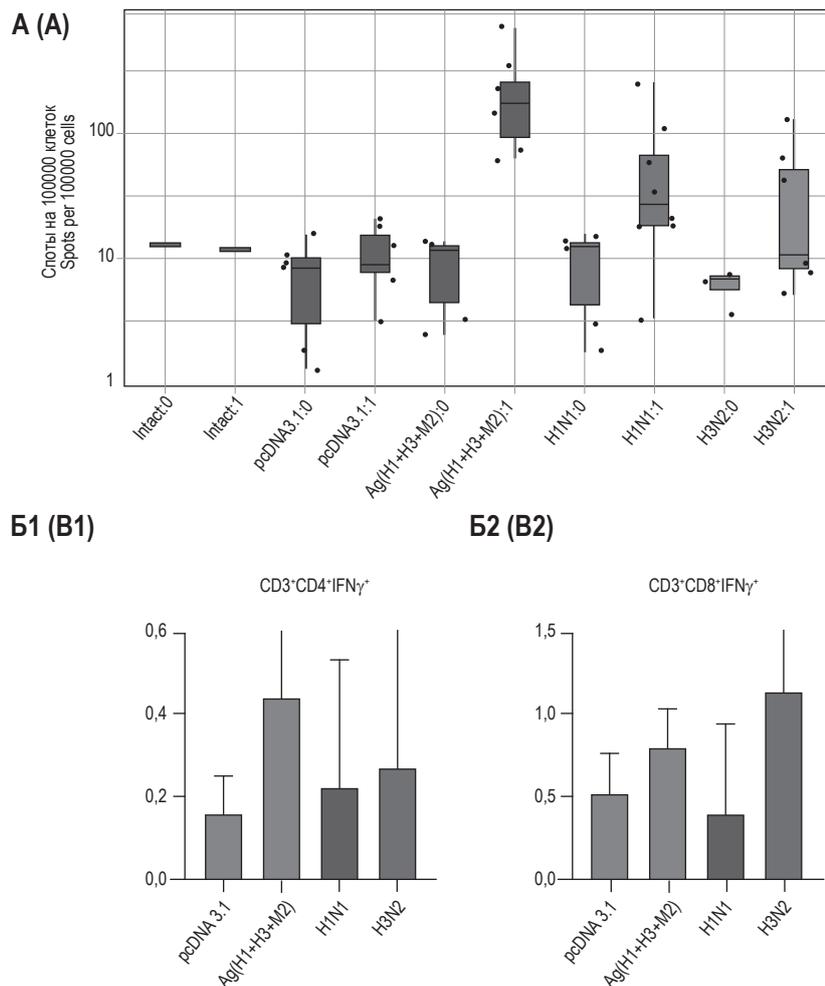


Рисунок 1. Оценка клеточного ответа у мышей, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями, кодирующими антигены AgH1, AgH3 и M2

Примечание. А – данные IFN γ -ELISpot (количество спотов на 10⁶ спленоцитов). «0» в названии группы соответствует спонтанной секреции IFN γ , «1» соответствует секреции IFN γ , стимулированной антигенными пептидами. Подсчет клеток представлен в логарифмической шкале. Б – данные ICS, полученные с помощью проточной цитометрии. Количество CD4 (Б1) или CD8 (Б2) лимфоцитов, продуцирующих IFN γ в ответ на стимуляцию вирус-специфическими пептидами.

Figure 1. Evaluation of cellular response in mice immunized with DNA vaccine constructs encoding AgH1, AgH3 and M2 antigens

Note. (A) IFN γ -ELISpot data (number of spots per 10⁶ splenocytes). "0" in the name of a group corresponds to a spontaneous IFN-secretion, and "1" corresponds to IFN-secretion stimulated with antigenic peptides. Cell counts are presented on a log scale. (B) ICS data obtained by flow cytometry. Number of CD4 (B1) or CD8 (B2) lymphocytes producing IFN γ in response to stimulation with virus-specific peptides.

07/2009(H1N1pdm09) штаммам вируса гриппа. Антитела, распознающие A/Aichi/2/68 и A/California/07/09(H1N1pdm09), были обнаружены у всех восьми мышей, иммунизированных комбинацией ДНК-плазмид (p-AgH1 + p-AgH3 + p-AgM2) (табл. 1).

Следующим этапом нашей работы был перевод вакцины из формата ДНК в формат мРНК-вакцины. Нами были синтезированы мРНК-AgH1, мРНК-AgH3, и мРНК-AgM2, в качестве матрицы использовали соответствующие ДНК-вакцины, которые показали свою эффективность. В данном эксперименте иммунизация

животных была проведена с использованием только голых мРНК-вакцин. Мы не использовали средств доставки мРНК, в целях сравнить иммуногенность голой ДНК и мРНК вакцины.

Гуморальный ответ мышей, иммунизированных смесью мРНК-вакцин, показал, что через две недели после второй иммунизации наблюдалось увеличение титра специфических антител (1:300). Выявленный титр был невысок, и поэтому мы посчитали нецелесообразным проводить более трудоемкую оценку Т-клеточного иммунитета. Дальнейшая работа будет направлена на по-

ТАБЛИЦА 1. ОЦЕНКА ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ДНК-ВАКЦИННЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ, КОДИРУЮЩИМИ АНТИГЕНЫ AgH1, AgH3 И M2

TABLE 1. EVALUATION OF HUMORAL RESPONSE IN MICE IMMUNIZED WITH DNA VACCINE CONSTRUCTS ENCODING AgH1, AgH3, AND M2 ANTIGENS

Антиген Antigen / Количество мышей Number of mice / Обратный титр антител в ИФА против A/California/07/09(H1N1 pdm09) Reverse antibody titer against A/California/07/09(H1N1 pdm09)												
Ag (H1 + H3 + M2)								H1N1	H3N2	pcDNA3.1		
1	2	3	4	5	6	7	8	1	1	1	2	3
1600	1600	1600	1600	3200	3200	3200	3200	12800	3200	200	200	200
Антиген Antigen / Количество мышей Number of mice / Обратный титр антител в ИФА против A/Aichi/02/68(H3N2) Reverse antibody titer against A/Aichi/02/68(H3N2)												
Ag (H1 + H3 + M2)								H1N1	H3N2	pcDNA3.1		
1	2	3	4	5	6	7	8	1	1	1	2	3
1600	3200	1600	3200	6400	6400	3200	6400	6400	12800	200	400	400

Примечание. Ag (H1 + H3 + M2) – сыворотки мышей, иммунизированных смесью ДНК-плазмид p-AgH1 + p-AgH3 + p-AgM2; H1N1 – сыворотки мышей, иммунизированных вирусом A/California/07/2009(H1N1pdm09) (положительный контроль); H3N2 – сыворотки мышей, иммунизированных вирусом A/Aichi/2/68(H3N2); pcDNA3.1 – сыворотки мышей, иммунизированных векторной плазмидой (отрицательный контроль).

Note. Ag (H1 + H3 + M2), sera of mice immunized with a mixture of p-AgH1 + p-AgH3 + p-AgM2 DNA plasmids; H1N1, sera of mice immunized with A/California/07/2009(H1N1pdm09) virus (positive control); H3N2, sera of mice immunized with A/Aichi/2/68(H3N2) virus; pcDNA3.1, sera of mice immunized with the vector plasmid (negative control).

вышение иммуногенности мРНК-вакцин, включая выбор способа доставки.

Заключение

В целом, полученные результаты показали, что спроектированные ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие искусственные антигены, спроектированные с использованием консервативных фрагментов ствола гемагглютинаина вирусов гриппа H1N1 и H3N2 и белка M2, при иммунизации мышей линии BALB/c индуцируют вирус-специфический В- и Т-клеточный ответ, включая активацию цитотоксических и Т-хелперных лимфоцитов. Соответствующие мРНК-вакцины, кодирующие искусственные антигены, вызывают у иммунизированных мы-

шей специфический гуморальный ответ против вируса гриппа, но достаточно слабый. Иммуногенность мРНК-вакцин при введении животным в виде «голой» молекулы мРНК, оказалась невысокой, несмотря на то, что при синтезе мРНК были использованы модифицированные нуклеотиды. Скорее всего, слабая иммуногенность была связана с деградацией мРНК-вакцин РНКазой и низкой эффективностью доставки в антиген-презентирующие клетки (АПК).

Мы предполагаем, что иммуногенность мРНК будет выше при использовании подходящего способа доставки, защищающего молекулы от деградации и эффективно доставляющие их в АПК. Выбор способа доставки мРНК-вакцин будет дальнейшим шагом в наших исследованиях.

Список литературы / References

1. Bazhan S.I., Antonets D.V., Starostina E.V., Ilyicheva T.N., Kaplina O.N., Marchenko V.Y., Durymanov A.G., Oreshkova S.F., Karpenko L.I. Immunogenicity and protective efficacy of influenza a DNA vaccines encoding artificial antigens based on conservative hemagglutinin stem region and M2 protein in mice. *Vaccines (Basel)*, 2020, Vol. 9, no. 8 (3), pp. 448-465.
2. Bazhan S.I., Antonets D.V., Starostina E.V., Ilyicheva T.N., Kaplina O.N., Marchenko V.Y., Volkova O.Y., Bakulina A.Y., Karpenko L.I. In silico design of influenza a virus artificial epitope-based T-cell antigens and the evaluation of their immunogenicity in mice. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2022, Vol. 40, no. 7, pp. 3196-3212.
3. Ilyichev A.A., Orlova L.A., Sharabrin S.V., Karpenko L.I. mRNA technology as one of the promising platforms for the SARS-CoV-2 vaccine development. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2020, Vol. 24, no. 7, pp. 802-807.

4. Karpenko L.I., Rudometov A.P., Sharabrin S.V., Shcherbakov D.N., Borgoyakova M.B., Bazhan S.I., Volosnikova E.A., Rudometova N.B., Orlova L.A., Pyshnaya I.A., Zaitsev B.N., Volkova N.V., Azaev, M.S., Zaykovskaya A.V., Pyankov O.V., Ilyichev A.A. Delivery of mRNA vaccine against SARS-CoV-2 using a polyglucin:spermidine conjugate. *Vaccines*, 2021, Vol. 9, no. 2, 76. doi: 10.3390/vaccines9020076.
5. Kumar A., Meldgaard T.S., Bertholet S. Novel platforms for the development of a universal influenza vaccine. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 600. doi: 10.3389/fimmu.2018.00600.
6. Liu M.A. A comparison of plasmid DNA and mRNA as vaccine technologies. *Vaccines*, 2019, Vol. 7, no. 2, 37. doi:10.3390/vaccines702 0037.
7. Tsilibary E.P., Charonis S.A., Georgopoulos A.P. Vaccines for Influenza. *Vaccines (Basel)*, 2021, Vol. 9, no. 1, 47. doi: 10.3390/vaccines9010047.
8. Wang W.L., Li R.Q., Deng Y., Lu N., Chen H., Meng X., Wang W., Wang X.P., Yan K.X., Qi X.R., Zhang X., Xin W., Lu Z., Li X., Bian T., Gao Y., Tan W., Ruan L. Protective efficacy of the conserved NP, PB1, and M1 proteins as immunogens in DNA- and vaccinia virus-based universal influenza A virus vaccines in mice. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2015, Vol. 22, pp. 618-630.
9. Wei C.J., Crank M.C., Shiver J., Graham B.S., Mascola J.R., Nabel G.J. Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2020, Vol. 19, pp. 239-252.
10. Wei C.J., Crank M.C., Shiver J. Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2020, Vol. 19, no. 4, pp. 239-252.
11. Zhang C., Maruggi G., Shan H., Li J. Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 594. doi: 10.3389/fimmu.2019.00594.

Авторы:

Старостина Е.В. — к.б.н., научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Шарабрин С.В. — младший научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Рудометов А.П. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Литвинова В.Р. — стажер-исследователь, отдел биоинженерии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Боргоякова М.Б. — младший научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Бажан С.И. — д.б.н., заведующий теоретическим отделом, отдел биоинженерии 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 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 отдела биоинженерии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Authors:

Starostina E.V., PhD (Biology), Research Associate, Department of Bioengineering, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Sharabrin S.V., Junior Research Associate, Department of Bioengineering, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Rudometov A.P., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Bioengineering, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Litvinova V.R., PhD Student, Department of Bioengineering, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Borgoyakova M.B., Junior Research Associate, Department of Bioengineering, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Bazhan S.I., PhD, MD (Biology), Head, Theoretical Department, Department of Bioengineering, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Ilyichev A.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of Bioengineering, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Karpenko L.I., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Department of Bioengineering, State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ 2 И 6 В АССОЦИИ С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К НЕСПЕЦИФИЧЕСКОМУ ЯЗВЕННОМУ КОЛИТУ И СИНДРОМУ РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА У РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Сташкевич Д.С., Беляева С.В., Евдокимов А.В.

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

Резюме. Неспецифический язвенный колит и синдром раздраженного кишечника являются мультифакторными заболеваниями, в основе иммунопатогенеза которых лежит нарушение взаимодействия Toll-подобных рецепторов и измененной микробиоты. Согласно литературным данным, одним из механизмов регуляции активности Toll-подобных рецепторов является генетический полиморфизм их генов, представленный однонуклеотидными заменами, формирующими аллельные варианты с различным действием. Среди всех известных TLRs наиболее активно изучается TLR2. Ген TLR2 располагается на длинном плече четвертой хромосомы и содержит ряд однонуклеотидных полиморфизмов, среди которых хорошо изученным является генетический вариант, приводящий к замене аргинина на глутамин (Arg753Gln) в белке TLR2. Данный ген является родоначальником семейства TLR2, совместно с ним на четвертой хромосоме расположен другой член этого семейства – TLR6, для которого наиболее известным является полиморфизм в точке C745T, приводящий к аминокислотной замене Pro249Ser в белке. Совместное функционирование белков TLR2 и TLR6 при распознавании лигандов, а также взаимно близкое расположение их генов на 4 хромосоме, позволяет рассмотреть не только отдельные SNP данных генов, но их гаплотипические сочетания в качестве потенциальных факторов риска формирования восприимчивости к различным заболеваниям.

