

Том 25, № 4. С. 355-580

2022

Официальный журнал
Российского Научного Общества Иммунологов

**РОССИЙСКИЙ
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ**



**RUSSIAN JOURNAL
OF IMMUNOLOGY**

Official Journal
of Russian Society of Immunology

Volume 25
Number 4

2022

РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИММУНОЛОГОВ
(РНОИ)

РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

октябрь-декабрь

2022, том 25

№. 4

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, Энн 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 биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ответственные секретари:

Ризопулу А.П., д.б.н. (Москва)

Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)

E-mail: rusimmun@gmail.com

Редактор перевода:

Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)

Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

Редакция журнала «Российский иммунологический журнал»

197101, Санкт-Петербург, а/я 130

Электронная версия: www.rusimmun.ru

© Российский иммунологический журнал

Журнал зарегистрирован Министерстве РФ по делам печати, телерадио-вещания 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 09.09.2022 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 28,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.)

Отпечатано в типографии ООО «Лесник»

197183, Санкт-Петербург, ул. Сабировская, 37.

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

Шварц Герберт – Школа медицины Йонг Лу Лин Национального университета Сингапура

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

«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**

October-December

2022, volume 25

No. 4

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. Nevinisky – 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 09.09.2022. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing. Printed sheets 28.25. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «Lesnik»

197183, Russian Federation, St. Petersburg, 37 Sabirovskaya str.

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

- Абрамовских О.С., Логинова Ю.В.
СОСТОЯНИЕ ЛОКАЛЬНОГО ИММУННОГО СТАТУСА У ЖЕНЩИН С НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ..... 363
- Актанова А.А., Коваленко Е.А., Пашкина Е.А.
ВЛИЯНИЕ КУКУРБИТУРИЛОВ НА ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ 369
- Атажахова М.Г., Чудилова Г.А., Нестерова И.В.
ИНФОРМАТИВНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИНТЕГРАЦИОННОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОКАЗАТЕЛЯ В ПРОГНОЗЕ ИСХОДОВ COVID-19 И ПРЕДИКЦИИ РАЗВИТИЯ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА..... 375
- Барило А.А., Смирнова С.В., Фейзер А.А.
ОСОБЕННОСТИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ АЛЛЕРГИИ У ДЕТЕЙ НА ФОНЕ ИНФЕКЦИИ *HELICOBACTER PYLORI* 379
- Барковская М.Ш., Севастьянов П.В., Демина Д.В., Козлов В.А.
СОДЕРЖАНИЕ PD-1⁺ и PD-L1⁺ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЛИЦ С ПЫЛЬЦЕВОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИЕЙ ДО И ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ 385
- Боева О.С., Бершвили М.Т., Сизиков А.Э., Пашкина Е.А.
ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВРОЖДЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ 393
- Бурмистрова А.Л., Алексеева А.С., Казо М.Е., Филиппова Ю.Ю.
ЛЕЙКОЦИТАРНАЯ СИГНАТУРА микроРНК В КОНТЕКСТЕ ХРОНИЧЕСКОГО СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ СОСУДИСТОЙ ДЕМЕНЦИИ 399
- Быстрицкая Е.П., Мурашкин Н.Н., Материкин А.И., Наумова Е.А., Яковлева И.В., Вартанова Н.О., Светич О.А.
ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *NBD1* И *LL37* ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ 405
- Вульф М.А., Сафиуллина Л.А., Газатова Н.Д., Кузнецов Г.Л., Комар А.А., Кириенкова Е.В., Литвинова Л.С.
ПОВЫШЕНИЕ НЕЙРЕГУЛИНА-4 В КРОВИ СВЯЗАНО С СД 2-го ТИПА И ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ У БОЛЬНЫХ ОЖИРЕНИЕМ 411
- Гончаров А.Г., Егоренкова О.А., Шуплецова В.В.
ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ У ЖИТЕЛЕЙ КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ К АКТУАЛЬНЫМ АНТИГЕННЫМ ВАРИАНТАМ ВИРУСОВ ГРИППА В ПЕРИОД 2018-2021 гг. 419
- Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Гойман Е.В., Вольский Н.Н., Козлов В.А.
ДИНАМИКА УРОВНЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ *IN VIVO* 423
- Добрынина М.А., Зурочка А.В., Комелькова М.В., Ло Ш., Зурочка В.А., Ху Д., Рябова Л.В., Сарapultцев А.П.
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ CD45⁺ И CD46⁺ НА СУБПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ..... 431
- Кныш С.В., Скляр Л.Ф., Черкасова Ю.С., Черникова А.А., Кныш А.А., Невежжина Т.А., Чагина Е.А.
ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМОСВЯЗИ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА И РЕЗУЛЬТАТОВ ОЦЕНКИ НЕЙРОКОГНИТИВНОЙ ФУНКЦИИ У ЛЮДЕЙ, ЖИВУЩИХ С ВИЧ: ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 437
- Ковалева С.В., Пиктурно С.Н., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Крутова В.А., Малиновская В.В., Нестерова И.В.
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ *IN VITRO* ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ФЕНОТИПА СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКОЙ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА..... 445
- Курбатова О.В., Купцова Д.Г., Безрукавникова Л.М., Радыгина Т.В., Мовисян Г.Б., Анушенко А.О., Комарова А.Д., Потапов А.С., Петричук С.В., Фисенко А.П.
ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА У ДЕТЕЙ С БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЬСОНА–КОНОВАЛОВА ПРИ РАЗНЫХ СТАДИЯХ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ..... 453
- Москалец О.В.
СЛОЖНЫЙ ПУТЬ К ДИАГНОЗУ «ОБЩАЯ ВАРИАБЕЛЬНАЯ ИММУННАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ» (КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ)..... 461
- Нестерова И.В., Чапурина В.Н., Чудилова Г.А., Тараканов В.А.
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ *IN VITRO* ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ФЕНОТИПА 2 СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ ДЕСТРУКТИВНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕКСАПЕПТИДА..... 465

Норка А.О., Воробьев С.В., Кузнецова Р.Н., Серебрякова М.К., Кудряцев И.В., Коваленко С.Н., Монашенко Д.Н., Коробова З.Р. ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С УШИБОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЛЕГКОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ	471
Пашина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Гриценко В.А. ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ – ПЕПТИДА ZP2 – НА АНТИЦИТОКИНОВУЮ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА <i>ENTEROCOCCUS</i> И ИХ СПОСОБНОСТЬ К ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ	477
Пашков Е.А., Пак А.В., Абрамова Н.Д., Яковлева И.В., Вартанова Н.О., Богданова Е.А., Пашков Е.П., Светич О.А., Зверев В.В. ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА IL-1β ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОМПЛЕКСОВ МИРНК, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОГРИППНЫМ ДЕЙСТВИЕМ	485
Петричук С.В., Радыгина Т.В., Купцова Д.Г., Курбатова О.В., Семикина Е.Л., Мурашкин Н.Н., Потапов А.С., Фисенко А.П. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИ-TNF ТЕРАПИИ У ДЕТЕЙ С ИММУНОЗАВИСИМЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПО АКТИВНОСТИ NF-κB В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ	491
Пономарева Н.Ю., Кошелев Р.В., Лазарев В.В., Кочетков А.В. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПАЦИЕНТА С СИНДРОМОМ ГИЙЕНА–БАРРЕ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО COVID-19	499
Радаева О.А., Симбирцев А.С., Костина Ю.А., Негоднова Е.В., Бесшейнов Д.Д., Машнина С.В., Еремеев В.В. ДИНАМИКИ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ СЕМЕЙСТВА IL-6, АДИПОНЕКТИНА И ЛЕПТИНА В ПОСТКОВИДНОМ ПЕРИОДЕ У ПАЦИЕНТОВ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ	505
Ручкин М.П., Маркелова Е.В., Федяшев Г.А., Ющук В.Н. РОЛЬ ЦИТОКИНОВ, НЕЙРОПЕПТИДОВ И МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ	515
Сенникова С.В., Топтыгина А.П. ИЗМЕНЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА МОНОНУКЛЕАРОВ КАПИЛЛЯРНОЙ И ВЕНОЗНОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЛЕЧЕНИЯ	521
Сизякина Л.П., Андреева И.И., Харитонова М.В. ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА К SARS-CoV-2 У ПАЦИЕНТА С ОБЩЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ	529
Сумеркина В.А., Телешева Л.Ф., Головнева Е.С. АССОЦИАЦИЯ ИЗМЕНЕНИЙ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ И КОМПОНЕНТОВ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ПАЦИЕНТОВ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА	535
Фомина О.И., Чагина Е.А., Федянина Л.Н., Красников В.Е. ОСОБЕННОСТИ РЕАГИРОВАНИЯ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И ОСТРЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ ПОЧЕК ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА МЕТОДОМ АОРТОКОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ИСКУССТВЕННОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ	541
Хасанова А.А., Костинов М.П., Соловьева И.Л. МУКОЗАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ В ПЕРИОДЕ РЕАБИЛИТАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ	549
Черемохин Д.А., Тузанкина И.А., Черешнев В.А., Болков М.А., Шинвари Х. РОЛЬ ВРОЖДЕННЫХ ОШИБОК ИММУНИТЕТА В ГРУППЕ ДЕТЕЙ С ЛЕТАЛЬНЫМИ ИСХОДАМИ НА ПЕРВОМ ГОДУ ЖИЗНИ	555
Черникова М.А., Маркелова Е.В., Невежжина Т.А., Матюшкина Л.С., Тулупова М.С., Кныш С.В., Шевченко К.Г. ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ У ПАЦИЕНТОК С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ В ПЕРИОД ПРЕГРАВИДАРНОЙ ПОДГОТОВКИ	561
Чудилова Г.А., Тетерин Ю.В., Чапурина В.Н., Чичерев Е.А., Тараканов В.А., Нестерова И.В. МОДУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ГЕКСАПЕПТИДА НА ИЗМЕНЕННЫЙ ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ И CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ В СИСТЕМЕ <i>IN VITRO</i>	571
Правила для авторов	577
Авторский указатель	580
Предметный указатель	580

CONTENTS

Short communications

<i>Abramovskikh O.S., Loginova Yu.V.</i> LOCAL IMMUNE STATE IN THE WOMEN WITH MISCARRIAGE	363
<i>Aktanova A.A., Kovalenko E.A., Pashkina E.A.</i> EFFECT OF CUCURBITURILS ON CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF HEALTHY DONORS	369
<i>Atzhakhova M.G., Chudilova G.A., Nesterova I.V.</i> PROGNOSIS OF COVID-19 OUTCOMES AND RISK PREDICTION FOR THE DEVELOPMENT OF POST-COVID SYNDROME	375
<i>Barilo A.A., Smirnova S.V., Feizer A.A.</i> GASTROINTESTINAL MANIFESTATIONS OF ALLERGY IN THE PRESENCE OF <i>HELICOBACTER PYLORI</i> INFECTION	379
<i>Barkovskaya M.Sh., Sevastyanov P.V., Demina D.V., Kozlov V.A.</i> CONTENT OF PD-1⁺ AND PD-L1⁺ PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN INDIVIDUALS WITH POLLEN SENSITIZATION BEFORE AND AFTER ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY	385
<i>Boeva O.S., Berishvili M.T., Sizikov A.E., Pashkina E.A.</i> PHENOTYPIC FEATURES OF INNATE LYMPHOID CELLS IN RHEUMATOID ARTHRITIS	393
<i>Burmistrova A.L., Alekseeva A.S., Cazaux M.E., Filippova Yu.Yu.</i> MicroRNA SIGNATURE OF LEUKOCYTES IN THE CONTEXT OF CHRONIC SYSTEMIC INFLAMMATION IN VASCULAR DEMENTIA	399
<i>Bystritskaya E.P., Murashkin N.N., Materikin A.I., Naumova E.A., Yakovleva I.V., Vartanova N.O., Svitich O.A.</i> HBD1 AND LL37 GENE EXPRESSION IN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS	405
<i>Vulf M.A., Safiullina L.A., Gazatova N.D., Kuznetsov G.L., Komar A.A., Kirienkova E.V., Litvinova L.S.</i> INCREASE OF BLOOD NEUREGULIN 4 IS ASSOCIATED WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND HYPERTENSION IN OBESE PATIENTS	411
<i>Goncharov A.G., Egorenkova O.A., Shupletsova V.V.</i> POPULATION IMMUNITY IN RESIDENTS OF THE KALININGRAD REGION TO CURRENT ANTIGENIC VARIANTS OF INFLUENZA VIRUSES OVER 2018-2021	419
<i>Demchenko E.N., Gavrilova E.D., Goiman E.V., Volskiy N.N., Kozlov V.A.</i> DYNAMICS OF CELL-FREE DNA LEVELS IN THE <i>IN VIVO</i> LPS-INDUCED INFLAMMATION MODEL	423
<i>Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Komelkova M.V., Luo S., Zurochka V.A., Hu D., Ryabova L.V., Sarapultsev A.P.</i> STUDIES OF CD45⁺ AND CD46⁺ EXPRESSION ON THE PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE SUBSETS OF THE POSTCOVID PATIENTS	431
<i>Knysh S.V., Sklyar L.F., Cherkasova Yu.S., Chernikova A.A., Knysh A.A., Nevezhkina T.A., Chagina E.A.</i> RELATIONSHIPS BETWEEN THE FACTORS OF INNATE IMMUNE SYSTEM AND RESULTS OF NEUROCOGNITIVE FUNCTION PARAMETERS IN THE PERSONS LIVING WITH HIV INFECTION: INTERIM RESULTS OF THE STUDY	437
<i>Kovaleva S.V., Pikturno S.N., Chudilova G.A., Lomtadize L.V., Krutova V.A., Malinovskaya V.V., Nesterova I.V.</i> EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i> REPROGRAMMING OF TRANSFORMED PHENOTYPE OF NEUTROPHIL GRANULOCYTE SUBPOPULATIONS IN WOMEN WITH CHRONIC RECURRENT INFECTIOUS AND INFLAMMATORY CONDITIONS OF GENITAL TRACT	445
<i>Kurbatova O.V., Kuptsova D.G., Bezrukavnikova L.M., Radygina T.V., Movsisyan G.B., Anushenko A.O., Komarova A.D., Potapov A.S., Petrichuk S.V., Fisenko A.P.</i> FEATURES OF IMMUNE STATUS IN CHILDREN WITH WILSON-KONOVALOV DISEASE AT DIFFERENT STAGES OF LIVER FIBROSIS	453
<i>Moskalets O.V.</i> COMPLICATED WAYS OF DIAGNOSING COMMON VARIABLE IMMUNE DEFICIENCY (CASE REPORT)	461
<i>Nesterova I.V., Chapurina V.N., Chudilova G.A., Tarakanov V.A.</i> EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i> PHENOTYPE REPROGRAMMING OF TWO SUBSETS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN CHILDREN WITH ACUTE DESTRUCTIVE PNEUMONIA BY MEANS OF A SYNTHETIC HEXAPEPTIDE	465

<i>Norka A.O., Vorobyev S.V., Kuznetsova R.N., Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Kovalenko S.N., Monashenko D.N., Korobova Z.R.</i> FEATURES OF HUMORAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH MILD TRAUMATIC BRAIN INJURY	471
<i>Pashnina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M., Gritsenko V.A.</i> INFLUENCE OF ZP2 PEPTIDE, A SYNTHETIC ANALOGUE OF THE GM-GSF ACTIVE CENTER ON THE ANTICYTOKINE ACTIVITY OF BACTERIA FROM ENTEROCOCCUS GENUS AND THEIR ABILITY TO PRODUCE CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES.....	477
<i>Pashkov E.A., Pak A.V., Abramova N.D., Yakovleva I.V., Vartanova N.O., Bogdanova E.A., Pashkov E.P., Svitich O.A., Zverev V.V.</i> STUDYING EXPRESSION OF IL-1β GENE UNDER THE ACTION OF siRNA COMPLEXES WITH ANTI-INFLUENZA EFFECT	485
<i>Petrichuk S.V., Radygina T.V., Kuptsova D.G., Kurbatova O.V., Semikina E.L., Murashkin N.N., Potapov A.S., Fisenko A.P.</i> EVALUATION OF ANTI-TNF TREATMENT EFFICIENCY IN CHILDREN WITH IMMUNE-DEPENDENT DISEASES BY MEANS OF TESTING THE NF-κB ACTIVITY IN LYMPHOCYTE POPULATIONS	491
<i>Ponomareva N.Yu., Koshelev R.V., Lazarev V.V., Kochetkov A.V.</i> CLINICAL GENETIC COUNSELLING AND REHABILITATION TREATMENT OF A PATIENT WITH GUILLAIN-BARRÉ SYNDROME AFTER COVID-19	499
<i>Radaeva O.A., Simbirtsev A.S., Kostina Yu.A., Negodnova E.V., Besheyrov D.D., Mashnina S.V., Ereemeev V.V.</i> CYTOKINES OF THE IL-6 FAMILY, ADIPONECTIN AND LEPTIN LEVELS IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME DURING THE POST-COVID PERIOD	505
<i>Ruchkin M.P., Markelova E.V., Fedyashev G.A., Yushchuk V.N.</i> ROLE OF CYTOKINES, NEUROPEPTIDS AND MATRIX METALLOPROTEINASES IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF RETINAL NEURODEGENERATION IN DIABETIC RETINOPATHY.....	515
<i>Sennikova S.V., Toptygina A.P.</i> CHANGES IN MONONUCLEAR CELL SUBSETS IN CAPILLARY AND VENOUS BLOOD OF PATIENTS WITH PSORIASIS DEPENDING ON THE TREATMENT.....	521
<i>Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Kharitonova M.V.</i> DYNAMICS OF IMMUNE SYSTEM PARAMETERS IN DEVELOPMENT OF SARS-CoV-2-SPECIFIC IMMUNITY IN A PATIENT WITH COMMON VARIABLE IMMUNE DEFICIENCY	529
<i>Sumerkina V.A., Telesheva L.F., Golovneva E.S.</i> ASSOCIATION OF THE CYTOKINE PROFILE AND METABOLIC SYNDROME COMPONENTS IN YOUNG PATIENTS	535
<i>Fomina O.I., Chagina E.A., Fedyanina L.N., Krasnikov V.E.</i> INNATE IMMUNE RESPONSE IN THE PATIENTS WITH HEART DISEASE AND ACUTE KIDNEY INJURY AFTER CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING, DEPENDING ON THE DURATION OF EXTRACORPOREAL CIRCULATION.....	541
<i>Khasanova A.A., Kostinov M.P., Soloveva I.L.</i> MUCOSAL IMMUNITY DURING REHABILITATION IN THE PATIENTS AFTER CORONAVIRUS INFECTION	549
<i>Cheremokhin D.A., Tuzankina I.A., Chereshnev V.A., Bolkov M.A., Shinvary K.</i> ROLE OF INNATE ERRORS OF IMMUNITY IN THE GROUP OF CHILDREN WITH FATAL OUTCOMES DURING THE FIRST YEAR OF LIFE	555
<i>Chernikova M.A., Markelova E.V., Nevezhkina T.A., Matyshkina L.S., Tulupova M.S., Knysh S.V., Shevchenko K.G.</i> CHANGES OF BLOOD SERUM CYTOKINE PROFILE IN THE PATIENTS WITH PAPILLOMAVIRUS INFECTION BEFORE AND AFTER THERAPEUTIC PREGRAVID PREPARATION.....	561
<i>Chudilova G.A., Teterin Yu.V., Chapurina V.N., Chicherev E.A., Tarakanov V.A., Nesterova I.V.</i> MODULATING EFFECTS OF HEXAPEPTIDE ON THE ALTERED PHENOTYPE OF NEUTROPHIL GRANULOCYTE CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ AND CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺ SUBSETS IN CHILDREN WITH ACUTE OSTEOMYELITIS IN THE IN VITRO SYSTEM	571
Instructions to Authors.....	577
Author index.....	580
Subject index.....	580

СОСТОЯНИЕ ЛОКАЛЬНОГО ИММУННОГО СТАТУСА У ЖЕНЩИН С НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Абрамовских О.С., Логинова Ю.В.