Исходя из вышеизложенного, данной работе был проведен анализ особенностей распределения аллелей, генотипов и гаплотипических сочетаний TLR2 – TLR6 и их ассоциации с предрасположенностью к неспецифическому язвенному колиту и синдрому раздраженного кишечника у русских Челябинской области. В исследовании использовались следующие методы: выделение образцов ДНК из цельной крови, проведение генотипирования исследуемых полиморфизмов генов с помощью ПЦР с электрофоретической детекцией. Расчет частот двухлокусных гаплотипов, образованных SNPs TLR2 – TLR6 проводился с помощью программы Arlequin ver 3.5. Сравнение двух выборок с целью поиска ассоциации с предрасположенностью к НЯК и СРК проводилось с использованием стандартных иммуногенетических критериев. Значимость различий при $p \leq 0,05$.

Анализ данных показал ассоциацию конкретных аллелей и генотипов, но не гаплотипов TLR2 – TLR6 с предрасположенностью к исследуемым заболеваниям. Генетический полиморфизм Arg753Gln

Адрес для переписки:

Сташкевич Дарья Сергеевна
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»
454021, Россия, г. Челябинск, ул. Молдавская, 25, кв. 15.
Тел.: 8 (351) 799-71-54.
E-mail: stashkevich_dary@mail.ru

Address for correspondence:

Stashkevich Daria S.
Chelyabinsk State University
454021, Russian Federation, Chelyabinsk,
Moldavskaya str., 25, apt 15.
Phone: 7 (351) 799-71-54.
E-mail: stashkevich_dary@mail.ru

Образец цитирования:

Д.С. Сташкевич, С.В. Беляева, А.В. Евдокимов
«Сравнительная оценка генетического полиморфизма
Toll-подобных рецепторов 2 и 6 в ассоциации
с предрасположенностью к неспецифическому
язвенному колиту и синдрому раздраженного
кишечника у русских Челябинской области»
// Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 3. С. 327-332. doi: 10.46235/1028-7221-1139-CAO
© Сташкевич Д.С. и соавт., 2022

For citation:

D.S. Stashkevich, S.V. Belyaeva, A.V. Evdokimov
“Comparative assessment of genetic polymorphism of Toll-like
2 and 6 receptors predisposing for non-specific ulcerative colitis
and irritable bowel syndrome in Russians from Chelyabinsk
Region”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 327-332.
doi: 10.46235/1028-7221-1139-CAO
DOI: 10.46235/1028-7221-1139-CAO

TLR2 значим для формирования предрасположенности к неспецифическому язвенному колиту, а SNP Pro249Ser TLR6 ассоциирован с восприимчивостью к синдрому раздраженного кишечника у русских Челябинской области.

Ключевые слова: TLR2, TLR6, гаплотипы, неравновесное сцепление, однонуклеотидные полиморфизмы, неспецифический язвенный колит, синдром раздраженного кишечника

COMPARATIVE ASSESSMENT OF GENETIC POLYMORPHISM OF TOLL-LIKE 2 AND 6 RECEPTORS PREDISPOSING FOR NON-SPECIFIC ULCERATIVE COLITIS AND IRRITABLE BOWEL SYNDROME IN RUSSIANS FROM CHELYABINSK REGION

Stashkevich D.S., Belyaeva S.V., Evdokimov A.V.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Ulcerative colitis and irritable bowel syndrome are multifactorial disorders with genetic predisposition. Recent studies suggest that the mucosal immune activation, increased intestinal permeability, and altered host-microbiota interactions may modulate innate immune response, thus contributing to immunopathogenesis of these diseases. Toll-like receptors (TLR) are considered to play the main role in genetic susceptibility to the conditions. The mechanisms for regulating activity of Toll-like receptors are represented by single-nucleotide gene polymorphisms (SNPs), thus producing allelotypes with different biological effects. Among all known TLRs, TLR2 is the most actively studied. The TLR2 gene is located on the long arm of the chromosome 4 and contains the genetic variant leading to the substitution of arginine for glutamine (Arg753Gln) in TLR2 protein. Meanwhile, The most studied SNP of TLR6 is located at the C745T position causing Pro249Ser amino acid substitution in the protein. The present work aimed for analysis of distribution of alleles, genotypes and haplotype combinations of the TLR2 and TLR6 SNPs, and their associations with predisposal for ulcerative colitis and irritable bowel syndrome in Russians from Chelyabinsk Region. The following methods were used in the study: isolation of DNA samples from whole blood, genotyping of the studied gene polymorphisms using PCR with electrophoretic detection. The frequencies of two-locus haplotypes formed by SNPs TLR2 – TLR6 were calculated with Arlequin ver 3.5 software. Comparison of two populational samples for predisposition to UC and IBS was carried out using standard immunogenetic criteria. Significance of differences was set at $p \leq 0.05$. Results: Analysis of the data showed the association of specific alleles and genotypes, but not TLR2 – TLR6 haplotypes, with predisposition to the studied diseases. The Arg753Gln gene polymorphism of TLR2 was shown to be significant for a predisposition to ulcerative colitis, and SNP Pro249Ser TLR6 is associated with susceptibility to irritable bowel syndrome in Russians from the Chelyabinsk Region.

Keywords: TLR2, TLR6, haplotypes, linkage disequilibrium, single nucleotide polymorphisms, ulcerative colitis, irritable bowel syndrome

Введение

Система Toll-подобных рецепторов (TLRs) является, в настоящее время, одной из наиболее изучаемых регуляторных систем. Хорошо известно, что TLRs узнают патоген-ассоциированные образы патогенности (PAMPs) микроорганизмов и инициируют каскад иммунных реакций [1]. Ведущая роль в процессах распознавания PAMPs принадлежит TLR2, TLR4. Особенностью функционирования TLR2 является способность формировать гетеродимеры с TLR1 и TLR6, что необходимо для расширения спектра лигандов и активации макрофагов и дендритных клеток через общие сигнальные пути MyD88, TIRAP [3, 13]. Согласно литературным данным,

одним из механизмов регуляции активности Toll-подобных рецепторов является генетический полиморфизм их генов, влияющий как на уровень экспрессии их генов, так и на конформацию белковых молекул рецепторов, что может приводить к изменению скорости передачи информационных сигналов и, как следствие, к нарушению функционирования некоторых сигнальных путей и выраженности воспалительных реакций, лежащих в основе иммунопатогенеза мультифакторных патологий [2, 3].

Функциональный генетический полиморфизм TLRs представлен однонуклеотидными заменами, формирующими аллельные варианты с различным действием. Ген TLR2 располагается

на длинном плече четвертой хромосомы и содержит ряд однонуклеотидных полиморфизмов, среди которых хорошо изученным является генетический вариант, приводящий к замене аргинина на глутамин (Arg753Gln) в белке TLR2. Данный полиморфизм активно изучается в качестве биомаркера предрасположенности к различным инфекционным и мультифакторным заболеваниям [3], в частности к воспалительным заболеваниям кишечника [5, 6, 11, 12].

Следует отметить, что на четвертой хромосоме располагается ген еще одного Toll-подобного рецептора — TLR6, для которого наиболее известным является полиморфизм в точке C745T. Согласно литературным данным, однонуклеотидная замена цитозина на тимин в гене TLR6 (rs5743810) приводит к аминокислотной замене Pro249Ser и формирует два аллеля, распределение частот встречаемости которых сильно варьирует в популяциях различного происхождения [2], что осложняет оценку его вклада в формирование предрасположенности к различным мультифакторным заболеваниям. Однако исследований, посвященных поиску ассоциаций данного полиморфизма TLR6, в доступной литературе мало и их данные противоречивы [9].

В основе иммунопатогенеза неспецифического язвенного колита (НЯК) и синдрома раздраженного кишечника (СРК) лежит неадекватный иммунный ответ на антигены собственной микрофлоры, опосредованный через Toll-подобные рецепторы, в том числе TLR2 и TLR6, чрезмерная активация которых может привести к хроническому воспалению кишечника [4]. Установлено, что при определенных клинических вариантах СРК повышается экспрессия TLR2, это приводит к увеличению продукции провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-8 клетками слизистого слоя [4]. Также у больных НЯК повышена экспрессия TLR2 дендритными клетками в слизистом слое кишечника, в результате формируется неадекватный иммунный ответ на измененную микрофлору [8].

Несмотря на то, что достаточно хорошо изучен вклад TLRs в иммунопатогенез воспалительных заболеваний кишечника, данных по роли TLR6 при СРК и НЯК в доступной литературе не найдено.

Совместное функционирование белков TLR2 и TLR6 при распознавании лигандов, а также взаимно близкое расположение их генов на 4 хромосоме позволяет рассмотреть не только отдельные SNP данных генов, но их гаплотипические сочетания в качестве потенциальных факторов риска формирования восприимчивости к различным заболеваниям.

Цель — оценка частот встречаемости аллелей, генотипов и гаплотипических сочетаний TLR2-6 и их ассоциации с предрасположенностью к неспецифическому язвенному колиту и синдрому

раздраженного кишечника у русских Челябинской области.

Материалы и методы

Контингент обследуемых лиц

Выборка больных синдромом раздраженного кишечника: общее количество — 63, средний возраст на момент формирования группы — 43,4 \pm 1,6. Группа больных неспецифическим язвенным колитом состояла из 79 человек, средний возраст — 41,9 \pm 1,3. Отбор больных и верификация диагнозов проводилась гастроэнтерологами г. Челябинска. Группа сравнения (113 человек; средний возраст — 34,6 \pm 0,75) представлена потенциальными донорами стволовой клетки ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови».

Все обследуемые лица самоидентифицировались как русские. Популяционная принадлежность определялась согласно рекомендациям 8-го Международного Симпозиума в 1980 г. (Лос-Анджелес, США).

Основным методом исследования для генотипирования полиморфных сайтов в генах TLR2, TLR6 являлась аллель-специфическая полимеразная цепная реакция с реактивами ООО НПФ «Литех» г. Москва. Метод детекции — электрофорез в 3%-ном агарозном геле с УФ-визуализацией.

Статистическая обработка

В ходе работы установлены частоты аллелей, генотипов, гаплотипов TLR2 — TLR6. Сравнение групп больных СРК и условно здоровых лиц проводилось с использованием следующих показателей, принятых в иммуногенетических исследованиях: критерий Пирсона (χ^2), χ^2 с поправкой Йетса, а также с помощью точного метода Фишера.

Оценка достоверности различий в распределении частот генотипов, согласно моделям наследования и соответствие закону Харди–Вайнберга, проводились с использованием онлайн-приложения SNPStats [10].

Показатели сцепления и частоты встречаемости гаплотипов TLR2-TLR6 были рассчитаны в программе Arlequin ver 3.5 [7].

Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, незначимыми при $p > 0,10$, для промежуточных значений p ($0,05 < p \leq 0,10$) обсуждали тенденцию к различиям.

Результаты и обсуждение

Частоты встречаемости аллелей и генотипов TLR2 во всех выборках соответствуют ожидаемым, согласно закону Харди–Вайнберга. Данные представлены в таблице 1.

Как видно из полученных результатов, в группе больных НЯК распределение аллелей и генотипов Arg753Gln TLR2 характеризуется повышением частоты аллеля с заменой за счет увеличения но-

сителей гетерозиготного генотипа (24,05% против 9,73%). Согласно критерию отношения шансов, аллель с заменой и гетерозиготный генотип могут рассматриваться как потенциальные факторы риска формирования вероятности развития неспецифического язвенного колита у русских Челябинской области. Данные ассоциации описываются двумя моделями наследования: протективный эффект гомозиготного предкового генотипа (G/G против A/G + A/A, $p = 0,014$) – доминантная модель, а формирование предрасположенности к НЯК при носительстве гетерозиготного генотипа (A/G против A/A + G/G, $p = 0,0076$) – сверхдоминантная модель. Распределение аллельных ва-

риантов и генотипов Arg753Gln TLR2 не имело статистически значимых различий между группами больных СРК и условно здоровых лиц. Таким образом, данный полиморфизм не ассоциирован с предрасположенностью/устойчивостью к синдрому раздраженного кишечника у русских Челябинской области.