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

Резюме. Функциональное состояние иммунитета обеспечивает поддержание иммунологической толерантности в отношении аллогенного плода и высокого уровня местной защиты от антигенной стимуляции. Повышенная функциональная активность фагоцитирующих клеток на системном и локальном уровнях может быть причиной нарушения процессов формирования полноценного фетоплацентарного комплекса, что может приводить к прерыванию беременности. Цель исследования — оценить состояние локального иммунного статуса у женщин с невынашиванием беременности.

В исследовании приняли участие 174 женщины репродуктивного возраста. Первую группу составили 65 пациенток (37,4%) с диагнозом «невынашивание беременности», имеющих в анамнезе до 2 прерываний беременности в сроки от зачатия до 20 недели гестации, вторую группу — 37 пациенток (21,2%) с диагнозом «привычное невынашивание беременности», имеющих в анамнезе 3 и более прерывания беременности. В группу контроля были включены 72 условно здоровые женщины (41,4%), имеющие 2 и более реализованные беременности в паре с одним и тем же партнером, без отягощенного акушерско-гинекологического анамнеза. Средний возраст составил 36 ± 6 лет. В I фазу менструального цикла в цервикальной слизи обследуемых определяли общее количество лейкоцитов, их жизнеспособность, показатели функциональной активности нейтрофилов, функциональный резерв и индекс стимуляции нейтрофилов.

В I фазу менструального цикла у женщин с невынашиванием беременности и женщин с привычным невынашиванием беременности активность фагоцитоза нейтрофилов цервикальной слизи была статистически значимо выше по сравнению с группой условно здоровых женщин. Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов цервикальной слизи в группе женщин с привычным невынашиванием беременности чаще достигала более высоких значений в сравнении с группой контроля. Оценка функционального резерва нейтрофилов цервикальной слизи обследуемых с привычным невынашиванием беременности и невынашиванием беременности показала тенденцию к статистически значимым различиям: данный показатель в исследуемых группах был выше, чем в группе контроля. Анализ способности нейтрофилов цервикальной слизи к продукции активных форм кислорода (как спонтанно, так и индуцировано) не продемонстрировал статистически значимых различий. Таким образом, в группах женщин с 2 и более прерываниями беременности наблюдалась аберрантная функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов в цервикальной слизи без изменений способности клеток к продукции активных форм кислорода. Возможно, это связано с превалированием кислород-независимых механизмов внутриклеточного киллинга и может свидетельствовать об участии нейтрофилов в нарушении формирования иммунологической толерантности на локальном уровне у женщин.

Ключевые слова: местный иммунитет, невынашивание беременности, врожденный иммунитет, нейтрофилы, фагоцитоз, функциональная активность нейтрофилов

Адрес для переписки:

Абрамовских Ольга Сергеевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (902) 868-62-23.
E-mail: abramoschel@mail.ru

Address for correspondence:

Abramovskikh Olga S.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (902) 868-62-23.
E-mail: abramoschel@mail.ru

Образец цитирования:

О.С. Абрамовских, Ю.В. Логинова «Состояние локального иммунного статуса у женщин с невынашиванием беременности» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 363-368.
doi: 10.46235/1028-7221-1200-LIS
© Абрамовских О.С., Логинова Ю.В., 2022

For citation:

O.S. Abramovskikh, Yu.V. Loginova "Local immune state in the women with miscarriage", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 363-368.
doi: 10.46235/1028-7221-1200-LIS
DOI: 10.46235/1028-7221-1200-LIS

LOCAL IMMUNE STATE IN THE WOMEN WITH MISCARRIAGE

Abramovskikh O.S., Loginova Yu.V.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Functional state of immunity provides maintenance of immunological tolerance for allogeneic fetus, and high level of local protection against antigenic stimulation. Increased functional activity of phagocytic cells at systemic and local levels may cause impairment of complete fetoplacental complex, thus leading to abortion. The purpose of our study was to assess the state of local immunity in women with pregnancy loss.

The study involved 174 women in their reproductive age. The first group consisted of 65 patients (37.4%) with a diagnosis of miscarriage, the history of < 2 abortions over the period from conception to the 20th week of gestation. The second group included 37 patients (21.2%) with documented recurrent pregnancy loss, with a history of > 3 miscarriages. The control group consisted of 72 conditionally healthy women (41.4%) who had 2 or more term pregnancies with the same partner, without a history of obstetric and gynecological complications. Their mean age was 36±6 years old. Total number and viability of leukocytes, the indices of functional neutrophil activity, their functional reserve and neutrophil stimulation index were determined in cervical mucosal samples over the first phase of the menstrual cycle.

In the first phase of menstrual cycle, the women with miscarriage and recurrent pregnancy loss exhibited a statistically significant increase of phagocytosis by the neutrophils from cervical mucus as compared to the group of conditionally healthy women. Intensity of neutrophil phagocytosis in cervical mucus reached higher values in the women with recurrent pregnancy loss more often, compared to the control group. Evaluation of the functional reserve of cervical mucus neutrophils in the subjects with recurrent pregnancy loss and miscarriage showed a trend towards statistically significant differences: this parameter was higher in the patients than in control group. The ability of cervical mucosal neutrophils to produce reactive oxygen species (both spontaneous and induced) did not show statistically significant differences between the patients and controls.

Hence, we have observed aberrant functional activity of neutrophilic granulocytes from cervical mucosa in the groups of women with 2 or more abortions, without changing ability of the cells to produce reactive oxygen species. This finding may be explained by prevalence of oxygen-independent mechanisms of intracellular killing, thus suggesting a role of neutrophils for impaired balance of immunological tolerance in pregnant women at the local level.

Keywords: local immunity, miscarriage, innate immunity, neutrophils, phagocytosis, functional activity of neutrophils

Введение

Успешная реализация репродуктивной функции является одним из основных показателей здоровья и качества жизни человека [5]. Репродуктивные потери на разных сроках гестации оказывают негативное влияние на демографические показатели. В Российской Федерации частота самопроизвольного прерывания беременности составляет 15-23% от всех зарегистрированных беременностей [4]. В большинстве случаев ранние репродуктивные потери не попадают в общую статистику. В 75% случаев беременности прерываются до имплантации или сразу после нее, из них только 15-20% потерь беременности проявляются клинически [1]. Распространенность невынашивания беременности (НВ) как мультифакторного заболевания варьирует от 10 до 25% от общего числа зарегистрированных беременностей [4]. Причины НВ многочисленны и включают генетические, иммунологические, эндокринные, инфекционные, метаболические, анатомические и другие факторы. Но в 50% случаев причины репродуктивных потерь остаются неизвестны [12].

Иммунная система женщины принимает непосредственное участие в процессах оплодотворения, имплантации и развития беременности [8]. С одной стороны, функциональное состояние иммунитета обеспечивает поддержание иммунологической толерантности в отношении аллогенного плода, с другой – поддержание высокого уровня местной защиты от антигенной стимуляции. Система врожденного иммунитета репродуктивного тракта включает в себя эпителиальный барьер, клеточные и гуморальные факторы. Повышенная активность фагоцитирующих клеток (микрофаги, макрофаги) на системном и локальном уровнях может быть причиной нарушения процессов формирования полноценного фетоплацентарного комплекса [3], что в итоге может приводить к прерыванию беременности. В связи с этим **цель нашего исследования** – оценить состояние локального иммунного статуса у женщин с невынашиванием беременности.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (г. Челябинск). Всего было обследовано

174 женщины репродуктивного возраста, которые сформировали три группы для дальнейшего исследования. Первую группу составили 65 пациенток (37,4%) с диагнозом «невынашивание беременности» (НБ), имеющих в анамнезе до 2 прерываний беременности в сроки от зачатия до 20-й недели гестации, вторую группу – 37 пациенток (21,2%) с диагнозом «привычное невынашивание беременности» (ПНБ), имеющих в анамнезе 3 и более прерывания беременности. Критерии включения для обеих групп исследования: репродуктивный возраст (средний возраст женщин в исследуемых группах – 30 ± 5 лет); 2 и более прерываний беременности в анамнезе в сроки от зачатия до 20-й недели гестации в паре с одним и тем же партнером; отсутствие явных этиологических факторов НБ; информированное согласие пациенток. Диагнозы «НБ» и «ПНБ» устанавливали врачи – акушеры-гинекологи на основании клинических, инструментальных и лабораторных методов исследования.

В группу контроля были включены 72 условно здоровые женщины (41,4%), имеющие 2 и более реализованные беременности в паре с одним и тем же партнером, без отягощенного акушерско-гинекологического анамнеза. Средний возраст составил 36 ± 6 лет. Критерии исключения для всех исследуемых групп: острые и хронические инфекционно-воспалительные заболевания; ВИЧ-инфекция, гепатиты; онкологические заболевания; наличие экстрагенитальной патологии в стадии декомпенсации; несовместимость матери и плода по системе АВ0 и Rh в анамнезе; нарушения кариотипа у женщин и их партнеров; анатомические аномалии репродуктивных органов; прием антибактериальных, противовирусных и иммунодепрессивных препаратов на протяжении последних 3 месяцев; ментальные расстройства и психические заболевания, затрудняющие продуктивный контакт; хронический алкоголизм, наркомания; отсутствие постоянного места жительства.

Для оценки состояния локального иммунного статуса у обследуемых осуществляли взятие секрета цервикального канала в I фазу менструального цикла, в котором определяли общее количество лейкоцитов и их жизнеспособность, показатели функциональной активности нейтрофилов (оценка поглотительной функции, способность к спонтанной и индуцированной продукции активных форм кислорода (АФК), лизосомальная активность), функциональный резерв и индекс стимуляции нейтрофилов [2].

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 2.8.8 (разработчик – ООО «Статтех», Россия). Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерия Колмогорова–Смирнова

(при числе исследуемых более 50). Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывались с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95%-ного доверительного интервала (95% ДИ). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение трех и более групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, выполнялось с помощью однофакторного дисперсионного анализа, апостериорные сравнения проводились с помощью критерия Тьюки (при условии равенства дисперсий). Сравнение трех и более групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью критерия Краскела–Уоллиса, апостериорные сравнения – с помощью критерия Данна с поправкой Холма.

Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, незначимыми – при $p > 0,10$, в промежуточных случаях ($0,05 < p \leq 0,10$) обсуждали тенденции к различиям.

Результаты и обсуждение

Нейтрофильные гранулоциты являются самой многочисленной субпопуляцией лейкоцитов периферической крови (до 70%). Благодаря своей принадлежности к клеточным факторам врожденного иммунитета, они обладают способностью к внутриклеточному (фагоцитоз) и внеклеточному киллингу (образование нейтрофильных внеклеточных ловушек). Реализация функционального потенциала обеспечивается способностью клеток к продукции цитокинов, АФК, протеолитических ферментов, продуктов метаболизма арахидоновой кислоты. Нейтрофилы принимают непосредственное участие в обеспечении локального иммунного гомеостаза репродуктивного тракта женщин, выступая в роли первой линии защиты при встрече с различными антигенами. Эти клетки способствуют благополучному течению всех стадий репродуктивного процесса от зачатия до родов, а также послеродовому восстановлению [11]. Нейтрофильные гранулоциты могут рекрутировать и/или взаимодействовать с Т-лимфоцитами, модулируя их функцию, что необходимо для становления иммунологического равновесия в системе мать–плацента–плод, которое происходит во время беременности.

В настоящем исследовании проведена оценка состояния местного иммунитета в цервикальном канале у женщин с ПНБ и НБ.

Характеристика показателей локального иммунного статуса приведена в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ В ЦЕРВИКАЛЬНОЙ СЛИЗИ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ И НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

TABLE 1. NUMBER AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN CERVICAL MUCUS IN WOMEN WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS AND MISCARRIAGE

Показатель Index	Женщины с ПНБ Women with recurrent pregnancy loss (n = 37)	Женщины с НБ Women with miscarriage (n = 65)	Условно здоровые женщины Conditionally healthy women (n = 72)	p
Общее содержание лейкоцитов, × 10 ⁹ /л Leukocytes, × 10 ⁹ /L	10 (5-18)	10 (3-25)	9 (5-25)	0,827
Жизнеспособность нейтрофилов, % Viability of neutrophils, %	47 (26-70)	50 (29-67)	43 (26-56)	0,244
Жизнеспособность нейтрофилов, × 10 ⁹ /л Viability of neutrophils, × 10 ⁹ /L	3 (1-11)	5 (1-14)	4 (1-12)	0,822
Активность фагоцитоза нейтрофилов, % Neutrophil phagocytosis activity, %	53±16 [48-59]	46±16 [42-50]	39±16 [35-43]	0,001* 0,047**
Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов, у. е. Intensity of phagocytosis of neutrophils, c. u.	1 (1-2)	1 (1-1)	1 (1-1)	0,002*
Фагоцитарное число, у. е. Phagocytic number, c. u.	2 (2-2)	2 (2-2)	2 (2-2)	0,477
Активность НСТ-теста нейтрофилов спонтанного, % Activity of the spontaneous neutrophil NBT-test, %	4 (0-14)	4 (0-12)	6 (1-21)	0,312
Интенсивность НСТ-теста нейтрофилов спонтанного, у. е. Intensity of the spontaneous neutrophil NBT-test, c. u.	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,345
Активность НСТ-теста нейтрофилов индуцированного, % Activity of the NBT-test of induced neutrophils, %	10 (4-24)	14 (4-24)	10 (6-27)	0,695
Интенсивность НСТ-теста нейтрофилов индуцированного, у. е. Intensity of the NBT-test of neutrophils induced, c. u.	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,650
Функциональный резерв нейтрофилов, % Functional reserve of neutrophils, %	6 (0-10)	6 (1-10)	2 (0-8)	0,084
Индекс стимуляции нейтрофилов, у. е. Neutrophil stimulation index, c. u.	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)	0,655

Примечание. * – достоверность различий показателей пациенток с ПНБ от показателей группы условно здоровых женщин; ** – достоверность различий показателей пациенток с НБ от показателей группы условно здоровых женщин.

Note. *, reliability of differences in the indicators of patients with RPL from those of a group of conditionally healthy women; **, reliability of differences in the indicators of patients with miscarriage from the indicators of a group of conditionally healthy women.

Статистически значимых различий по содержанию лейкоцитов в цервикальной слизи и их жизнеспособности в исследуемых группах не выявлено. Отмечено, что в I фазу менструального цикла у женщин с НБ и ПНБ активность фагоцитоза нейтрофилов цервикальной слизи статистически значимо выше по сравнению с группой условно здоровых женщин. Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов цервикальной слизи в группе женщин с ПНБ чаще достигала более высоких значений в сравнении с группой контроля. Оценка функционального резерва нейтрофилов цервикальной слизи обследуемых с ПНБ и НБ показала тенденцию к статистически значимым различиям: данный показатель в исследуемых группах был выше, чем в группе контроля. Анализ способности нейтрофилов цервикальной слизи к продукции АФК (как спонтанно, так и индуцировано) не продемонстрировал статистически значимых различий. Таким образом, в группах женщин с 2 и более прерываниями беременности наблюдалась aberrantная функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов в цервикальной слизи без изменений способности клеток к продукции АФК. Возможно, это связано с превалированием кислород-независимых механизмов внутриклеточного киллинга и может свидетельствовать об участии нейтрофилов в нарушении формирования иммунологической толерантности на локальном уровне у женщин. Известно, что для благоприятного наступления и течения беременности, формирования и поддер-

жания иммунологической толерантности в условиях повышенной антигенной нагрузки за счет наличия у плода антигенов отцовского происхождения необходимо ослабление функциональной активности нейтрофилов периферической крови беременных женщин [6, 7, 13], а следовательно, и репродуктивного тракта. Повышенная функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов была отмечена при осложнениях беременности (преэклампсия) [10], привычном невынашивании беременности [9], гестационном сахарном диабете [14].

Заключение

Таким образом, дальнейшие исследования механизмов, участвующих в регуляции функциональной активности нейтрофилов на разных этапах беременности, а также их взаимодействий с клетками материнского и эмбрионального происхождения, могут дать представление об участии нейтрофильных гранулоцитов в поддержании физиологического течения беременности.

Благодарности

Авторы выражают благодарность директору НИИ иммунологии, академику РАН, профессору, д.м.н. Долгушину И.И. и главному научному сотруднику НИИ иммунологии, д.м.н. Савочкиной А.Ю. за предоставленную возможность в реализации научных идей и исследовательских стремлений.

Список литературы / References

1. Антух Е.И., Смирнова И.В. Метод иммунизации лимфоцитами мужа в лечении привычного невынашивания // Охрана материнства и детства, 2011. № 1. С. 66-68. [Antukh E.I., Smirnova I.V. The method of immunization with husband's lymphocytes in the treatment of recurrent miscarriage. *Okhrana materinstva i detstva = Maternal and Child Health*, 2011, no. 1, pp. 66-68. (In Russ.)]
2. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: Издательство РАМН, 2009. 208 с. [Dolgushin I.I., Andreeva Yu.S., Savochkina A.Yu. Neutrophil traps and methods for assessing the functional status of neutrophils]. Moscow: Publishing House of the Russian Academy of Medical Sciences, 2009. 208 p.
3. Покаленьева М.Ш., Нестерова А.М., Соснова Е.А., Болевич С.Б., Проскурнина Е.В. Радикалпродуцирующая функция нейтрофилов при привычном невынашивании беременности: применение метода активированной хемилюминесценции с двойной стимуляцией // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии, 2017. Т. 16, № 5. С. 82-88. [Pokalenieva M.Sh., Nesterova A.M., Sosnova E.A., Bolevich S.B., Proskurnina E.V. Radical-producing function of neutrophils in recurrent miscarriage: application of the method of activated chemiluminescence with double stimulation. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii = Gynecology, Obstetrics and Perinatology*, 2017, Vol. 16, no. 5, pp. 82-88. (In Russ.)]
4. Сидельникова В.М. Невынашивание беременности – современный взгляд на проблему // Российский вестник акушера-гинеколога, 2007. Т. 7, № 2. С. 62-65. [Sidelnikova V.M. Miscarriage: the present view of the problem. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin of the Obstetrician-Gynecologist*, 2007, Vol. 7, no. 2, pp. 62-65. (In Russ.)]
5. Циркин В.И., Анисимов К.Ю., Полежаева Т.В., Зайцева О.О., Худяков А.Н., Соломина О.Н., Хлыбова С.В., Дмитриева С.Л., Попова В.С. Роль нейтрофилов при физиологическом течении беременности, родов и ряде акушерских осложнений // Вестник уральской медицинской академической науки, 2015. № 4. С. 75-86. [Tsirkin V.I., Anisimov K.Yu., Polezhaeva T.V., Zaitseva O.O., Khudyakov A.N., Solomina O.N., Khlybova S.V., Dmitrieva S.L., Popova V.S. The role of neutrophils in the physiological course of pregnancy, childbirth and

a number of obstetric complications. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2015, no. 4, pp. 75-86. (In Russ.)]

6. Bert S., Ward E.J., Nadkarni S. Neutrophils in pregnancy: New insights into innate and adaptive immune regulation. *Immunology*, 2021, Vol. 164, no. 4, pp. 665-676.

7. Crouch S.P., Crocker I.P., Fletcher J. The effect of pregnancy on polymorphonuclear leukocyte function. *J. Immunol.*, 1995, Vol. 155, no. 11, pp. 5436-5443.

8. Ghaebi M., Nouri M., Ghasemzadeh A., Farzadi L., Jadidi-Niaragh F., Ahmadi M., Yousefi M. Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, Vol. 88, pp. 61-73.

9. Girardi G., Bulla R., Salmon J.E., Tedesco F. The complement system in the pathophysiology of pregnancy. *Mol. Immunol.*, 2006, Vol. 43, no. 1-2, pp. 68-77.