Оценка частот встречаемости аллелей и генотипов TLR6 в исследуемых группах показала, что у условно здоровых лиц и больных неспецифическим язвенным колитом распределение генотипов соответствует ожидаемым, тогда как в группе больных СРК имеются отклонения. Частоты

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ SNPs ГЕНОВ TLR2, TLR6 В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 1. FREQUENCIES OF ALLELES AND GENOTYPES OF SNPs OF TLR2, TLR6 GENES IN THE GROUPS

Аллели / генотипы Alleles / genotypes	Группа больных НЯК (1), % Group of patients with UC, (1), %	Группа больных СРК (2), % Group of patients with IBS, (2), %	Группа сравнения (3), % Control (3), %	Сравнение (1) – (3) χ^2 , p, OR, 95% ДИ Comparison (1) – (3) χ^2 , p, OR, 95% CI	Сравнение (2) – (3) χ^2 , p, OR, 95% ДИ Comparison (2) – (3) χ^2 , p, OR, 95% CI
	n = 79 кол-во аллелей = 158 number of alleles = 158	n = 63 кол-во аллелей = 126 number of alleles = 126	n = 113 кол-во аллелей = 226 number of alleles = 226		
TLR2					
A	12,03	7,14	5,75	$\chi^2 = 4,79$ p = 0,029 OR = 2,24 1,07-4,68	$\chi^2 = 0,27$ p = 0,61
G	87,97	92,86	92,25		
A/A	0	0	0,88	p = 1,0	p = 1,0
G/A	24,05	14,29	9,73	$\chi^2 = 6,18$ p = 0,013 OR = 2,94 1,31-6,59	$\chi^2 = 0,83$ p = 0,36
G/G	75,95	85,71	89,38	$\chi^2 = 6,195$ p = 0,013 OR = 0,38 0,17-0,83	$\chi^2 = 0,52$ p = 0,47
TLR6					
T	53,2	54,8	43,4	$\chi^2 = 3,58$ p = 0,059 OR = 1,48 0,99-2,23	$\chi^2 = 4,22$ p = 0,041 OR = 1,58 1,02-2,45
C	46,8	45,2	56,6		
T/T	29,1	36,5	22,1	$\chi^2 = 1,2$ p = 0,27	$\chi^2 = 4,2$ p = 0,04 OR = 2,02 1,03-3,99
C/T	48,1	36,5	42,5	$\chi^2 = 0,59$ p = 0,44	$\chi^2 = 0,6$ p = 0,44
C/C	22,8	27	35,4	$\chi^2 = 3,5$ p = 0,06 OR = 0,54 0,28-1,03	$\chi^2 = 1,31$ p = 0,25

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ДВУХЛОКУСНЫХ ГАПЛОТИПОВ TLR2 – TLR6 В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ СРК, НЯК И ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

TABLE 2. FREQUENCIES OF TWO-LOCUS TLR2 – TLR6 HAPLOTYPES IN GROUPS OF PATIENTS WITH IBS, UC AND HEALTHY INDIVIDUALS OF THE RUSSIAN POPULATION

Гаплотипы TLR2 – TLR6 Haplotypes TLR2 – TLR6	Группа больных НЯК Group of patients with UC n = 79 (1)	Группа больных СРК Group of patients with IBS n = 63 (2)	Группа контроля Control n = 113 (3)	Сравнение (1) – (3) χ^2 , p, OR, 95% ДИ	Сравнение (2) – (3) χ^2 , p, OR, 95% ДИ
	Частота гаплотипа ± ошибка среднего Haplotype frequency ± standard error			Comparison (1) – (3) χ^2 , p, OR, 95% CI	Comparison (2) – (3) χ^2 , p, OR, 95% CI
2258*G -745*С	0,38±0,04	0,44±0,04	0,52±0,03	$\chi^2 = 6,04$ p = 0,014	$\chi^2 = 1,74$ p = 0,187
2258*G -745*Т	0,50±0,04	0,480±0,045	0,42±0,03	$\chi^2 = 2,12$ p = 0,145	$\chi^2 = 1,15$ p = 0,284
2258*A -745*С	0,089±0,020	0,008±0,008	0,05±0,01	$\chi^2 = 2,44$ p = 0,118	$\chi^2 = 0,35$ p = 0,554
2258*A -745*Т	0,032±0,010	0,06±0,02	0,009±0,006	p > 0,05	p > 0,05

встречаемости аллелей и генотипов Pro249Ser TLR6 также представлены в таблице 1.

Группа больных НЯК характеризовалась снижением носительства предковой формы аллеля и его гомозиготного генотипа (данные на уровне тенденции), что описывается доминантной моделью (С/С против С/Т + Т/Т, p = 0,058). В группе больных СРК были повышены частоты мутантного аллеля и его гомозиготного генотипа TLR6. Данное изменение, согласно рецессивной модели наследования повышает вероятность возникновения СРК (Т/Т против С/Т + С/С, p = 0,042; OR = 2,02 1,03-3,99).

Поскольку гены TLR2 и TLR6 располагаются на одной хромосоме, на последнем этапе исследования мы решили оценить параметры неравновесного сцепления и частоты гаплотипов, образованных SNPs в данных генах.

Анализ гаплотипических сочетаний TLR2 – TLR6 показал, что в группе сравнения и у больных неспецифическим язвенным колитом предковые аллели 2258*G TLR2 и 745*С TLR6 не сцеплены друг с другом. Аллель 2258*G TLR2 сцеплен с аллелем 745*Т TLR6 (группа сравнения: $D' = 0,65$; $\chi^2 = 4,39$; p = 0,036; НЯК: $D' = 0,5$; $\chi^2 = 6,25$; p = 0,012), а редкий аллель 2258*A TLR2 – с частым аллелем 745*С TLR6 (группа сравнения: $D' = 0,65$; $\chi^2 = 4,39$; p = 0,036; НЯК: $D' = 0,5$; $\chi^2 = 6,25$; p = 0,012).

В группе больных СРК установлены другие закономерности сцепления: предковые аллели сцеплены друг с другом, а мутантные – друг с другом ($D' = 0,75$; $\chi^2 = 4,56$; p = 0,03).

Частоты встречаемости двухлокусных гаплотипов представлены в таблице 2.

В группе больных НЯК снижена частота сочетания аллелей 2258*G -745*С, так как данные аллели в группе больных НЯК не сцеплены, то, вероятнее всего, данное изменение связано со снижением частот обоих предковых аллелей независимо друг от друга. Все остальные частоты гаплотипов не различались во всех исследуемых группах.

Заключение

Полученные нами данные об ассоциации Arg753Gln TLR2 с предрасположенностью к неспецифическому язвенному колиту подтверждаются работой Dorofeyev A.E. и соавт., где установлена ассоциация с возрастом дебюта НЯК [6]. Согласно исследованию Yang Cheng и соавт. данный полиморфизм гена TLR2 не ассоциирован с предрасположенностью к НЯК у азиатов [5]. В нашей работе у больных НЯК показано изменение частот аллелей и генотипов Pro249Ser TLR6 на уровне тенденции, что не позволяет рассматривать данный полиморфизм как значимый фактор риска. Однако в метаанализе, проведенном Wang H. и соавт., удалось подтвердить значимость Pro249Ser TLR6 в обобщенной группе больных воспалительными заболеваниями кишечника [11].

Вероятно, различия в ассоциации предрасположенности к НЯК от носительства определенных генотипов и аллельных вариантов Arg753Gln TLR2 и Pro249Ser TLR6 могут зависеть от этнической принадлежности больных.

В доступной литературе отсутствуют данные об ассоциации SNPs TLR2 и TLR6 с предрасположенностью к СРК.

Таким образом, полученные результаты показывают, что гены основных членов семейства TLR2 по-разному ассоциированы с неспецифическим язвенным колитом и синдромом раздраженного кишечника. В качестве поиска потенциальных

биомаркеров предрасположенности к НЯК и СРК целесообразно не только использовать носительство аллелей и генотипов отдельных генов TLR2 и TLR6, но и рассмотреть их межгенные взаимодействия с другими Toll-подобными рецепторами.

Список литературы / References

1. Бурмистрова А.Л., Беляева С.В. Визуализация генетических комбинаций, участвующих в формировании воспалительного ответа при туберкулезе легких, методом канонического анализа соответствий // Вестник Челябинского государственного университета, 2015. № 21 (376). С. 12-16. [Burmistrova A.L., Belyaeva S.V. Visualization of genetic combinations involved in the formation of the inflammatory response in pulmonary tuberculosis by the method of canonical correspondence analysis. *Vestnik Chelyabinskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of the Chelyabinsk State University*, 2015, no. 21 (376), pp. 12-16. (In Russ.)]
2. Евдокимов А.В., Бурмистрова А.Л., Сулова Т.А. Определение частоты распределения точкового полиморфизма 745C>T гена TLR6 в популяциях нагайбаков и башкир Челябинской области // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 311-314. [Evdokimov A.V., Burmistrova A.L., Suslova T.A. Determination of the distribution frequency of point polymorphism 745C>T of the TLR6 gene in the populations of Nagaybaks and Bashkirs of the Chelyabinsk region. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 3, pp. 311-314. (In Russ.)]
3. Сташкевич Д.С., Бурмистрова А.Л. Генетический полиморфизм толл-подобного рецептора 2 у больных ревматоидным артритом русской популяции Челябинской области // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13, № 3. С. 1289-1292. [Stashkevich D.S., Burmistrova A.L. Genetic polymorphism of toll-like receptor 2 in patients with rheumatoid arthritis of the Russian population of the Chelyabinsk region. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 3, pp. 1289-1292. (In Russ.)]
4. Belmonte L., Beutheu Youmba S., Bertiaux-Vandaële N., Antonietti M., Lecleire S., Zalar A., Gourcerol G., Leroi A.-M., Déchelotte P., Coëffier M., Ducroté P. Role of toll like receptors in irritable bowel syndrome: differential mucosal immune activation according to the disease subtype. *PLoS One*, 2012. Vol. 7, no. 8, e42777. doi: 10.1371/journal.pone.0042777.
5. Cheng Y., Zhu Y., Huang X., Zhang W., Han Z., Liu S. Association between TLR2 and TLR4 gene polymorphisms and the susceptibility to inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *PLoS One*, 2015. Vol. 10, no. 5, e0126803. doi: 10.1371/journal.pone.0126803.
6. Dorofeyev A.E., Dorofeyeva A.A., Kiriyan E.A., Rassokhina O.A., Dynia Y.Z. Genetic polymorphism in patients with early and late onset of ulcerative colitis. *Wiad Lek*, 2020, Vol. 73, no. 1, pp. 87-90.
7. Excoffier L., Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol. Biol. Evol.*, 1995, Vol. 12, no. 5, pp. 921-927.
8. Hu Y., Ye Z., Wu M., She Y., Li L., Xu Y., Qin K., Hu Z., Yang M., Lu F., Ye Q. The communication between intestinal microbiota and ulcerative colitis: an exploration of pathogenesis, animal models, and potential therapeutic strategies. *Front. Med. (Lausanne)*, 2021, Vol. 8, 766126. doi:10.3389/fmed.2021.766126.
9. Jaen O., Petit-Teixeira E., Kirsten H., Ahnert P., Semerano L., Pierlot C., Cornelis F., Boissier M.-C., Falgarone G., European Consortium on Rheumatoid Arthritis Families. No evidence of major effects in several Toll-like receptor gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2009. Vol. 11, no. 1, R5. doi: 10.1186/ar2589.
10. SNPStats your web tool for SNP analysis. Available at: <https://www.snpstats.net/start.htm> [Date of access 15.05.2022].
11. Wang H., Zhou S., Zhang J., Lei S., Zhou J. Correlations between TLR polymorphisms and inflammatory bowel disease: a meta-analysis of 49 case-control studies. *Immunol. Res.*, 2019, Vol. 67, no. 1, pp. 142-150.
12. Zhang Y., Jiang T., Yang X., Xue Y., Wang C., Liu J., Zhang X., Chen Z., Zhao M., Li J.C. Toll-like receptor -1, -2, and -6 polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 5, e63357. doi: 10.1371/journal.pone.0063357.

Авторы:

Сташкевич Д.С. — к.б.н., доцент, декан биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Беляева С.В. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Евдокимов А.В. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Stashkevich D.S., PhD (Biology), Associate Professor, Dean, Biological faculty, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Belyaeva S.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Biological faculty, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Evdokimov A.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Biological faculty, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 15.05.2022

Принята к печати 29.05.2022

Received 15.05.2022

Accepted 29.05.2022

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛПС-СТИМУЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК МИКРОГЛИИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ОРЕКСИНА А

Сынчикова А.П., Корнева Е.А.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Интерес к исследованию функции орексин-содержащих нейронов обусловлен сравнительно недавним их открытием и перспективой применения орексинов для лечения заболеваний различной природы.

Изучение их участия в регуляции клеток микроглии имеет небольшую историю и представляет особый интерес, поскольку возможность воздействия на функциональную активность клеток иммунной системы мозга имеет первостепенное значение для терапии различных форм патологии ЦНС.

Перспективные пути поиска и результаты исследования терапевтических эффектов орексинов при воспалительных, аутоиммунных заболеваниях и опухолях.

Существуют литературные данные, демонстрирующие, что орексины могут оказывать терапевтические эффекты при различных формах патологии, вызванных нарушением нейроиммунных взаимодействий. Доказано участие этой нейромедиаторной системы в патогенезе развития нарколепсии, ожирения, рассеянного склероза, болезни Альцгеймера, заболеваний кишечника, септического шока и рака, что обусловлено участием орексинов в регуляции функций различных компонентов иммунной систем, в том числе и клеток микроглии. Хотя характер этого участия не полностью ясен, полученные в последние годы экспериментальные данные являются основой для понимания механизмов действия орексинов на функциональную активность клеток иммунной системы мозга.

Комплекс проведенных ранее исследований позволил установить эффекты действия орексина на морфофункциональные особенности микроглиоцитов при активации ЛПС, что представляется перспективным для разработки новых подходов к терапии инфекционных, воспалительных, нейродегенеративных и аутоиммунных процессов, происходящих в центральной нервной системе. Целью данного исследования является определение эффектов действия нейромедиатора орексина А на функциональные особенности клеток микроглии, активированных ЛПС (фенотип М1), показателями которой являются изменения площади их тела и длины отростков, а также плотность распределения этих клеток.

Исследовано изменение количества клеток микроглии после интраперитонеального введения липополисахарида. Показано, что результате воздействия ЛПС происходит возрастание степени активации этих клеток: происходит увеличение количества микроглиальных клеток в соматосенсорной зоне коры головного мозга.

Комплекс проведенных исследований позволил показать, что интрацеребровентрикулярное введение орексина-А животным после предварительной инъекции ЛПС не вызывает изменений процессов, инициированных ЛПС, анализ не позволил выявить изменений длины отростков микроглиальных клеток, локализованных в соматосенсорной, моторной зонах коры и полосатого тела. В будущем будет произведен дальнейший анализ других показателей активации клеток микроглии.