10. Gupta A.K., Hasler P., Holzgreve W., Gebhardt S., Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum. Immunol.*, 2005, Vol. 66, no. 11, pp. 1146-1154.

11. Hahn S., Hasler P., Vokalova L., van Breda S.V., Lapaire O., Than N.G., Hoesli I., Rossi S.W. The role of neutrophil activation in determining the outcome of pregnancy and modulation by hormones and/or cytokines. *Clin. Exp. Immunol.*, 2019, Vol. 198, no. 1, pp. 24-36.

12. Jauniaux E., Farquharson R.G., Christiansen O.B., Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod.*, 2006, Vol. 21, no. 9, pp. 2216-2222.

13. Lampé R., Kövér Á., Szűcs S., Pál L., Árnay E., Ádány R., Póka R. Phagocytic index of neutrophil granulocytes and monocytes in healthy and preeclamptic pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2015, no. 107, pp. 26-30.

14. Stoikou M., Grimolizzi F., Giaglis S., Schäfer G., van Breda S.V., Hoesli I.M., Lapaire O., Huhn E.A., Hasler P., Rossi S.W., Hahn S. Gestational diabetes mellitus is associated with altered neutrophil activity. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 702. doi: 10.3389/fimmu.2017.00702.

Авторы:

Абрамовских О.С. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Логинова Ю.В. — младший научный сотрудник Научно-исследовательский институт иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Abramovskikh O.S., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Loginova Yu.V., Junior Research Associate, Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 15.07.2022
Принята к печати 16.08.2022

Received 15.07.2022
Accepted 16.08.2022

ВЛИЯНИЕ КУКУРБИТУРИЛОВ НА ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Актанова А.А.¹, Коваленко Е.А.^{1,2}, Пашкина Е.А.¹

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

² ФГБУН «Институт неорганической химии имени А.В. Николаева» Сибирского отделения Российской
академии наук, г. Новосибирск, Россия

Резюме. В настоящее время ведется большое число разработок, основанных на наноразмерных системах, для доставки лекарственных средств. Одной из таких систем могут служить наноразмерные кавитанды кукурбитурилы, которые благодаря наличию полости способны включать в себя молекулы лекарственного средства. Поскольку иммунная система довольно чувствительна к влиянию наноматериалов и иных повреждающих факторов, необходимо исследование иммунобезопасности новых систем доставки.

Целью данного исследования было исследование влияния наноразмерных кавитандов кукурбитурилов на цитокинпродуцирующую способность моноклеарных клеток периферической крови условно здоровых доноров.

Моноклеарные клетки (1 млн/мл) культивировали в присутствии кукурбитурилов в следующих концентрациях: 0,3 мМ кукурбит[6]урилы, 0,3 мМ кукурбит[7]урилы и 0,01 мМ кукурбит[8]урилы в течение 72 ч с дополнительной стимуляцией с помощью аCD3-антител (1 мкг/мл) и без стимуляции. Уровень цитокинов в супернатантах определялся с помощью иммуноферментного анализа.

Было показано, что кукурбит[6]урил в 1,5 раза повышал уровень спонтанной продукции ИЛ-4 ($p < 0,01$) по сравнению с контролем. В случае оценки стимулированной продукции нами было обнаружено, что кукурбит[6]урил снижает уровень продукции ИЛ-6, а также демонстрирует тенденцию ($p = 0,09$) к повышению уровня ИЛ-4.

При культивировании клеток с кукурбит[7]урилом была обнаружена тенденция по увеличению продукции провоспалительного TNF. Также было обнаружено, что кукурбит[7]урил способен подавлять продукцию ИЛ-10 в стимулированной аCD3-антителами культуре МНК в 1,5 раза.

В то же время кукурбит[8]урил снижал уровень IFN γ и ИЛ-10 по сравнению с продукцией данных цитокинов в контрольной культуре. В случае оценки влияния кукурбит[8]урилы на продукцию IFN γ стимулированными анти-CD3 антителами МНК, достоверных различий не было обнаружено, но также имеется тенденция по снижению концентрации данного цитокина по сравнению с контролем.

Адрес для переписки:

Актанова Алина Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
E-mail: aktanova_al@mail.ru

Address for correspondence:

Aktanova Alina A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrinsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 227-01-35.
E-mail: aktanova_al@mail.ru

Образец цитирования:

А.А. Актанова, Е.А. Коваленко, Е.А. Пашкина
«Влияние кукурбитурилов на цитокинпродуцирующую
способность моноклеарных клеток периферической
крови здоровых доноров» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 369-374.
doi: 10.46235/1028-7221-1183-EOC

© Актанова А.А. и соавт., 2022

For citation:

A.A. Aktanova, E.A. Kovalenko, E.A. Pashkina "Effect
of cucurbiturils on cytokine production by peripheral blood
mononuclear cells of healthy donors", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,
Vol. 25, no. 4, pp. 369-374.
doi: 10.46235/1028-7221-1183-EOC

DOI: 10.46235/1028-7221-1183-EOC

Следовательно, кукурбитурилы способны влиять как на спонтанную, так и на стимулированную продукцию цитокинов мононуклеарными клетками крови, и направленность действия на цитокин-продуцирующую способность клеток зависит от рассматриваемого гомолога.

Ключевые слова: кукурбитурилы, цитокины, лекарственная доставка, иммунобезопасность, интерлейкины, клетки крови

EFFECT OF CUCURBITURILS ON CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF HEALTHY DONORS

Aktanova A.A.^a, Kovalenko E.A.^b, Pashkina E.A.^a

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

^b A. Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Many drug delivery systems are currently under study, e.g., nanosized cavitands cucurbiturils, which, due to the presence of a cavity, can incorporate drug molecules. Since the immune system is quite sensitive to influence of nanomaterials and other cell-damaging factors, it is necessary to study immunosafety of the new delivery systems, i.e., immunotoxicity and immunomodulatory properties. The aim of this study was to investigate the effect of nanosized cucurbituril cavitands on the cytokine-producing ability of peripheral blood mononuclear cells in apparently healthy donors.

Blood mononuclear cells ($10^6/\text{mL}$) were cultured in the presence of cucurbiturils at the following concentrations: 0.3 mM cucurbit[6]uril, 0.3 mM cucurbit[7]uril, and 0.01 mM cucurbit[8]uril for 72 h, under additional stimulation with aCD3 antibodies ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$), or without it. The level of cytokines in the supernatants was determined using enzyme immunoassay.

It was shown that cucurbit[6]uril increased the level of spontaneous IL-4 production by 1.5 times ($p < 0.01$) compared with the control. In the case of stimulated cytokine production, we found that cucurbit[6]uril reduced the level of IL-6, and also shows a tendency ($p = 0.09$) towards an increase in the IL-4 level. When cells were cultured with cucurbit[7]uril, we gave revealed a trend for increased production of pro-inflammatory TNF. It was also found that cucurbit[7]uril is able to suppress the production of IL-10 in aCD3-stimulated cell culture by 1.5 times. Cucurbit[8]uril was shown to inhibit production of cytokines in non-stimulated cell cultures. A significant decrease in the level of $\text{IFN}\gamma$ and IL-10 was revealed as compared with the production of these cytokines in control cultures. When assessing the effect of cucurbit[8]uril on the $\text{IFN}\gamma$ production upon stimulation with aCD3 antibodies, no significant differences were found, but there is also a trend for a decreased concentration of this cytokine against control levels.

Cucurbiturils can influence both spontaneous and stimulated production of cytokines by the blood mononuclear cells. The effect on cytokine-producing ability of the cells depends on the tested homologue compound.

Keywords: cucurbiturils, cytokines, drug delivery, immunosafety, interleukins, blood cells

Введение

Использование наноразмерных систем доставки лекарственных средств является одним из перспективных направлений, стоящих перед современной наукой. Системы доставки лекарств предполагается применять для достижения определенных преимуществ, а именно: с целью контроля клиренса, защиты препарата от био-

деградации, адресной доставки к определенным органам, тканям или клеткам, снижения токсичности, повышения растворимости и т. д. [7] Однако перед применением в клинике различных наноструктур и наноматериалов, используемых при создании систем доставки лекарственных препаратов, требуется всестороннее тщательное изучение новых материалов, в том числе и исследование иммунотропных свойств данных

веществ, поскольку клетки иммунной системы являются наиболее чувствительными к повреждающему действию наноматериалов или иных факторов.

Кукурбитурилы – класс наноразмерных макроциклических соединений, способных инкапсулировать молекулу или фрагмент молекулы лекарственного соединения путем образования комплексов «гость – хозяин». Данные соединения состоят из гликольурильных фрагментов, число которых варьирует в зависимости от гомолога. Так, у кукурбит[6]урилы шесть гликольурильных фрагментов, а у кукурбит[8]урилы – восемь [4]. Несмотря на схожее строение, различные гомологи обладают разными физико-химическими свойствами.

Исследования, посвященные биологической безопасности кукурбитурилов *in vitro* и *in vivo* показали, что кукурбитурилы и их производные являются инертными и нетоксичными. При концентрации до 1 мМ кукурбит[7]урил не проявляет цитотоксическую активность по отношению к различным клеточным линиям человека и животных [5, 6]. При введении *in vivo* кукурбит[7]урилы показано, что максимально переносимая доза составляет 250 мг/кг; внутривенное введение кукурбитурилов ограничено из-за низкой растворимости, а не из-за развития побочных эффектов. При пероральном введении смеси кукурбит[6]урилы с кукурбит[8]урилом максимально переносимая доза была увеличена до 600 мг/кг, что говорит о низкой токсичности данной смеси [10]. Кукурбитурилы в экспериментах *in vivo* не показывают никаких признаков острой системной токсичности. При применении кукурбит[7]урилы в очень высоких дозах возможны проявления миотоксичности и нейротоксичности, однако в стандартных концентрациях, используемых при комплексобразовании с лекарственными препаратами, признаков токсичности нет [2, 8]. При исследовании влияния на клетки крови было показано, что кукурбитурилы практически не обладают иммунотоксичностью, за исключением возможной индукции апоптоза в культурах иммунокомпетентных клеток, культивируемых в присутствии кукурбит[8]урилы [1]. Однако кроме иммунотоксичности необходимо также исследовать и возможные иммуномодулирующие свойства систем доставки. Так, к примеру, известно, что РАММ дендримеры второго и третьего поколения могут усиливать продукцию противовоспалительных цитокинов, что ограничивает возможность применения данных си-

стем доставки [3]. Следовательно, для оценки иммунологической безопасности кукурбитурилов представляется актуальной оценка влияния на цитокинпродуцирующую активность клеток.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования служили мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) здоровых доноров ($n = 7$). После подписания информированного согласия у каждого донора кровь из кубитальной вены собиралась в пробирку с гепарином. Выделение МНК осуществлялось стандартным способом, а именно центрифугированием с использованием раствора фиколла с урографинном для создания градиента плотности. Выделенные клетки (1 млн/мл) культивировали в присутствии кукурбитурилов в следующих концентрациях: 0,3 мМ СВ[6], 0,3 мМ СВ[7] и 0,01 мМ СВ[8] в течение 72 ч с дополнительной стимуляцией с помощью аCD3-антител (1 мкг/мл) и без стимуляции. Выбор концентраций объясняется использованием нетоксичной дозы для СВ[6] и СВ[7] и максимально возможной концентрации СВ[8] из-за его низкой растворимости. Далее клеточные культуры центрифугировали 10 минут при 1500 об/мин, после чего аккуратно собирали супернатант и замораживали при -20°C до использования. Уровень цитокинов в супернатантах определялся с помощью иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «Вектор-Бест», Россия (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ , TNF).

Результаты и обсуждение

Уровень продукции цитокинов оценивался в супернатантах от клеточных культур, в данном случае МНК условно здоровых доноров, культивируемых в присутствии кукурбит[n]урилов ($n = 6, 7, 8$). Оценивалась как спонтанная (табл. 1), так и стимулированная анти-CD3-антителами (табл. 2) продукция. Было показано, что кукурбит[6]урил в 1,5 раза повышал уровень спонтанной продукции IL-4 ($p < 0,01$) по сравнению с контролем.

В случае оценки стимулированной продукции нами было обнаружено, что кукурбит[6]урил снижает уровень продукции IL-6, а также демонстрирует тенденцию ($p = 0,09$) к повышению уровня IL-4. Предположительно, полученные данные о действии на спонтанную и стимулированную продукцию могут говорить о влиянии кукурбит[6]урилы на Th1/Th2 баланс со смещением в сторону гуморального иммун-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ КУКУРБИТУРИЛОВ НА СПОНТАННУЮ ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. EFFECT OF CUCURBITURILS ON SPONTANEOUS CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF HEALTHY DONORS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	Контроль Control	СВ[6]	СВ[7]	СВ[8]
IL-2	10,19 (5,47-11,67)	7,87 (4,56-12,97)	5,57 (2,59-11,80)	6,54# (3,59-8,86)
IL-4	1,66 (1,39-2,17)	2,32* (1,78-3,87)	1,56 (1,34-1,77)	1,54 (1,36-4,29)
IL-6	44,72 (39,59-56,63)	56,51 (39,25-59,16)	57,02 (34,86-59,26)	40,77 (31,34-53,95)
IL-10	35,84 (27,12-53,75)	43,36 (27,39-75,13)	35,44 (16,36-89,38)	30,68* (22,46-45,94)
IFN γ	13,03 (3,83-26,08)	7,26 (3,17-9,02)	13,70 (4,50-29,67)	4,84* (1,66-9,35)
TNF	23,62 (10,79-38,12)	24,57 (10,43-43,28)	84,16# (23,26-95,67)	21,46 (16,30-42,56)

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем; # – тенденция (p < 0,09) по сравнению с контролем. Данные оценены с помощью критерия Манна–Уитни.

Note. *, significant differences compared to control; #, trend (p < 0.09) compared to control. Data were assessed using the Mann–Whitney U test.

ного ответа. Ранее было продемонстрировано, что кукурбит[6]урил может способствовать увеличению экспрессии молекул HLA-DR на В-лимфоцитов [9], что также говорит о стимулирующем действии кукурбит[6]урила на гуморальное звено иммунитета.

Кукурбит[7]урил не приводил к статистически значимым изменениям в спонтанной продукции МНК исследуемых цитокинов, однако была замечена тенденция (p = 0,09) по увеличению продукции провоспалительного цитокина TNF. Также было обнаружено, что кукурбит[7]урил способен подавлять продукцию IL-10 в стимулированной анти-CD3 антителами культуре МНК в 1,5 раза. Подобные результаты могут свидетельствовать об иммуностимулирующем и провоспалительном действии кукурбит[7]урила.

В то же время кукурбит[8]урил подавлял продукцию цитокинов в неактивированных стимуляторами лимфоцитов культурах МНК. Так,

было показано достоверное снижение уровня IFN γ и IL-10 по сравнению с продукцией данных цитокинов в контрольной культуре. Кроме того, наблюдалась тенденция (p = 0,09) по снижению уровня IL-2 МНК ПК, культивированных в присутствии кукурбит[8]урила. Кроме того, кукурбит[8]урил приводил к снижению продукции IL-10 и стимулированными МНК ПК. В случае оценки влияния кукурбит[8]урила на продукцию IFN γ стимулированными анти-CD3 антителами МНК, достоверных различий не было обнаружено, но также имеется тенденция (p = 0,06) по снижению концентрации данного цитокина по сравнению с контролем. Наблюдаемое нами влияние кукурбит[8]урила на продукцию цитокинов может быть связано с индукцией апоптоза Т-хелперов, продуцирующих данные цитокины. Согласно ранее опубликованным нами данным, присутствие кукурбит[8]урила в культуре МНК в случае Т-хелперов способно повышать ранний

**ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ КУКУРБИТУРИЛОВ НА АСД3-ИНДУЦИРОВАННУЮ ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ
МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ**

TABLE 2. EFFECT OF CUCURBITURILS ON ACD3-INDUCED CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD
MONONUCLEAR CELLS OF HEALTHY DONORS

	Контроль Control	СВ[6]	СВ[7]	СВ[8]
IL-2	46,74 (30,11-58,17)	43,03 (26,91-62,98)	50,97 (23,96-54,41)	36,37 (28,83-48,40)
IL-4	2,24 (1,68-2,64)	2,63 [#] (2,07-3,34)	2,39 (1,96-3,12)	3,06 [#] (2,33-3,93)
IL-6	5124,55 (2864,09-5460,91)	4594,76 [#] (2777,33-5214,76)	4892,89 (3147,74-5029,46)	4770,74 (2844,71-5170,56)
IL-10	501,01 (353,90-600,54)	462,48 (357,06-695,64)	322,78* (186,14-518,60)	368,14* (342,34-459,93)
IFN γ	1928,96 (1675,52-2147,64)	1908,72 (1698,32-2241,89)	2096,79 (1541,11-2320,40)	1804,19 [#] (1525,63-2102,81)
TNF	1260,24 (1089,82-1795,65)	1257,24 (825,77-1804,28)	1508,76 (1149,83-1908,82)	1470,40 (1182,43-1540,29)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

апоптоз в 2,5 раза по сравнению с уровнем «нативного» раннего апоптоза в периферической крови [1].

Заключение

Таким образом, при оценке иммуномодулирующего действия кукурбитурилов было продемон-

стрировано, что различные гомологи оказывают разное действие на иммунную систему. Следовательно, кукурбит[н]урилы способны влиять как на спонтанную, так и на стимулированную продукцию цитокинов мононуклеарными клетками крови, и направленность действия зависит от выбранного гомолога.

Список литературы / References

1. Aktanova A., Abramova T., Pashkina E., Boeva O., Grishina L., Kovalenko E., Kozlov V. Assessment of the biocompatibility of cucurbiturils in blood cells. *J. Nanomaterials*, 2021, Vol. 11, no. 6, 1356. doi: 10.3390/nano11061356.
2. Chen H., Chan J.Y.W., Yang X., Wyman I.W., Macartney D.H., Bardelang D., Lee S.M.Y., Wang R. Developmental and organspecific toxicity of cucurbit[7]uril: *In vivo* study on zebrafish models. *J. RSC Adv.*, 2015, Vol. 5, pp. 30067-30074.
3. Czarnomysy R., Bielawska A., Bielawski K. Effect of 2nd and 3rd generation PAMAM dendrimers on proliferation, differentiation, and pro-inflammatory cytokines in human keratinocytes and fibroblasts. *Int. J. Nanomedicine*, 2019, Vol. 14, pp. 7123-7139.
4. Das D., Assaf K.I., Nau W.M. Applications of cucurbiturils in medicinal chemistry and chemical biology. *J. Front. Chem.*, 2019, Vol. 7, pp. 619-631.
5. Hettiarachchi G., Nguyen D., Wu J., Lucas D., Ma D., Isaacs L., Briken V. Toxicology and drug delivery by cucurbit[n]uril type molecular containers. *PLoS One*, 2010, Vol. 5, no. 5, e10514. doi: 10.1371/journal.pone.0010514.

6. Jeon Y.J., Kim S.Y., Ko Y.H., Sakamoto S., Yamaguchi K., Kim K. Novel molecular drug carrier: Encapsulation of oxaliplatin in cucurbit[7]uril and its effects on stability and reactivity of the drug. *J. Org. Biomol. Chem*, 2005, Vol. 3, pp. 2122-2125.
7. Mazdaei M., Asare-Addo K. A mini-review of nanocarriers in drug delivery systems. *Br. J. Pharm.*, 2022, Vol. 7, iss. 1. doi: 10.5920/bjpharm.780.
8. Oun R., Floriano R.S., Isaacs L., Rowana E.G., Wheate N.J. The *ex vivo* neurotoxic, myotoxic and cardiotoxic activity of cucurbiturilbased macrocyclic drug delivery vehicles. *J. Toxicol. Res.*, 2014, Vol. 3, pp. 447-455.
9. Pashkina E., Aktanova A., Blinova E., Mirzaeva I., Kovalenko E., Knauer N., Ermakov A., Kozlov V. Evaluation of the immunosafety of cucurbit[n]uril on peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Molecules*, 2020, Vol. 25, no. 15, 3388. doi: 10.3390/molecules25153388.
10. Uzunova V.D., Cullinane C., Brix K., Nau W.M., Day A.I. Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: An exploratory *in vitro* and *in vivo* study. *J. Org. Biomol. Chem.*, 2010, Vol. 8, pp. 2037-2042.