Ключевые слова: клетки микроглии, орексин А, ЛПС

Адрес для переписки:

Сынчикова Анна Павловна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197022, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (921) 941-02-06.
E-mail: 9410206@gmail.com

Address for correspondence:

Synchikova Anna P.
Research Institute of Experimental Medicine
197022, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (921) 941-02-06.
E-mail: 9410206@gmail.com

Образец цитирования:

А.П. Сынчикова, Е.А. Корнева «Морфофункциональные характеристики ЛПС-стимулированных клеток микроглии при действии орексина А» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 333-338. doi: 10.46235/1028-7221-1144-MAF

© Сынчикова А.П., Корнева Е.А., 2022

For citation:

A.P. Synchikova, E.A. Korneva "Morphological and functional characteristics of LPS-stimulated microglial cells under the action of orexin A", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 333-338. doi: 10.46235/1028-7221-1144-MAF

DOI: 10.46235/1028-7221-1144-MAF

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF LPS-STIMULATED MICROGLIAL CELLS UNDER THE ACTION OF OREXIN A

Synchikova A.P., Korneva E.A.

Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Interest to the orexin-containing neurons is caused by their recent discovery and perspectives of their usage for treatment of different diseases. The studies in this area were launched recently and are of special interest since the opportunity of modulating functional activity of the brain immune system is of pivotal significance for therapy of various central nervous system (CNS) disorders providing novel ways of search and promising data on therapeutic effects of orexins in inflammatory, autoimmune diseases as well as malignant tumors.

Some data from literature show that orexins may exert therapeutic effects in different disorders caused by altered neuroimmune interactions. Participation of this neuromediator system is shown in pathogenesis of narcolepsia, obesity, multiple sclerosis, Alzheimer disease, intestinal disorders, septic shock and cancer, due to involvement of orexins in functional regulation of various components of immune system, e.g., microglial cell populations. Despite only scarce data on these effects, some experimental results obtained over last years, add to our understanding of orexin effects upon functional activity of the brain immune system.

A number of previous studies allowed to assess the orexin effects on morpho-functional features of microglial cells activated by lipopolysaccharide (LPS), thus presenting a prospective for development of novel approaches to therapy of infectious, inflammatory, neurodegenerative and autoimmune disorders affecting CNS. In the present study, we aimed for detecting the effects of neuromediator orexin A upon functional traits of microglial cells activated by LPS (M1 phenotype) as evaluated by changes of their size and length of their processes, as well as density of cell distribution.

We have studied the changes of microglia cell numbers following intraperitoneal LPS injection. It was shown that, the LPS causes higher activation degree of these cells, i.e., the contents of microglial cells becomes increased in somatosensory area of the brain cortex. A series of these studies allowed us to demonstrate that intracerebroventricular injection of orexin A in animals following LPS injection does not cause detectable changes of the processes initiated by LPS. The comparative analysis did not detect any changes in length of microglial processes localized in somatosensory or motor cortical areas, and corpus striatum. Other parameters of the microglial cell activation will be studied in future.

Keywords: microglia, orexin A, LPS

Это исследование было поддержано Японо-российским центром молодежных обменов (JREX, Токио, Япония) и выполнялось в лаборатории Гомеостатических разработок Национального Института физиологических наук, Окадзаки, Япония, под руководством профессора Ю. Набекура.

Введение

Клетки микроглии выполняют защитную функцию и по существу представляют собой иммунциты, резидентно присутствующие в центральной нервной системе [5]. При развитии аутоиммунных заболеваний клетки микроглии выполняют функцию макрофагов, которые активируются при развитии патологических процессов в мозге, приобретают амебоидную форму, повышается экспрессия рецепторов комплемента и молекул основного комплекса гистосовместимости, а также Toll-подобных рецепторов на их мембране [13].

Активированные клетки микроглии синтезируют ряд растворимых факторов, большинство из которых – цитотоксические. При их активации увеличивается экспрессия молекул основного комплекса гистосовместимости (МНС) и костимулирующих молекул, таких как B7 и CD40, что позволяет эффективно презентировать антигены Т-клеткам. Нейротрофины и противовоспалительные цитокины подавляют экспрессию этих молекул, что указывает на наличие регуляторных сигналов, модулирующих функции микроглии [15]. При развитии аутоиммунных заболеваний центральной нервной системы повышение экспрессии МНС, костимулирующих молекул и последующая презентация антигена клетками микроглии приводит к активации Т-клеток, распознающих антигены в центральной нервной системе, что может обусловить повреждение нейронов.

Клетки микроглии, как и макрофаги крови, активируются при повреждении головного мозга и развитии инфекционного процесса, мигрируют в пораженный участок. Повреждение нейронов

ведет к трансформации клеток микроглии в мигрирующие макрофаги округлой формы, которые продуцируют цитокины и трофические факторы, оказывающие повреждающее или защитное действие на клетки мозга [8].

Клетки микроглии активируются даже при небольших изменениях антигенного состава микроокружения и при помощи отростков отслеживают поврежденные клетки, апоптотические тельца, нейрофибрилярные клубки, а, например, при болезни Альцгеймера – фрагменты ДНК или бляшки [3].

В процессе развития мозга микроглиальные клетки играют основную роль в регуляции количества клеток-предшественников нейронов и удаляют умершие нейроны [14]. Эти клетки принимают участие в перестройке синаптических связей, ремоделируя и вызывая деструкцию ненужных синапсов [10].

Помимо поглощения и разрушения чужеродных веществ с помощью фагоцитоза, микроглиоциты оказывают цитотоксическое действие и, выделяя оксид азота и перекись водорода, активируют процесс повреждения клеток и гибели нейронов [4], а также продукцию эксайтотоксичных веществ, таких как глутамат.

И хотя клетки микроглии являются важнейшим компонентом иммунной системы мозга, их избыточная активация может оказывать нежелательные цитотоксические эффекты и приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний [2]. Кроме того, затянувшийся воспалительный процесс в структурах мозга с участием микроглиоцитов может заканчиваться разрушением нейронов и развитием аутоиммунных реакций [12]. В связи с этим актуальным является поиск возможных регуляторных молекул эндогенного происхождения, которые оказывают противовоспалительное действие и коррегируют избыточную активность клеток микроглии. Одной из таких регуляторных молекул является орексин А.

Орексины – сравнительно недавно открытые нейропептиды, вырабатываемые небольшой популяцией гипоталамических нейронов, аксоны которых проецируются в различные структуры головного и спинного мозга [11]. Локализация орексинпродуцирующих нейронов, обилие их отростков и распределение рецепторов объясняют широкий спектр физиологических реакций, которые регулируются этой системой.

Спектр вегетативных функций, в регуляции которых участвуют орексин-содержащие нейроны, действительно разнообразен. Наиболее изученными в настоящее время является участие орексинов в поддержании цикла сон/бодрствование [6]. Система орексин-содержащих нейронов участвует в механизмах реализации нейроиммунного взаимодействия, в том числе в ответе ЦНС на антигенный стимул. Активация нейронов, содержащих орексин, показана после инъекции ли-

пополисахарида (ЛПС) у различных животных. Предполагается, что нейроны, синтезирующие орексины, участвуют в комплексе антиген-индуцированных реакций, опосредующих развитие продромального периода заболеваний [7].

Дисфункция этой системы констатирована при различных формах патологии, связанных с нейродегенеративными и аутоиммунными процессами. Нарушение функции орексинэргической системы показано при нарколепсии [9]. Вопрос участия орексин-содержащих нейронов в патогенезе рассеянного склероза (РС) активно изучается.

Известно, что орексин А оказывает терапевтическое действие на течение аутоиммунного энцефаломиелита, ограничивая инфильтрацию патогенными CD4⁺Т-лимфоцитами, снижая уровень хемокинов (MCP-1/CCL2 и IP-10/CXCL10) и цитокинов (IFN γ (Th1), IL-17 (Th17), TNF α , IL-10 и TGF- β) в центральной нервной системе [1].

Введение орексинов снижает повреждение головного мозга при очаговой ишемии у мышей, что связано со снижением экспрессии IL-6 и TNF α . Кроме того, подкожное введение орексина А увеличивает выживаемость мышей с индуцированным введением липополисахарида эндотоксическим шоком, снижая уровень провоспалительных цитокинов и хемокинов.

Целью данного исследования является определение возможного участия орексинов в регуляции функций микроглиоцитов.

Орексины, активируя основные аминергические нейромедиаторные системы, являются нейромедиаторами и обладают выраженным противовоспалительным эффектом. Однако механизмы реализации этих эффектов не ясны, как и эффекты их действия на клетки иммунной системы мозга.

Изучено действие липополисахарида на фенотипические особенности клеток микроглии в динамике. Как известно, длина филоподий микроглиальных клеток изменяется при ее активации и переходе в фенотип M1 [12]. В покое клетки микроглии имеют разветвленную форму с более длинными отростками, а при активации приобретают амбовидную форму и отростки укорачиваются.

Проведен анализ эффектов действия орексина А на морфофункциональные особенности клеток микроглии в активированном состоянии и степени экспрессии рецепторов к орексину OXR1 на мембранах их клеток.

Комплекс проведенных исследований позволил установить эффекты действия орексина на морфофункциональные особенности микроглиоцитов, что представляется перспективным для разработки новых подходов к терапии инфекционных, воспалительных, нейродегенеративных и аутоиммунных процессов, происходящих в центральной нервной системе.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Эксперименты проводили в соответствии с рекомендациями Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных Японии и их протоколы одобрены этическим комитетом по уходу и использованию животных. В исследовании использовали мышей-самцов, чтобы избежать возможных изменений во время смены фаз цикла. Животным был предоставлен свободный доступ к пище и воде, они содержались в условиях 12-часового цикла день/ночь.

Экспериментальные животные (refer: Akiyoshi 2018 eNeuro), мыши дикого типа (с57BL6, самцы в возрасте 2 месяцев (n = 9)) перед стереотаксической инъекцией получили анестезию кетаминном (74 мг/кг, внутривенно) и изофлуоран (ингаляционно).

Стереотаксические инъекции

Мышь помещали в стереотаксический прибор и надежно фиксировали голову. Затем череп обнажали и очищали. Точки лямбда и брегма на черепе находились на одинаковой высоте. Устанавливали кончик иглы на точку брегмы, фиксировали ее координаты, вычисляли координаты, необходимые для инъекции.

Животным вводили интрацеребровентрикулярно во второй желудочек раствор орексина А — 1 мкл в концентрации 0,3 мМ (Sigma-Aldrich, США). Скорость автоматической системы подачи составила не более 0,5 мкл/мин. Контрольным животным вводили 1 мкл физиологического раствора NaCl. Затем иглу извлекали, разрез зашивали и дезинфицировали.

Животных перемещали в клетку, обеспечив им легкий доступ к пище и воде на время восстановления после процедуры.

Антигенное воздействие

Спустя час после введения орексина А, животным обеих групп вводили внутривенно липополисахарид (ЛПС) в дозе 2 мг/кг веса (LPS, Funakoshi chemical, Токио, Япония). Спустя семь часов после начала эксперимента проводили интракардиальную перфузию с помощью перистальтического насоса с последующим извлечением и фиксацией мозга для иммуногистохимического анализа.

Для оценки влияния ЛПС на морфофункциональную активность микроглиальных клеток мышам внутривенно вводили ЛПС в дозе 2 мг/кг (n = 6) или физиологический раствор в том же объеме 0,1 мл (n = 3). Через 7 или 24 часа после начала эксперимента проводили перфузию, извлекали мозг для дальнейшей фиксации и иммуногистохимического анализа.

Подготовка срезов мозга

Фиксацию ткани мозга осуществляли при помощи интракардиальной перфузии, которую проводили с использованием перистальтического насоса малой мощности. В качестве промывочного буфера использовали фосфатно-солевой буфер (PBS), в качестве фиксирующего раствора — 4%-ный раствор параформальдегида (PFA). Извлекали мозг и помещали его в 4%-ный раствор параформальдегида для дальнейшей фиксации. Замороженные срезы мозга готовили с помощью вибротома (Leica Microsystem, Германия). Толщина фронтальных срезов составила 50 мкм. После нарезки срезы помещали на хранение в 1,5% раствор параформальдегида.

Имуногистохимическое окрашивание

Для отмывки от параформальдегида инкубировали срезы при комнатной температуре в течение 20 минут в растворе Cl 100 mM в фосфатно-солевом буфере (pH = 7,4). Далее осуществляли пермеабиллизацию фиксированной ткани, применяя 0,1% (вес/объем) Triton X-100 в фосфатно-солевом буфере при комнатной температуре в течение 15 минут, а затем в блокирующем буфере при комнатной температуре в течение 6 часов. Отмывали срезы в PBS 3 раза по 5 минут и помещали в блокирующий буфер (5% BSA в PBS) на 6 часов при комнатной температуре. Затем повторяли отмывку в фосфатно-солевом буфере 3 раза по 5 минут и помещали срезы в буфер (2,5% BSA в фосфатно-солевом буфере, 0,2% Tween 20), содержащий первичные моноклональные кроличьи антитела к Iba1 (в разведении 1:500, Вако, Осака, Япония), и оставляли на ночь на шейкере при +4 °C. Затем удаляли раствор с антителами и промывали в PBS, 4 раза по 30 минут для удаления несвязанных первичных антител. Инкубировали срезы с вторичными флуоресцентно-мечеными антителами Alexa Flour 488, или Alexa Fluor 594 (Abcam, United Kingdom) (1/2000) и, в зависимости от целей эксперимента, в блокирующем буфере в шейкере на низкой скорости в течение ночи при комнатной температуре или при 4 °C. Удаляли раствор с антителами и промывали в PBS 4 раза по 30 минут для удаления несвязанных вторичных антител. Далее срезы монтировали на стекла при помощи специального клея для срезов MountClue Glass.

Ядра клеток окрашивали флуоресцентным красителем VEC H-1200 с DAPI. Анализ клеток микроглии в ткани головного мозга проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Nikon Eclipse TI (Токио, Япония).

Анализировали коронарные срезы мозга в области соматомоторной и соматосенсорной коры на уровнях 33-35 по атласу (Allen Brain Atlas). Обработку полученных фотографий проводили с помощью программы ImageJ с использованием плагина Simple Neurite Tracer и Multi-point.

Результаты и обсуждение

Реакции клеток микроглии на внутрижелудочковое введение орексина А у мышей

Проанализированы размеры микроглиоцитов, локализованных в соматосенсорной и моторной зонах коры и полосатого тела, а также их

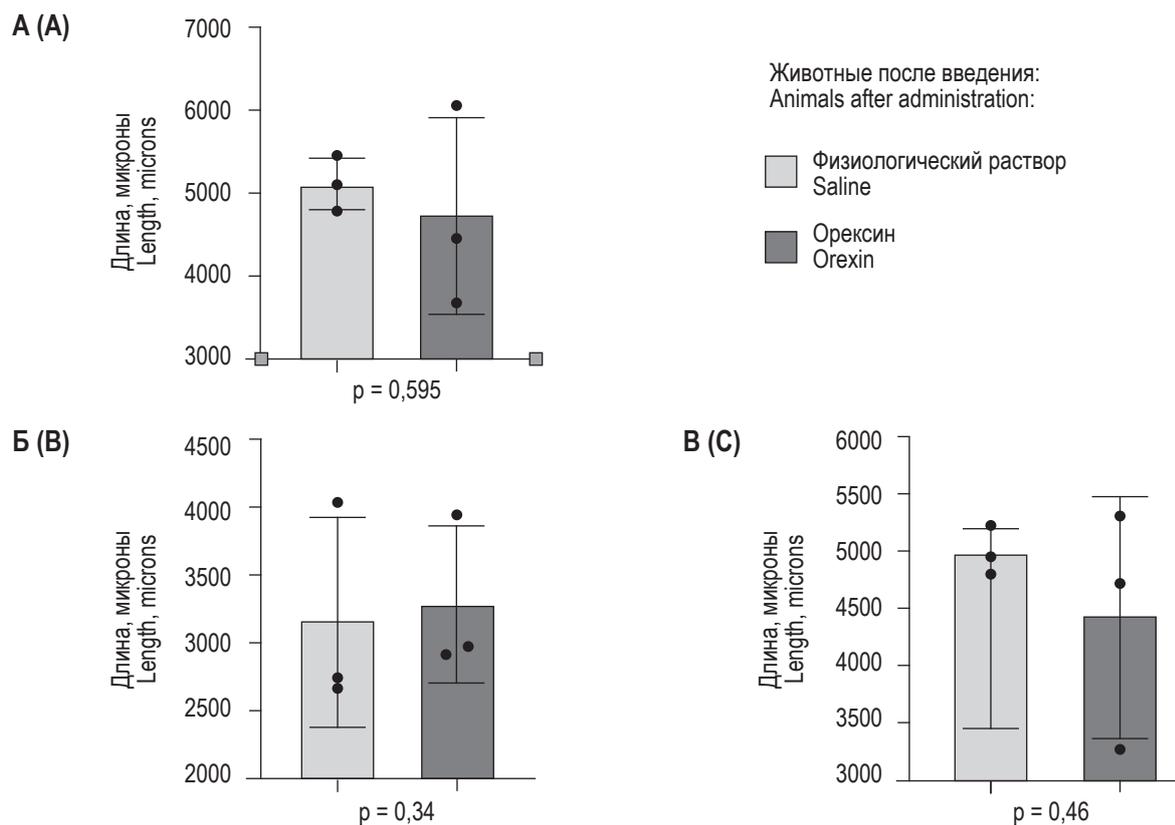


Рисунок 1. Длина отростков микроглиальных клеток, локализованных в соматосенсорной (А), моторной зонах коры (Б) и полосатого тела (В)

Figure 1. The length of processes of microglial cells localized in the somatosensory (A), motor cortex (B), and striatum (C)

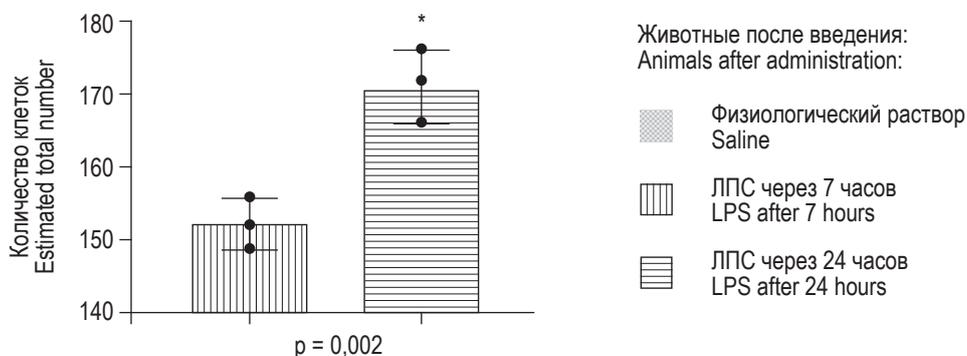


Рисунок 2. Количество клеток микроглии в зоне S1 коры головного мозга после введения ЛПС (через 7 и 24 часа)

Figure 2. Number of microglial cells in the somatosensory zone of the cerebral cortex after LPS administration (after 7 and 24 hours)

отростков после введения орексина А. Проведенный анализ не позволил выявить изменений отростков микроглиальных клеток (рис. 1).

Реакции клеток микроглии мышей на внутрибрюшинное введение липополисахарида

Подсчет количества микроглиоцитов на срезах соматосенсорной коры позволил установить возрастание степени активации этих клеток при введении ЛПС: происходит увеличение количества микроглиальных клеток в соматосенсорной коре на 12% через 7 часов и на 25% через 24 часа (рис. 2).

Заключение

Клетки микроглии выполняют защитную функцию и являются иммунocyтaми, присутствующими в центральной нервной системе. Их активация приводит к выработке цитокинов, которые могут оказывать повреждающее или защитное действие на клетки мозга. Как известно, Орексин А обладает противовоспалительным и нейропротективным действием. Подкожное введение орексина А повышает выживаемость мышей с индуцированным липополисахаридом

эндотоксиновым шоком на 80%, снижая уровень провоспалительных цитокинов и хемокинов.

Таким образом, исследование эффектов действия орексина А, вводимого во второй желудочек мозга, на морфофункциональные характеристики клеток микроглии, активированных внутрибрюшинной инъекцией липополисахарида (ЛПС), позволило констатировать изменение количества и морфофункциональных особенностей клеток микроглии в соматосенсорной коре, а именно активности микроглиоцитов, на мембранах которых представлены рецепторы к орексинам OXR1. И хотя введение орексина-А животным после предварительной инъекции ЛПС

не вызвало значительных изменений процессов, инициированных действием ЛПС, происходит увеличение длины их отростков в моторной зоне коры головного мозга.

Более того, продемонстрировано изменение количества рецепторов к орексинам OXR1 на клетках микроглии при введении липополисахарида.

Установленные в настоящей работе эффекты нейромедиатора орексина А на морфофункциональные характеристики клеток микроглии могут служить основой для создания препаратов, позволяющих адресно коррегировать функции иммунной системы мозга.

Список литературы / References

1. Becquet L., Abad C., Leclercq M., Miel C., Jean L., Riou G., Couvineau A., Boyer O., Tan Y.-V. Systemic administration of orexin A ameliorates established experimental autoimmune encephalomyelitis by diminishing neuroinflammation. *Neuroinflammation*, 2019, Vol. 16, 64. doi: 10.1186/s12974-019-1447-y.
2. Biber K., Möller T., Boddeke E., Prinz M. Central nervous system myeloid cells as drug targets: current status and translational challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2016, Vol. 15, no. 2, pp. 110-124.
3. Daria A., Colombo A., Llovera G., Hampel H., Willem M., Liesz A., Haass C., Tahirovic S. Young microglia restore amyloid plaque clearance of aged microglia. *EMBO J.*, 2016, Vol. 36, no. 5, pp. 583-603.
4. DeCoursey T.E., Morgan D., Cherny V.V. The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. *Nature*, 2003, Vol. 422, no. 6931, pp. 531-534.
5. Dheen S.T., Kaur C., Ling E.A. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr. Med. Chem.*, 2007, Vol. 14, no. 11, pp. 1189-1197.
6. España R.A., Baldo B.A., Kelley A.E., Berridge C.W. Wake-promoting and sleep-suppressing actions of hypocretin (orexin): basal forebrain sites of action. *Neuroscience*, 2001, Vol. 106, no. 4, pp. 699-715.
7. Gaykema R.P.A., Goehler L.E. Lipopolysaccharide challenge-induced suppression of Fos in hypothalamic orexin neurons: their potential role in sickness behavior. *Brain Behav. Immun.*, 2009, Vol. 23, no. 7, pp. 926-930.
8. Kettenmann H., Hanisch U.K., Noda M., Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.*, 2011, Vol. 91, no. 2, pp. 461-553.
9. Nishino S., Fujiki N., Ripley B., Sakurai E., Kato M., Watanabe T., Mignot E., Yanai K. Decreased brain histamine content in hypocretin/orexin receptor-2 mutated narcoleptic dogs. *Neurosci. Lett.*, 2001, Vol. 313, no. 3, pp. 125-128.
10. Paolicelli R.C., Bolasco G., Pagani F., Maggi L., Scianni M. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 2011, Vol. 333, no. 6048, pp. 1456-1458.
11. Peyron C., Tighe D.K., van den Pol A.N., de Lecea L., Heller H.C., Sutcliffe J.G., Kilduff T.S. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.*, 1998, Vol. 18, no. 23, pp. 9996-10015.
12. Ransohoff R.M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, 2016, Vol. 353, no. 6301, pp. 777-783.
13. Rock R.B., Peterson P.K. Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. *Neuroimmun. Pharmacol.*, 2006, Vol. 1, no. 2, pp. 117-126.
14. Thanos S. The Relationship of microglial cells to dying neurons during natural neuronal cell death and axotomy-induced degeneration of the rat retina. *Eur. J. Neurosci.*, 1991, Vol. 3, pp. 1189-1207.
15. Wei R., Jonakait G.M. Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, and IL-11 and transforming growth factor-B1 (TGF-B1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *Neuroimmunol.*, 1999, Vol. 95, no. 1-2, pp. 8-18.

Авторы:

Сынчикова А.П. — аспирант отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Корнева Е.А. — профессор, академик РАН, главный научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Synchikova A.P., Postgraduate Student, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Korneva E.A., Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Chief Research Associate, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 16.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 16.05.2022
Accepted 29.05.2022

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ НЕЙТРОФИЛОВ ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ ИХ С СУТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ *S. AUREUS*, ИМЕЮЩИХ И НЕ ИМЕЮЩИХ ГЕН *spa*

Фомина Л.О.¹, Гриценко В.А.², Файзуллина А.И.¹

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

² ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Оренбург, Российская Федерация

Резюме. В работе приведены результаты определения цитокинов в супернатантах нейтрофилов цельной крови, стимулированных *Staphylococcus aureus*, имеющих и не имеющих ген *spa*.

В экспериментах использовали 20 клинических изолятов *S. aureus*, из них 10, имеющих ген *spa*, и 10, не имеющих ген *spa*, но при этом были отобраны штаммы, обладающие очень высокой способностью секретировать цитокиноподобные вещества (ЦПВ), как по уровню, так и по спектру цитокинов. Штаммы *S. aureus* разделяли на две группы в зависимости от *spa*-статуса, установленного с помощью банка данных по типированию генов *spa* (<http://spa.ridom.de/>).

Нейтрофилы доноров, выделяли на двойном градиенте фиколл-верографина, по стандартной методике, в концентрации 5×10^6 . Бактерии брали в соотношении 1:20 к нейтрофилам (в концентрации 10^8 бактерий /мл).

Влияние стафилококков на секрецию цитокинов нейтрофилами определяли на приборе Magpix-100 (США), с использованием иммунофлюоресцентных мультиплексных наборов компании БиоРад (США) для детекции 17 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, TNF α , MCP-1, MIP-1 β) после 1 часа инкубации с нейтрофилами.

Установлено, что стафилококки, обладающие высокой степенью циткиноподобной активности, независимо от наличия или отсутствия у них гена *spa*, влияют на способность нейтрофилов секретировать цитокины. При этом *S. aureus*, имеющие ген *spa*, усиливают секрецию IL-1 β , TNF α , IL-6 (провоспалительные цитокины), но при этом снижали секрецию IL-8, MIP-1 β (хемокины). *S. aureus*, у которых нет генов к *spa*, обладают более разнообразным по спектру и силе воздействием на секрецию цитокинов нейтрофилами провоспалительных цитокинов, таких как IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-1 β , IL-2, TNF α и росткового фактора G-CSF. Оба варианта стафилококков снижали секрецию IL-6.

Ключевые слова: цитокины, цитокиноподобные вещества, мультиплексный анализ, *S. aureus*, *spa*, гены, нейтрофилы, антигены

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Л.О. Фомина, В.А. Гриценко, А.И. Файзуллина
«Сравнительная характеристика содержания
цитокинов в супернатантах нейтрофилов после
инкубации их с суточными культурами *S. aureus*,
имеющих и не имеющих ген *spa*» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 339-344.
doi: 10.46235/1028-7221-1140-CCO

© Фомина Л.О. и соавт., 2022

For citation:

L.O. Fomina, V.A. Gritsenko, A.I. Fayzullina "Comparative characteristics of cytokine content in neutrophil supernatants after incubation with daily cultures of *S. aureus* with or without *spa* gene", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 339-344. doi: 10.46235/1028-7221-1140-CCO

DOI: 10.46235/1028-7221-1140-CCO

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF CYTOKINE CONTENT IN NEUTROPHIL SUPERNATANTS AFTER INCUBATION WITH DAILY CULTURES OF *S. AUREUS* WITH OR WITHOUT *spa* GENE

Fomina L.O.^a, Gritsenko V.A.^b, Fayzullina A.I.^a

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

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

Abstract. The study was aimed for assessment of cytokine profile in the whole blood neutrophil supernatants stimulated by *Staphylococcus aureus*, with and without the *spa* gene.