Авторы:

Актанова А.А. — аспирант лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Коваленко Е.А. — к.х.н., научный сотрудник лаборатории химии кластерных и супрамолекулярных соединений ФГБНУ «Институт неорганической химии имени А.В. Николаева» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия

Пашкина Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Aktanova A.A., Postgraduate Student, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kovalenko E.A., PhD (Chemistry), Research Associate, A. Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Novosibirsk, Russian Federation

Pashkina E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 15.07.2022
Принята к печати 26.07.2022

Received 15.07.2022
Accepted 26.07.2022

ИНФОРМАТИВНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИНТЕГРАЦИОННОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОКАЗАТЕЛЯ В ПРОГНОЗЕ ИСХОДОВ COVID-19 И ПРЕДИКЦИИ РАЗВИТИЯ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА

Атажахова М.Г.¹, Чудилова Г.А.¹, Нестерова И.В.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Резюме. Разработка новых лабораторных диагностических маркеров, используя возможности которых можно было бы предсказать возникновение осложнений в постковидном периоде, а также диагностировать формирование постковидного синдрома у пациентов, перенесших COVID-19, является в настоящее время актуальной проблемой. Несмотря на то, что изменения со стороны органов дыхания являются наиболее распространенными проявлениями COVID-19, внелегочные проявления с развитием широкого спектра стойких симптомов и/или отсроченных осложнений приводят к полиорганным поражениям различной степени тяжести: от бессимптомных до фатальных форм. Ряд симптомов развившегося постковидного синдрома могут сохраняться в течение 3 и более недель или длиться до 6 и более месяцев. Цель исследования: исследовать информативность, разработанного нами раннее интеграционного диагностического показателя с возможностью прогноза исхода COVID-19 и предикции развития раннего постковидного синдрома.

Проведено исследование образцов периферической крови 60 пациентов (38-82 года) с диагнозом «COVID-19 средней степени тяжести», КТ-2-3, во время стационарного лечения, 30 пациентов (38-62 года) в раннем постковидном периоде и 34 пациентов (38-65 лет) с ранним постковидным синдромом. Группа сравнения составила 100 здоровых добровольцев соответствующего пола и возраста. Рассчитывался интеграционный диагностический показатель – ИДП – как маркер, объединяющий соотношение относительного количества нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов, а также уровень СРБ. ИДП = (% нейтрофильных гранулоцитов × СРБ) / % лимфоцитов.

Установлено, что во время стационарного лечения в группе исследования 1, в период острых проявлений клинических симптомов ИДП, был повышен в 12,5 раз против группы сравнения. При этом стоит отметить, что все пациенты были выписаны из стационара в соответствии с критериями выписки, согласно Временным методическим рекомендациям. В группе исследования 2, в раннем постковидном периоде, ИДП оставался повышенным в 3,4 раза против группы сравнения. По данным КТ органов грудной клетки у пациентов имелись признаки фиброзного компонента, организующейся пневмонии и очагов консолидации в легочной ткани. У пациентов в группе исследования 3 в раннем постковидным синдромом ИДП был повышен в 3 раза против группы сравнения, при этом отмечались признаки синдрома хронической усталости и когнитивных нарушений.

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123, кв. 1.
Тел.: 8 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Address for correspondence:

Nesterova Irina V.
Peoples' Friendship University of Russia
117513, Russian Federation, Moscow, Leninsky ave.,
123, apt 1.
Phone: 7 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Образец цитирования:

М.Г. Атажахова, Г.А. Чудилова, И.В. Нестерова
«Информативная значимость интеграционного
диагностического показателя в прогнозе исходов
COVID-19 и предикции развития постковидного
синдрома» // Российский иммунологический журнал,
2022. Т. 25, № 4. С. 375-378.
doi: 10.46235/1028-7221-1199-POC

© Атажахова М.Г. и соавт., 2022

For citation:

M.G. Atazhakhova, G.A. Chudilova, I.V. Nesterova
“Prognosis of COVID-19 outcomes and risk prediction for
the development of post-COVID syndrome”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,
Vol. 25, no. 4, pp. 375-378.
doi: 10.46235/1028-7221-1199-POC
DOI: 10.46235/1028-7221-1199-POC

Таким образом, ИДП может быть использован в качестве маркера в прогнозе исхода и предиктора формирования осложнений в раннем постковидном периоде и развития раннего постковидного синдрома, у пациентов, перенесших COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, постковидный период, постковидный синдром, нейтрофильные гранулоциты, С-реактивный белок, синдром хронической усталости

PROGNOSIS OF COVID-19 OUTCOMES AND RISK PREDICTION FOR THE DEVELOPMENT OF POST-COVID SYNDROME

Atazhakhova M.G.^a, Chudilova G.A.^a, Nesterova I.V.^{a, b}

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

Abstract. At the present time, the new laboratory diagnostic markers are required which may predict complications over the post-COVID period, as well as improve diagnostics of post-COVID syndrome in the patients who underwent COVID-19. Despite the fact that changes in respiratory system are the most common manifestations of COVID-19, extrapulmonary manifestations followed by the wide range of persistent symptoms and/or delayed complications may lead to multiple organ lesions of varying severity: from symptomless to fatal forms. A number of symptoms in the developed post-COVID syndrome may persist for > 3 weeks, or to be prolonged up to 6 months and later. The purpose of the study was to investigate the informativity of an early integrative diagnostic index developed by us, enabling prediction of the COVID-19 outcome, and potential development of early post-COVID syndrome.

Peripheral blood samples were examined in 60 patients (38-82 years old) diagnosed with COVID-19 of moderate severity (CT-2.3) during their inpatient treatment; 30 patients (38-62 years old) in the early post-COVID period and 34 patients (38-65 years old) with early post-COVID syndrome. The comparison group consisted of 100 healthy sex- and age-matched volunteers. The IDP, an integrative diagnostic index, was calculated as a marker including the ratio of the relative neutrophil-to-lymphocyte numbers, as well as the levels of C-reactive protein (CRP), by the following formula: $IDP = (\% \text{ neutrophilic granulocytes} \times CRP) / \% \text{ lymphocytes}$.

We have found that, during the inpatient treatment, upon acute clinical manifestations, IDP in study group 1 was increased 12.5 times against the comparison group. It should be noted that all patients were discharged from the hospital in compliance with official criteria, according to Temporary Guidelines. In the study group 2, during early post-covid period, IDP remained 3.4-fold elevated against the comparison group. According to the chest CT data, the patients had signs of a fibrous component, organizing stage of pneumonia and consolidation foci in the lung tissue. Among the group 3 patients (early post-COVID syndrome), IDP was increased three-fold against the comparison group, accompanied by the documented signs of chronic fatigue syndrome and cognitive impairment.

The IDP can be used as a marker for the prognosis of clinical outcome and a predictor of the evolving complications during the early post-COVID period and upon development of early post-COVID syndrome in the patients who have undergone COVID-19.

Keywords: COVID-19, post-covid period, post-covid syndrome, neutrophil granulocytes, C-reactive protein, chronic fatigue syndrome

Введение

Разработка новых лабораторных диагностических маркеров, используя возможности которых можно было бы предсказать возникновение осложнений в постковидном периоде, а также диагностировать формирование постковидного синдрома у пациентов, перенесших COVID-19, является в настоящее время актуальной проблемой. Несмотря на то, что изменения со стороны

органов дыхания являются наиболее распространенными проявлениями COVID-19, внелегочные проявления с развитием широкого спектра стойких симптомов и/или отсроченных осложнений приводят к полиорганным поражениям различной степени тяжести: от бессимптомных до фатальных форм [3, 4]. При наличии вышеописанной симптоматики с проявлениями синдрома хронической усталости эта группа пациентов с

перенесенным COVID-19 требуют дальнейшего наблюдения и оценки состояния системы гемопоза в амбулаторных условиях. С этой целью важным является оценка информативности использования разработанного нами ИДП как в раннем постковидном периоде, так и при формировании раннего постковидного синдрома. Следует подчеркнуть важность включения в формулу ИДП относительного количества нейтрофильных гранулоцитов (НГ), которые играют большую роль как в иммунопатогенезе COVID-19, так и в формировании постковидного синдрома. Гиперактивация этих клеток с формированием нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NETs) способствует развитию иммунотромбозов, что коррелирует с тяжестью инфекционно-воспалительного процесса [6, 7].

Цель исследования – исследовать информативность, разработанного нами раннее интеграционного диагностического показателя – ИДП с возможностью прогноза исхода COVID-19 и предикции развития раннего постковидного синдрома [1].