20 clinical isolates of *S. aureus* were tested in vitro. Ten of them carried *spa* gene and other 10 were without the *spa* gene. We selected the strains with very high ability to secrete cytokine-like substances (CLS), both in terms of the level and spectrum of the cytokines. The *S. aureus* strains were divided into two groups depending on the *spa* status according to the data from the *spa* genotyping databank (<http://spa.ridom.de/>). The neutrophils of donors were isolated in a double gradient of Ficoll-Verografin, according to the standard method, at a concentration of 5×10^6 . The bacteria were taken at a ratio of 1:20 to neutrophils (at a concentration of 10^8 bacteria/mL). The effect of staphylococci on cytokine secretion by neutrophils was determined with a Magpix-100 device (USA), using immunofluorescence multiplex kits from BioRad (USA) for the detection of 17 cytokines (G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, TNF α , MCP-1, MIP-1 β) after 1 hour incubation with the neutrophils. Results: It has been shown that staphylococci with a high degree of CLS activity, regardless of presence or absence of the *spa* gene, affected the ability of neutrophils to secrete cytokines. At the same time, *S. aureus* carrying the *spa* gene caused increased secretion of IL-1 β , TNF α , IL-6 (pro-inflammatory cytokines), but, at the same time, it reduced secretion of IL-8, MIP-1 β (chemokines). *S. aureus* strains devoid of *spa* genes have a more diverse spectrum and more pronounced effect on cytokine secretion of proinflammatory cytokines by neutrophils, e.g., IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-1 β , IL-2, TNF α and the G-CSF growth factor. Both variants of staphylococci caused reduction of IL-6 secretion.

Keywords: cytokines, cytokine-like substances, multiplex analysis, *S. aureus*, *spa* gene, neutrophils, antigens

Введение

Ранее нашими исследованиями было показано, что грамположительные и грамотрицательные бактерии способны секретировать во внешнюю среду цитокиноподобные вещества [3]. При этом наибольшей, как по спектру, так и по уровню цитокиноподобной активности обладают стафилококки [3, 4, 5, 6, 8, 9, 10], среди которых отдельное внимание заслуживает золотистый стафилококк, как один из основных возбудителей внебольничных и внутрибольничных инфекций по всему миру. Обладая широким репертуаром факторов патогенности, обусловленного особенностями структуры генома, золотистый стафилококк инициирует в клетках макроорганизма синтез и секрецию молекул и медиаторов, обеспечивающих реакцию воспаления и, соответственно, провоспалительных цитокинов [13].

Сравнительно недавно, было установлено непосредственное взаимодействие стафилококкового фактора вирулентности (белок А) с рецептором фактора некроза опухоли 1 в эпителии

дыхательных путей и зафиксировано воспроизведение эффектов фактора некроза опухоли альфа [12]. Что согласуется с нашими недавними исследованиями, где было показано, что у некоторых стафилококков это связано с наличием у них белка А [6, 8, 11]. В то же время было показано, что стафилококки, не имеющие белка А, также обладают выраженной способностью секретировать цитокиноподобные вещества [6, 8].

Ранее нами было показано, что стафилококки влияют на спонтанную продукцию цитокинов нейтрофилами [1, 2]. Однако, влияние на спонтанную продукцию цитокинов нейтрофилами стафилококков, имеющих белок А и не имеющих белок А, но при этом обладающих высокой цитокиноподобной активностью, ранее не изучалось.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния клинических и музейных штаммов *S. aureus* на продукцию цитокинов нейтрофилами при использовании тест-систем для мультиплексного анализа, с учетом различий генетических детерминант по гену *spa*.

Материалы и методы

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

В экспериментах использовали 20 клинических изолятов *S. aureus*, из них 10 – имеющих ген *spa* и 10 – не имеющих ген *spa*, но при этом были отобраны штаммы, обладающие очень высокой способностью секретировать цитокиноподобные вещества (ЦПВ), как по уровню, так и по спектру цитокинов. Штаммы стафилококков были получены от разных больных и с различных эпитопов их обитания. Часть изолятов были выделены из ран у больных с синдромом диабетической стопы, другие из влагалища у женщин с миомой матки, из пустул у новорожденных с пиодермией. Изучали суточные культуры бактерии, выращенных на мясопептонном бульоне (МПБ), после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут, потом концентрацию бактерий доводили до 10^8 . Штаммы *S. aureus* разделяли на две группы в зависимости от *spa*-статуса, установленного с помощью банка данных по типированию генов *spa* (<http://spa.ridom.de/>).

Нейтрофилы доноров, выделенные на двойном градиенте фиколл-верографина по стандартной методике, доводили после промывки до концентрации 5×10^6 клеток/мл, и инкубировали в среде RPMI-1640 в течение одного часа при 37°C в термостате с бактериями (опыт) или без них (контроль). Бактерии брали в соотношении 1:20 к нейтрофилам (в концентрации 10^8 бактерий /мл).

Влияние стафилококков на секрецию цитокинов нейтрофилами определяли на приборе Magpix-100 (США), с использованием иммунофлюоресцентных мультиплексных наборов компании БиоРад (США) для детекции 17 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, $\text{IFN}\gamma$, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, TNF α , MCP-1, MIP-1 β) после 1 часа инкубации с нейтрофилами. Контролем выступил супернатант неактивированных нейтрофилов. Полученные результаты округляли до 0,1-0,9 пкг/мл.

Анализ и систематизация экспериментальных данных, а также визуализация, полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2013. Данные по концентрациям определяемых веществ выражали при помощи среднеарифметического значения группы и его стандартного отклонения. Результаты полученных данных описывались при помощи среднеарифметического значения (M) и стандартной ошибки среднего (m). Достоверность отличий определяли с помощью U-критерия

Манна–Уитни (различия считали достоверными при $p < 0,05$) [7]. для независимых совокупностей с помощью программы IBM SPSS Statistics версия 23.0.

Результаты и обсуждение

Полученные данные, суммированные в таблице 1, свидетельствуют о том, что клинические изоляты *S. aureus* при инкубации с нейтрофилами изменяют способность этими клетками секретировать цитокины. При этом такая способность была различна у *S. aureus*, в зависимости *spa*-статуса. Так, *S. aureus*, у которых присутствует ген белка А, значительно стимулировали секрецию нейтрофилами IL-1 β , TNF α (провоспалительные цитокины), но при этом снижали секрецию IL-8, MIP-1 β (хемокины). В то время как *S. aureus*, у которых нет белка А, в основном вызывали стимуляцию секреции ростовых факторов и провоспалительных цитокинов, таких как G-CSF, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-1 β , IL-2, TNF α . При этом степень активации этих цитокинов, за исключением IL-1 β , была выше не только по отношению к контролю, но и по отношению к стафилококкам, имеющих ген к белку А. Кроме того, оба варианта стафилококков снижали секрецию нейтрофилами IL-6, но имеющие белок А бактерии снижали IL-6 наиболее интенсивно по сравнению со стафилококками, не имеющими этого белка.

В проведенном исследовании установлено, что стафилококки, обладающие высокой степенью циткиноподобной активности, независимо от наличия или отсутствия у них гена *spa*, влияют на способность нейтрофилов секретировать цитокины. При этом *S. aureus*, имеющие ген *spa*, усиливают секрецию IL-1 β , TNF α , IL-6 (провоспалительные цитокины), но при этом снижали секрецию IL-8, MIP-1 β (хемокины). *S. aureus*, у которых нет генов к *spa*, обладают более разнообразным по спектру и силе воздействием на секрецию цитокинов нейтрофилами провоспалительных цитокинов, таких как IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-1 β , IL-2, TNF α и росткового фактора G-CSF. Оба варианта стафилококков снижали секрецию IL-6. Эти данные свидетельствуют о нескольких очень важных аспектах. Во-первых наличие или отсутствие генов белка А у стафилококков, способных к секреции цитокиноподобных веществ, не влияет на их способность к стимуляции провоспалительных цитокинов, даже наоборот, отсутствие гена к белку А стимулирует увеличение спектра провоспалительных цитокинов. Во-вторых, наличие гена белка А у *S. aureus* вызывает снижение активности хемокинов и IL-6, ключевых факторов активации фагоцитов. Все это говорит о наличии неизвестных

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТЕ НЕЙТРОФИЛОВ ПОСЛЕ 1-ЧАСОВОЙ ИНКУБАЦИИ ИХ С *S. AUREUS*, С НАЛИЧИЕМ ИЛИ ОТСУТСТВИЕМ ГЕНА *spA*

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE CYTOKINE CONTENT IN THE NEUTROPHIL SUPERNATANT AFTER 1-HOUR INCUBATION WITH *S. AUREUS*, WITH THE PRESENCE OR ABSENCE OF THE *spA* GENE

Цитокины Cytokines	Контроль (супернатант неактивированных нейтрофилов) пкг/мл Control (supernatant of inactive neutrophils) pkg/mL (n = 10), M±m	Супернатант нейтрофилов после инкубации с <i>S. aureus</i> (Ген <i>spA</i> +) пкг/мл Neutrophil supernatant after incubation with <i>S. aureus</i> (<i>spA</i> + gene) pkg/mL (n = 10), M±m	Супернатант нейтрофилов после инкубации с <i>S. aureus</i> (Ген <i>spA</i> -) пкг/мл Neutrophil supernatant after incubation with <i>S. aureus</i> (<i>spA</i> - gene) pkg/mL (n = 10), M±m
G-CSF	19,3±1,6	21,00±0,48	60,0±9,8****
GM-CSF	250,3±5,6	254,00±0,72	251,50±1,81
IL-10	35,4±3,4	40,00±0,24	52,00±3,13****
IL-12p70	23,5±1,6	22,50±0,36	34,00±2,11****
IFNγ	13,5±1,5	13,50±0,36	14,50±0,36
IL-13	11,4±1,3	11,00±0,36	12,00±0,36
IL-17A	62,5±5,6	60,00±0,24	174,0±24,3****
IL-1β	42,3±3,4	657,0±118,0*	698,0±87,5***
IL-2	38,4±4,5	38,50±0,42	68,00±7,46****
IL-4	23,5±2,4	23,00±0,24	26,00±0,32
IL-5	9,5±1,3	9,80±0,12	9,50±0,24
IL-6	122,5±9,7	66,50±0,60*	96,50±0,84****
IL-7	12,5±1,6	11,5±0,5	12,00±0,05
TNFα	16,2±1,9	21,50±0,60*	23,00±0,42**
IL-8	320,9±14,5	262,50±1,32*	347,80±3,43
MCP-1	12,4±1,9	13,30±0,12	13,50±0,24
MIP-1β	1492,8±72,7	976,0±107,4*	1663,0±21,6

Примечание.* – достоверность отличий между группами Ген *spA*+ от Контроля, ** – достоверность отличий между группами Ген *spA*- от Контроля, *** – достоверность отличий Ген *spA*+ от Ген *spA*- ($p < 0,05$).

Note.*, the reliability of the differences between the groups of the *spA*+ Gene from the Control; **, the reliability of the differences between the groups of the *spA*- Gene from the Control; ***, the reliability of the differences between the *spA*+ Gene from the *spA*- Gene ($p < 0.05$).

ранее механизмов воздействия этих бактерий на цитокинопродукцию нейтрофилов. Поэтому в дальнейшем необходимо рассмотреть влияние супернатантов этих бактерий на секрецию нейтрофилами цитокинов, так как именно с супернатантами *S. aureus* и связана цитокиноподобная активность этих бактерий.

Выводы

1. *S. aureus*, имеющие ген *spA*, усиливают секрецию IL-1β, TNFα, IL-6 (провоспалительные

цитокины), но при этом снижают секрецию IL-8, MIP-1β (хемокины) нейтрофилами.

2. *S. aureus*, у которых нет генов к *spA*, обладают более разнообразным по спектру и силе воздействием на секрецию цитокинов нейтрофилами провоспалительных цитокинов, таких как IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-1β, IL-2, TNFα и росткового фактора G-CSF.

3. Оба варианта стафилококков, с наличием или отсутствием генов *spA*, снижали секрецию IL-6 нейтрофилами.

Список литературы / References

1. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Дукардт В.В., Гриценко В.А., Тяпаева Я.В., Черешнев В.А. Феномен наличия уникальной комбинации иммунобиологических свойств у синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2016. Т. 2. 30 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Dukardt V.V., Gritsenko V.A., Tyapayeva Ya.V., Chereshev V.A. The phenomenon of the presence of a unique combination of immunobiological properties of the synthetic analogue of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center UB RAS*, 2016, Vol. 2, 30 p. [Electronic resource]. Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>.
2. Гриценко В.А., Аминин Д.Л., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Иванов Ю.Б. Некоторые биологические эффекты иммуномодуляторов естественного и синтетического происхождения in vitro как основа создания новых лекарственных средств для борьбы с эндогенными инфекциями // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2012. Т. 3. С. 1-17. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru/magazine/Numbers/2012-3/Articles/15GricenkoVA-ADL-ZAV.pdf>. [Gritsenko V.A., Aminin D.L., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Ivanov Y.B. Some biological effects immunomodulation by natural and synthetic origin in vitro as a basis for development of new drugs to combat the endogenous infections. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of UB RAS*, 2012, Vol. 3, pp. 1-17. [Electronic resource]. Access mode: <http://elmag.uran.ru/magazine/Numbers/2012-3/Articles/15GricenkoVA-ADL-ZAV.pdf>).
3. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. Бактерии как продуценты цитокиноподобных веществ // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 3. С. 374-376. [Zurochka A.V., Dukardt V.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zuyeva E.B., Tyapayeva Y.V., Gritsenko V.A. Bacteria as producers of cytokine-like substances. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 3, pp. 374-376. (In Russ.)]
4. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Дукардт В.В., Гриценко В.А. Цитокиновая и антицитокиновая активность стафилококков. Методические особенности // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 4. С. 707-709. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zuyeva E.B., Tyapayeva Y.V., Dukardt V.V., Gritsenko V.A. Cytokine and anti-cytokine activity of staphylococci. Methodical features. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 4, pp. 707-709. (In Russ.)]
5. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. Стафилококки как продуценты цитокиноподобных веществ // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 2. С. 134-136. [Zurochka A.V., Dukardt V.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zuyeva E.B., Tyapayeva Y.V., Gritsenko V.A. Staphylococcus as producers of cytokine-like substances. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 2, pp. 134-136. (In Russ.)]
6. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Фомина Л.О., Файзуллина А.И., Добрынина М.А., Гриценко В.А. Оценка цитокиноподобной активности *Staphylococcus aureus* в зависимости от наличия генетических детерминант стафилококкового белка А // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 3. С. 1162-1167. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Fomina L.O., Fayzullina A.I., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A. Estimation of cytokine-like activity of *Staphylococcus aureus* depending on the availability of genetic determinant of staphylococcal protein A. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 22 (13), no. 3, pp. 1162-1167. (In Russ.)]
7. Медик В.А., Токмачев М.С., Фишман Б.Б. Статистика в медицине и биологии. «Теоретическая статистика». Под ред. Комарова Ю.М. М.: Медицина, 2000. 412 с. [Medik V.A., Tokmachev M.S., Fishman B.B. Statistics in medicine and biology. "Theoretical statistics". Ed. Yu.M. Komarov]. Moscow: Medicine, 2000. 412 p.
8. Файзуллина А.И., Зурочка А.В. Сравнительная оценка неспецифической активности цитокинпродуцирующих штаммов *Staphylococcus aureus*, имеющих и не имеющих ген белка А, при иммуноферментном анализе // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 163-168. [Fayzullina A.I., Zurochka A.V. "ELISA-based comparative analysis of non-specific activity for cytokine-producing protein a gene-positive and negative *Staphylococcus aureus* strains". *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 163-168. (In Russ.)]
9. Фомина Л.О., Зурочка В.А., Симбирцев А.С., Гриценко В.А. Влияние времени культивирования *Staphylococcus aureus* на продукцию ими цитокино-подобных веществ, детектируемых методом иммуноферментного анализа // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 454-459. [Fomina L.O., Zurochka V.A., Simbirtsev A.S., Gritsenko V.A. Influence of time of cultivation of *Staphylococcus aureus* on the production of cytokine-like substances that detected by ELISA. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12 (21), no. 3, pp. 454-459. (In Russ.)]
10. Фомина Л.О., Файзуллина А.И., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Симбирцев А.С., Гриценко В.А. Сравнительная оценка цитокиноподобной активности *Staphylococcus aureus* мультиплексным и иммуноферментным анализом // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 460-465. [Fomina L.O., Fayzullina A.I., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Simbirtsev A.S., Gritsenko V.A. Comparative evaluation cytokine-

like activity of *Staphylococcus aureus* by methods multiplex and ELISA. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018. Vol. 12 (21), no. 3, pp. 460-465. (In Russ.)]

11. Cronin U.P., Girardeaux L., O'Meara E., Wilkinson M.G. Protein A-mediated binding of *staphylococcus* spp. To antibodies in flow cytometric assays and reduction of this binding by using Fc receptor blocking reagent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2020. Vol. 86, no. 17, e01435-20. doi: 10.1128/AEM.01435-20.

12. Fournier B., Philpott D.J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005, Vol. 18, no. 3, pp. 521-540.

13. Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L., Oguchi A., Aoki K., Nagai Y., Lian J., Ito T., Kanamori M., Matsumaru H., Maruyama A., Murakami H., Hosoyama A., Mizutani-Ui Y., Takahashi N.K., Sawano T., Inoue R., Kaito C., Sekimizu K., Hirakawa H., Kuhara S., Goto S., Yabuzaki J., Kanehisa M., Yamashita A., Oshima K., Furuya K., Yoshino C., Shiba T., Hattori M., Ogasawara N., Hayashi H., Hiramatsu K. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 2001, Vol. 357, no. 9264, pp. 1225-1240.

Авторы:

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

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

Файзуллина А.И. – аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

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

Gritsenko V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Fayzullina A.I., Postgraduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 15.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 15.05.2022
Accepted 29.05.2022

ВЛИЯНИЕ МИФЕПРИСТОНА ПРИ ОСТРОМ СТРЕССЕ НА АПОПТОЗ ТИМОЦИТОВ МЫШЕЙ

Шилов Ю.И.^{1,2}, Шилов С.Ю.^{1,2}, Барков С.Ю.¹, Шилова Н.А.²

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

² ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Резюме. В 1936 г. канадским патологом Гансом Селье в экспериментах с адреналэктомией было доказано участие гормонов коры надпочечников в развитии акцидентальной инволюции тимуса при стрессе. К 1970-м гг. среди исследователей доминировало представление о лизисе лимфоидных клеток глюкокортикоидами как основном механизме этих изменений. Позже рассматривалась и роль усиления миграции из тимуса Т-лимфоцитов, а также снижения миграции в него костномозговых предшественников, а с 1990-х гг. – индуцированного глюкокортикоидами апоптоза. Для выяснения вклада глюкокортикоидов в те или иные процессы в условиях целостного организма удобным инструментом в экспериментальной эндокринологии и фармакологии является введение самцам крыс или мышам антагониста глюкокортикоидных и прогестероновых рецепторов мифепристона, известного также как RU-38486 или RU-486. Цель работы – исследование влияния мифепристона при остром стрессе на апоптоз тимоцитов мышей. Экспериментальные исследования выполнены на самцах белых неинбредных мышей. Мифепристон вводили однократно подкожно за 30 мин до начала иммобилизации в дозе 50 мг/кг массы тела в растворе, приготовленном на стерильном официальном оливковом масле. Контрольным мышам и животным группы сравнения вводили однократно подкожно эквивалентное количество растворителя препарата. Для экспериментального моделирования острого стресса использовали классическую модель 24-часового иммобилизационного стресса в положении на спине в пластиковом рестрейнере. Апоптоз тимоцитов оценивали с помощью проточной лазерной цитометрии с набором реактивов BD PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™) методом, адаптированным для проточного лазерного цитометра Guava EasyCyte корпорации Millipore. Установлено, что острый стресс, вызванный 24-часовой иммобилизацией мышей, приводит к увеличению в тимусе общего относительного числа 7-AAD-позитивных клеток, а также доли клеток, окрашивающиеся 7-AAD, но не аннексином V-PE (ядерный дебрис, аннексин V(-), 7-AAD (+)). Введение мифепристона нивелирует эти изменения, что подтверждает участие глюкокортикоидов в увеличении числа тимоцитов в состоянии некроза. Число тимоцитов, находящихся в состоянии раннего апоптоза (т. е. аннексин V-PE-позитивных и 7-AAD-негативных), так же как и общее относительное число клеток, несущих фосфатидилсерин (аннексин V-PE-позитивные тимоциты) при остром стрессе и стрессе на фоне введения мифепристона, не отличаются от контроля.

Ключевые слова: апоптоз, тимоциты, мыши, стресс, мифепристон, RU-38486, RU-486

Адрес для переписки:

Шилов Юрий Иванович
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (902) 794-12-90.
E-mail: jshilov@mail.ru

Address for correspondence:

Shilov Yurii I.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.
Phone: 7 (902) 794-12-90.
E-mail: jshilov@mail.ru

Образец цитирования:

Ю.И. Шилов, С.Ю. Шилов, С.Ю. Барков, Н.А. Шилова
«Влияние мифепристона при остром стрессе
на апоптоз тимоцитов мышей» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 3. С. 345-350.
doi: 10.46235/1028-7221-1147-EOM

© Шилов Ю.И. и соавт., 2022

For citation:

Yu.I. Shilov, S.Yu. Shilov, S.Yu. Barkov, N.A. Shilova “Effect
of mifepristone under acute stress on thymocyte apoptosis
in mice”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 345-350.
doi: 10.46235/1028-7221-1147-EOM

DOI: 10.46235/1028-7221-1147-EOM

EFFECT OF MIFEPRISTONE UNDER ACUTE STRESS ON THYMOCYTE APOPTOSIS IN MICE

Shilov Yu.I.^{a,b}, Shilov S.Yu.^{a,b}, Barkov S.Yu.^a, Shilova N.A.^b

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

^b E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Abstract. In 1936, the Canadian pathologist Hans Selye, in experiments with adrenalectomy, has shown adrenal cortex hormones to be involved in development of thymic acute involution under stress. By 1970s, the idea of lysis of lymphoid cells by glucocorticoids dominated among researchers as the main mechanism of these changes. Later on, increased migration of T lymphocytes from thymus as well as decreased migration of bone marrow precursors to the thymus were considered. Since 1990s, apoptosis induced by glucocorticoids was also studied in this respect. To elucidate the *in vivo* contribution of glucocorticoids these events, a convenient tool was developed in experimental endocrinology and pharmacology, i.e., treatment of male rats or mice with antagonist of glucocorticoid and progesterone receptors mifepristone, also known as RU-38486 or RU-486. The purpose of this work is to investigate the effect of mifepristone on thymocyte apoptosis in mice under acute stress. Experimental studies were performed in male white noninbred mice. Mifepristone was injected once subcutaneously 30 min before immobilization at a dose of 50 mg/kg body weight prepared in olive oil solution. Control mice and the animals from comparison group were injected once subcutaneously with an equivalent amount of the drug solvent. A classical model of 24-hour immobilization stress in a plastic restrainer (supine position) was used for experimental simulation of acute stress. Thymocyte apoptosis was assessed by flow laser cytometry with BD PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™) reagent kit adapted for Guava EasyCyte flow laser cytometer by Millipore Corporation. It was found that acute stress induced by 24-hour immobilization of mice leads to an increase in the total relative number of 7-AAD-positive cells as well as proportion of cells stained with 7-AAD, but not annexin V-PE (nuclear debris, annexin V(-), 7-AAD (+)). Administration of mifepristone alleviated these changes, thus confirming involvement of glucocorticoids in increasing number of necrotic thymocytes. The number of thymocytes in early apoptosis (i.e., annexin V-PE-positive, 7-AAD-negative), as well as total relative number of cells with phosphatidylserine exposed at the surface (annexin V-PE-positive thymocytes) under acute stress and at stress on the background of the introduction of mifepristone did not differ from the control.

Keywords: apoptosis, thymocytes, mice, stress, mifepristone, RU-38486, RU-486

Исследования проводились в рамках государственного задания «ИЭГМ УрО РАН» по теме: «Механизмы регуляции иммунной системы» — регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290007-7.

Введение

В 1936 г. канадским патологом Гансом Селье в экспериментах с адреналэктомией было доказано участие гормонов коры надпочечников в развитии акцидентальной инволюции тимуса при стрессе [6]. К 1970-м гг. среди исследователей доминировало представление о лизисе лимфоидных клеток глюкокортикоидами как основном механизме этих изменений [3]. Позже рассматривалась и роль усиления миграции из тимуса Т-лимфоцитов, а также снижения мигра-

ции в него костномозговых предшественников, а с 1990-х гг. — индуцированного глюкокортикоидами апоптоза, что детально изложено в ряде статей [1, 4]. Для выяснения вклада глюкокортикоидов в те или иные процессы в условиях целостного организма удобным инструментом в экспериментальной эндокринологии и фармакологии является введение самцам крыс или мышам антагониста глюкокортикоидных и прогестероновых рецепторов мифепристона, известного так же как RU-38486 или RU-486 [2].

Цель работы — исследование влияния мифепристона при остром стрессе на апоптоз тимоцитов мышей.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования выполнены на самцах белых неинбредных мышей в воз-

расте 24-30 недель. Всех животных содержали в условиях вивария на стандартной диете (со свободным доступом к пище и воде) и стандартном освещении (12 ч света и 12 ч темноты). Все исследования одобрены на соответствие нормам биомедицинской этики этическим комитетом при «ИЭГМ УрО РАН», протокол № 3 от 30.11.2015 г.

Антагонист глюкокортикоидных и прогестероновых рецепторов мифепристон (Mifepristone, Sigma-Aldrich, M8046, син.: 11 β -(4-Dimethylamino)-phenyl-17 β -hydroxy-17-(1-propynyl)-estra-4,9-dien-3-one, RU-38486, RU-486) вводили однократно подкожно за 30 мин до начала иммобилизации в дозе 50 мг/кг массы тела в растворе, приготовленном на стерильном официальном оливковом масле. Контрольным мышам и животным группы сравнения вводили однократно подкожно эквивалентное количество растворителя препарата. Выбор дозы и способа введения мифепристона основывался на ранее проведенных исследованиях [2]. Для экспериментального моделирования острого стресса использовали классическую модель 24-часового иммобилизационного стресса в положении на спине в пластиковом рестрейнере (комбинация эмоционального стресса и чрезмерного физического напряжения) [5, 6].

Для оценки апоптоза тимоцитов методом проточной лазерной цитометрии использовали набор реактивов BD PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™). Суспензию клеток тимуса мышей получали общепринятым методом гомогенизации в пробирках Эппендорф в 1,0 мл полной питательной среды с помощью стерильного полипропиленового пестика (Tissue Grinder, Axygen®). После подсчета исходного числа ядродержащих клеток (ЯСК) их отмывали центрифугированием и доводили их концентрацию до 1×10^6 ЯСК на 1,0 мл однократного связывающего буфера BD. В связи с тем, что набор реактивов BD содержал те же реагенты, что и набор Guava Nexin® Reagent производителя использованного нами проточного лазерного цитометра Guava EasyCyte корпорации Millipore, мы модифицировали инструкцию к набору и дальнейший анализ проводили в соответствии с рекомендациями изготовителя проточного цитометра, что позволило сэкономить реактивы. В опытных пробах смешивали 20 мкл клеток (концентрация 2×10^4 /лунку или 1×10^6 /1,0 мл), приготовленных на однократном связывающем буфере BD с 2 мкл смеси рабочих концентраций аннексина V-PE (PE Annexin V) и 7-аминоактиномицина D (7-AAD), инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре, добавляли 180 мкл однократного связывающего буфера BD

в каждую лунку, перемешивали и сразу же анализировали результаты на цитометре. Использовали следующие контроли: 1) неокрашенные клетки на реагентах BD (вместо аннексина V-PE и 7-AAD добавляли такой же объем однократного связывающего буфера BD; контроль аутофлуоресценции, использующийся в качестве негативной пробы для настройки цитометра); 2) клетки, окрашенные только аннексином V-PE (вместо 7-AAD вносили однократный связывающий буфер BD); 3) клетки, окрашенные только 7-AAD (вместо аннексина V-PE вносили однократный связывающий буфер BD). В качестве позитивного контроля в нескольких отдельных экспериментах анализировали показатели тех же клеточных суспензий после естественной гибели клеток при их инкубации в течение 2-3 сут. в полной питательной среде при 40 °С. Анализ проводили в модуле Guava Nexin Assay программного обеспечения Millipore CytoSoft 5.3 для проточного цитометра Guava EasyCyte (Millipore) по инструкции производителя, получая следующие показатели для каждой клеточной суспензии: 1) процент аннексин V-негативных и 7-AAD-позитивных клеток (Annexin V-negative, 7-AAD-positive; upper left; ядерный дебрис); 2) процент аннексин V-позитивных и 7-AAD-позитивных клеток (Annexin V-positive, 7-AAD-positive; upper right; клетки, находящиеся в состоянии позднего апоптоза и некроза); 3) процент аннексин V-негативных и 7-AAD-негативных клеток (Annexin V-negative, 7-AAD-negative; lower left; живые клетки без признаков апоптоза и некроза); 4) процент аннексин V-позитивных и 7-AAD-негативных клеток (Annexin V-positive, 7-AAD-negative; lower right; клетки, находящиеся в состоянии раннего апоптоза); 5) общий процент аннексин V-позитивных клеток (Annexin V-positive); 6) общий процент 7-AAD-позитивных клеток (7-AAD-positive), а также показатели средней интенсивности флуоресценции (the mean fluorescence intensity, MFI) для каждого из вышеперечисленных параметров в каналах PM1 (Annexin V PE) и PM2 (7-AAD).

Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и апостериорного критерия Дункана (post-hoc Duncan's test) для множественного сравнения между группами. Результаты представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение

Установлено, что острый стресс, вызванный 24-часовой иммобилизацией мышей, приводит

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ МИФЕПРИСТОНА ПРИ ОСТРОМ СТРЕССЕ НА АПОПТОЗ ТИМОЦИТОВ МЫШЕЙ

TABLE 1. EFFECT OF MIFEPRISTONE UNDER ACUTE STRESS ON APOPTOSIS OF MURINE THYMOCYTES

Показатели Parameters	Номер группы и экспериментальное воздействие Number of group and experimental exposure		
	1. Контрольные мыши 1. Control mice (n = 11)	2. Острый стресс 2. Acute stress (n = 14)	3. Острый стресс и мифепристон 3. Acute stress and mifepristone (n = 14)
Ядерный дебрис, Аннексин V(-), 7-AAD (+), % Nuclear debris, Annexin V(-), 7-AAD (+), %	1,327±0,352	4,250±1,119*	2,957±0,746
Клетки в позднем апоптозе, Аннексин V(+), 7-AAD(+), % Late apoptotic cells, Annexin V(+), 7-AAD(+), %	13,864±2,369	19,671±2,605	17,529±2,566
Неповрежденные клетки, Аннексин V(-), 7-AAD(-), % Live, healthy cells, Annexin V(-), 7-AAD(-), %	76,509±2,827	69,543±3,311	71,079±4,016
Клетки в раннем апоптозе, Аннексин V(+), 7-AAD(-), % Early apoptotic cells, Annexin V(+), 7-AAD(-), %	8,300±0,942	6,564±0,821	8,486±1,684
Аннексин V(+) клетки, % Annexin V(+) cells, %	22,191±2,617	26,229±3,211	26,000±3,988
7-AAD(+) cells, %	15,200±2,641	23,936±2,798*	20,443±2,683

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе по критерию Дункана для множественного сравнения между группами; различия между второй и третьей группами статистически не значимы.

Note. *, $p < 0.05$ in relation to the control group according to post-hoc Duncan's test for multiple comparison between groups; differences between the second and third groups are not statistically significant.

к увеличению в тимусе общего относительного числа 7-AAD-позитивных клеток, а также доли клеток, окрашивающиеся 7-AAD, но не аннексином V-PE (ядерный дебрис, аннексин V(-), 7-AAD (+)) (табл. 1). Процент клеток, находящихся в состоянии раннего апоптоза (т. е. аннексин V-PE-позитивных и 7-AAD-негативных), так же как и общее относительное число клеток, несущих фосфатидилсерин (аннексин V-PE-позитивные клетки), в тимусе стрессированных мышей не отличаются от контроля. Введение мифепристона нивелирует вызванное острым стрессом изменения и соответствующие показатели статистически значимо не отличаются от контроля (см. табл. 1), что подтверждает участие глюкокортикоидов в увеличении числа тимоцитов в состоянии некроза.

Обсуждая полученные результаты, важно отметить, что в условиях 24-часовой иммобилиза-

ции нами не выявлено повышения числа клеток, находящихся в состоянии раннего апоптоза. Напротив, через 24 ч от начала стрессорного воздействия отмечается статистически значимое повышение числа тимоцитов с поврежденными мембранами, через которые легко проникает 7-ADD. Введение антагониста глюкокортикоидных и прогестероновых рецепторов самцам мышей за 30 мин от начала иммобилизации частично отменяет выявленные изменения, что подтверждает участие глюкокортикоидов при стрессе в увеличении числа тимоцитов в состоянии некроза. Возможно, что увеличение числа тимоцитов, экспрессирующих фосфатидилсерин, при иммобилизационном стрессе развивается в более ранние сроки, что требует дополнительных исследований. Подтверждением этому является недавно опубликованная работа [7], в

которой для выявления раннего апоптоза тимоцитов через 3 ч после введения гидрокортизона использовали метиловый эфир тетраметилпродамина.

Заключение

Таким образом, острый стресс, вызванный 24-часовой иммобилизацией мышей, приводит

к увеличению в тимусе общего относительного числа 7-AAD-позитивных клеток, а также доли клеток, окрашивающиеся 7-AAD, но не аннексином V-PE (ядерный дебрис, аннексин V(-), 7-AAD (+)). Введение мифепристона нивелирует эти изменения, что подтверждает участие глюкокортикоидов в увеличении числа тимоцитов в состоянии некроза.

Список литературы / References

1. Старская И.С., Полевщиков А.В. Морфологические аспекты атрофии тимуса при стрессе // Иммунология, 2013. Т. 34, № 5. С. 271-277. [Starskaya I.S., Polevshchikov A.V. Morphological aspects of atrophy of the thymus under stress. *Immunology = Immunologiya*, 2013, Vol. 34, no. 5, pp. 271-277. (In Russ.)]
2. Alexander J.K., DeVries A.C., Kigerl K.A., Dahlman J.M., Popovich P.G. Stress exacerbates neuropathic pain via glucocorticoid and NMDA receptor activation. *Brain Behav. Immun.*, 2009, Vol. 23, no. 6, pp. 851-860.
3. Claman H.N., Moorhead J.W., Benner W.H. Corticosteroids and lymphoid cells in vitro. I. Hydrocortisone lysis of human, guinea pig, and mouse thymus cells. *J. Lab. Clin. Med.*, 1971, Vol. 78, no. 4, pp. 499-507.
4. Muscari I., Adorisio S., Liberati A.M., Thuy T.T., Van Sung T., Cannarile L., Ayroldi E., Riccardi C., Delfino D.V. Bcl-xL overexpression decreases GILZ levels and inhibits glucocorticoid-induced activation of caspase-8 and caspase-3 in mouse thymocytes. *J. Transl. Autoimmun.*, 2020, Vol. 3, 100035. doi: 10.1016/j.jtauto.2020.100035.
5. Paré W.P., Glavin G.B. Restraint stress in biomedical research: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1986, Vol. 10, no. 3, pp. 339-370.
6. Selye H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1936, Vol. 17, no. 3, pp. 234-248.
7. Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Balcan E., Polevshchikov A.V. The experience in lectins application to assess changes in the carbohydrate composition of murine thymocytes glycocalyx in the early and late apoptotic stages. *Cell Tissue Biol.*, 2020, Vol. 14, no. 6, pp. 427-436.

Авторы:

Шилов Ю.И. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Шилов С.Ю. — к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН; доцент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Authors:

Shilov Yu.I., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Immunology, E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Shilov S. Yu., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Normal Physiology, E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Барков С.Ю. — очный аспирант лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Пермь, Россия

Шилова Н.А. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Barkov S. Yu., Postgraduate Student, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Shilova N.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Поступила 15.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 15.05.2022
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

Арискина О.Б.	251	Михайлов А.О.	267	Семикина Е.Л.	283
<u>Бажан С.И.</u>	321	Никушкина К.В.	291	Симбирцев А.С.	295
Барков С.Ю.	345	Нохрин С.П.	251	Ситдикова Т.А.	267
Беляева С.В.	327	Осиков М.В.	259	Сорока В.В.	251
Бойко М.С.	259	Осипова И.В.	251	Старостина Е.В.	321
Боргоякова М.Б.	321	Панфилова Т.В.	305	Сташкевич Д.С.	327
Бочкова М.С.	245	Петричук С.В.	283	Сынчикова А.П.	333
Гончарова О.В.	251	Пивоварова Л.П.	251	Тимганова В.П.	245
Гриценко В.А.	339	Пименова Ю.С.	305	Токарева А.А.	305
Долгополов М.С.	275	Плехова Н.Г.	267	Турянская А.И.	275
Дубий А.А.	267	Полторац А.Е.	291	Файзуллина А.И.	339
Евдокимов А.В.	327	Поцхор-оглы С.Л.	251	Федосов А.А.	259
Зотова М.А.	291	Просекова Е.В.	267, 275	Фисенко А.П.	283
Ильичев А.А.	321	Раджабов И.М.	251	Фомин К.Н.	251
Кайгородцева Н.В.	259	Радыгина Т.В.	283	Фомина Л.О.	339
Карпенко Л.И.	321	Раев М.Б.	245	Фролов Б.А.	305
Количенко Л.В.	251	Рудометов А.П.	321	Храмцова Ю.С.	299
Корнева Е.А.	333	Рябова Л.В.	313	Шарабрин С.В.	321
Купцова Д.Г.	283	Сабыныч В.А.	275	Шехтман А.Г.	305
Лазарев С.С.	245	Савочкина А.Ю.	291	Шилов С.Ю.	345
Литвинова В.Р.	321	Савчук К.С.	295	Шилов Ю.И.	345
Магамедов И.Д.	251	Садек А.	299	Шилова Н.А.	345
Маркелова Е.В.	251	Сарычева Ю.А.	305	Юшков Б.Г.	299
Митрофанов Р.А.	305	Сафронова Э.А.	313		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аллергическая бронхиальная астма	276	молекулы адгезии	252	старение	299
антигены	339	мРНК-вакцина	321	стентирование коронарных артерий	313
антигены SARS-CoV-2	267	мультиплексный анализ	339	стресс	299, 345
антимутагенная активность	305	мыши	345	тимоциты	345
апоптоз	345	нейтрофилы	259, 339	тромбоциты	252
вакцинация	267	неравновесное сцепление	328	тучные клетки	299
взаимосвязи	291	неспецифический язвенный колит	328	универсальная вакцина	321
вирус гриппа	321	облучение	305	цитокиноподобные вещества	339
воспаление	299	однонуклеотидные полиморфизмы	328	цитокины	276, 291, 295, 339
врожденный иммунитет	291	озон	259	экспериментальный колит	259
гаплогруппы	328	оксид графена	245	5-аминосалициловая кислота	259
генотипы	276	орексин А	333	CD39	284
гены	339	острая ишемия конечностей	252	CD4 ⁺ лимфоциты	284
гибридома ВАРЗ	245	острый коронарный синдром	313	CD73	284
дегрануляция	299	пегилированные наночастицы оксида графена	245	COVID-19	267
дексаметазон	252	пептидил-аргинин-деиминаза 4 ..	291	IL-17	259
дети	276, 284	поглощение	245	RU-38486	345
ДНК-вакцина	321	полиморфизм генов	276	RU-486	345
жизнеспособность	245	популяции лимфоцитов	284	<i>S. aureus</i>	339
иммунорегуляторный индекс	313	предикторы	276	SARS-CoV-2	295
искусственный белок-иммуноген ..	321	прокальцитонин	291	<i>spA</i>	339
клетки микроглии	333	проточная цитометрия	313	Tact	284
коронарография	313	ремоделирование тканей	299	T-клеточный ответ	321
корреляция	295	сахарный диабет 2-го типа	295	T-лимфоциты	267
лимфоциты	252, 313	сепсис	291	Th17	284
ЛПС	333	синдром раздраженного кишечника	328	TLR2	328
миелокариоциты	305			TLR6	328
милиацин	305			Treg	284
мифепристон	345				
модификация поверхности наночастиц	245				