Материалы и методы

Проведено исследование образцов периферической крови (ПК) 60 пациентов (27 мужчин и 33 женщины) в возрасте 38–82 лет, находившихся на стационарном лечении в остром периоде в ковидном госпитале, организованном на базе Майкопской городской клинической больницы с диагнозом «COVID-19 средней степени тяжести», КТ-2-3, составивших группу исследования 1 (ГИ-1), 30 пациентов (38–62 года), обоего пола (18 женщин, 12 мужчин) в раннем постковидном периоде – группа исследования 2 (ГИ-2) и 34 пациента (14 мужчин и 20 женщин) в возрасте 38–65 лет с ранним постковидным синдромом – группа исследования 3 (ГИ-3). Группа сравнения (ГС) составила 100 здоровых добровольцев соответствующего пола и возраста. Рассчитывался ИДП, как маркер, объединяющий соотношение относительного количества НГ и лимфоцитов (Л), а также уровень СРБ: $\text{ИДП} = (\% \text{НГ} \times \text{СРБ}) / \% \text{Л}$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в ГИ-1 ИДП был значительно повышен: 55,67 (44,66–76,02) в 12,5 раз;

в ГИ-2 он оставался повышенным в 3,4 раза: 15,41 (14,99–16,04); в ГИ-3 он также оставался повышенным в 3 раза: 13,89 (9,45–18,76) против ГС: 4,47 (2,95–6,43) ($p_{1,2,3} < 0,05$). Все пациенты были выписаны из стационара в соответствии с критериями выписки, согласно Временным методическим рекомендациям. При этом в ГИ-1 уровень ИДП был повышен у всех пациентов. У пациентов группы ГИ-2 уровень ИДП достиг показателей ГС в 68,4% случаев и остался повышенным до 15,41 (14,99–16,04) в 31,6% случаев против ГС ($p_2 < 0,05$). У этой части пациентов отмечались: боль в грудной клетке, сохраняющийся кашель, одышка и, по данным КТ органов грудной клетки в этом периоде, имелись признаки фиброзного компонента, организуемой пневмонии и очагов консолидации в легочной ткани. У пациентов в ГИ-3 уровень ИДП достиг показателей ГС в 58,8% случаев и оставался повышенным, достигая 13,89 (9,45–18,76) в 41,2% случаев, против ГС ($p_3 < 0,05$). У этой части пациентов, отмечались признаки раннего постковидного синдрома: хроническая усталость с непереносимостью физической нагрузки, значительное снижение работоспособности, утомляемость и различные проявления когнитивных расстройств: головная боль, головокружение, ощущение тумана в голове, возникшие проблемы с памятью, усвоением новой информации, нарушение внимания, засыпания и сна [2, 5]. Таким образом, получены убедительные данные, свидетельствующие об информативной значимости ИДП, как в прогнозе исхода и развития, ранних постковидных осложнений, так и в качестве предиктора развития раннего постковидного синдрома.

Заключение

Установлено, что уровень ИДП во время лечения был повышен в 12,5 раз, в раннем постковидном периоде повышался в 3,4 раза, а в периоде раннего постковидного синдрома повышался в 3 раза против ГС. Таким образом, ИДП может быть использован в качестве маркера в прогнозе исхода и предиктора формирования осложнений в раннем постковидном периоде и развития раннего постковидного синдрома, у пациентов, перенесших COVID-19.

Список литературы / References

1. Атажахова М.Г., Чудилова Г.А., Нестерова И.В. Новый интеграционный диагностический показатель – прогностический фактор исхода болезни у пациентов с COVID-19 // III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов Научные труды. Т. 1. М.: Перо, 2021. С. 68. [Atazhakhova M.G., Chudilova G.A., Nesterova I.V. New integration diagnostic indicator – prognostic factor of disease outcome in patients with COVID-19. III Joint Scientific Forum of Physiologists, Biochemists and molecular Biologists. Scientific works. Vol. 1]. Moscow: Pero, 2021, p. 68. (In Russ.)]

2. Белопасов В.В., Журавлева Е.Н., Нугманова Н.П., Абдрашитова А.Т. Постковидные неврологические синдромы // Клиническая практика, 2021. Т. 12, № 2. С. 69-82. [Belopasov V.V., Zhuravleva E.N., Nugmanova N.P., Abdzashitova A.T. Post-COVID-19 neurological syndromes. *Klinicheskaya praktika = Journal of Clinical Practice*, 2021, Vol. 12, no. 2, pp. 69-82. (In Russ.)]
3. Белоцерковская Ю.Г., Романовских А.Г., Смирнов И.П., Синопальников А.И. Долгий COVID-19 // Consilium Medicum, 2021. Т. 23, № 3. С. 261-268. [Belotserkovskaya Yu.G., Romanovskikh A.G., Smirnov I.P., Sinopalnikov A.I. Long COVID-19. *Consilium Medicum*, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 261-268. (In Russ.)]
4. Канорский С.Г. Постковидный синдром: распространенность и патогенез органических поражений, направления коррекции. Систематический обзор // Кубанский научный медицинский вестник, 2021. Т. 28, № 6. С. 90-116. [Kanorsky S.G. Postcovid syndrome: prevalence and pathogenesis of organ lesions, directions of correction. Systematic review. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2021, Vol. 28, no. 6, pp. 90-116. (In Russ.)]
5. Костинов М.П., Шмитко А.Д., Полищук В.Б., Хромова Е.А. Современные представления о новом коронавирусе и заболевании, вызванном SARS-COV-2 // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 2. С. 33-42. [Kostinov M.P., Shmitko A.D., Polishchuk V.B., Khromova E.A. Modern representations of the new coronavirus and the disease caused by SARS-COV-2. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2020, Vol. 9, no. 2, pp. 33-42. (In Russ.)]
6. Нестерова И.В., Городин В.Н., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Матушкина В.А., Габдрахманова Р.Ю., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Малиновская В.В., Семенов Т.А. Эффекты влияния рекомбинантного интерферона α -2b на фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов пациентов с COVID-19 // Инфекционные болезни, 2022. Т. 20, № 1. С. 43-51. [Nesterova I.V., Gorodin V.N., Chudilova G.A., Chapurina V.N., Matushkina V.A., Gabdrakhmanova R.Yu., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Malinovskaya V.V., Semenenko T.A. Effects of recombinant interferon α -2b on the phenotype of neutrophil granulocyte subpopulations of patients with COVID-19. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2022, Vol. 20, no. 1, pp. 43-51. (In Russ.)]
7. Reusch N., de Dominicis E., Bonaguro L., Schulte-Schrepping J., Babler K., Schultze J.L., Aschenbrenner A.C. Neutrophils in COVID-19. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 652470. doi: 10.3389/fimmu.2021.652470.

Авторы:

Атажахова М.Г. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чудилова Г.А. — д.б.н., доцент, заведующая отделом клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры аллергологии и иммунологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Authors:

Atazhakhova M.G., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chudilova G.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory; Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Allergology and Immunology, Faculty of Continuing Medical Education, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Поступила 15.07.2022

Отправлена на доработку 27.07.2022

Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022

Revision received 27.07.2022

Accepted 28.07.2022

ОСОБЕННОСТИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ АЛЛЕРГИИ У ДЕТЕЙ НА ФОНЕ ИНФЕКЦИИ *HELICOBACTER* *PYLORI*

Барило А.А., Смирнова С.В., Фейзер А.А.

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Красноярск, Россия

Резюме. Ассоциация носительства инфекции *Helicobacter pylori* с патологией желудочно-кишечного тракта является одной из наиболее распространенных проблем современной медицины. В литературе имеются противоречивые данные о роли инфекции *Helicobacter pylori* в формировании аллергических заболеваний и ее влиянии на течение гастроинтестинальных проявлений аллергии. Убедительных доказательств о роли *Helicobacter pylori* в этиопатогенезе аллергических заболеваний в настоящее время не существует. Таким образом, изучение гастроинтестинальных проявлений аллергии с учетом наличия инфекции *Helicobacter pylori* является актуальным. Цель исследования – изучить особенности спектра сенсибилизации и клинического течения гастроинтестинальных проявлений аллергии на фоне инфекции *Helicobacter pylori* у детей.

Проведен ретроспективный анализ историй болезни детей с гастроинтестинальными проявлениями аллергии (n = 29) в возрасте от 1 до 18 лет (средний возраст 11±0,7 лет), проживающих на территории Восточной Сибири. Наличие инфекции *Helicobacter pylori* определяли методом иммуноферментного анализа (измерение концентрации суммарных антител к антигену CagA *Helicobacter pylori*). В зависимости от наличия носительства инфекции *Helicobacter pylori* выделены 2 группы: НР-инфицированные (n = 8) и НР-неинфицированные (n = 21). Спектр сенсибилизации определяли путем изучения данных кожного prick-тестирования с неинфекционными аллергенами. Состояние желудочно-кишечного тракта оценивали по результатам анамнеза, жалоб, объективного обследования и данных эзофагогастродуоденоскопии.

Определено, что гастроинтестинальные проявления аллергии в большинстве случаев сочетались с дерматореспираторным синдромом – в 41,3% случаев. Частота встречаемости инфекции *Helicobacter pylori* у больных с гастроинтестинальными проявлениями аллергии – 27,5% случаев. В структуре гастроинтестинальных проявлений аллергии наиболее часто определены воспалительные заболевания пищевода, желудка, кишечника в виде гастроэзофагиального рефлюкса, гастрита, дуоденита. В группе НР-инфицированных детей статистически значимо чаще определена недостаточность кардии. В группе НР-неинфицированных детей чаще определены эзофагит, бульбит, эрозивные поражения желудка и двенадцатиперстной кишки, однако данные статистической значимости не достигли. Спектр сенсибилизации больных с гастроинтестинальными проявлениями аллергии имеет особенности в зависимости от наличия НР-инфекции. Так, в группе НР-инфицированных детей статистически значимо чаще определена сенсибилизация к березе и миксту луговых трав. В группе НР-неинфици-

Адрес для переписки:

Барило Анна Александровна
Научно-исследовательский институт медицинских
проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел.: 8 (913) 158-40-20.
E-mail: anntomsk@yandex.ru

Address for correspondence:

Barilo Anna A.
Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zheleznyak str., 3g.
Phone: 7 (913) 158-40-20.
E-mail: anntomsk@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Барило, С.В. Смирнова, А.А. Фейзер «Особенности гастроинтестинальных проявлений аллергии у детей на фоне инфекции *Helicobacter pylori*» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 379-384. doi: 10.46235/1028-7221-1201-GMO

© Барило А.А. и соавт., 2022

For citation:

A.A. Barilo, S.V. Smirnova, A.A. Feizer “Gastrointestinal manifestations of allergy in the presence of *Helicobacter pylori* infection”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 379-384. doi: 10.46235/1028-7221-1201-GMO

DOI: 10.46235/1028-7221-1201-GMO

рованных детей чаще выявлена сенсibilизация к домашней пыли, шерсти кошки, шерсти собаки. Таким образом, при обследовании детей с гастроинтестинальными проявлениями аллергии необходимо исключить наличие инфекции *Helicobacter pylori*, которая может модифицировать течение истинной аллергической патологии.

Ключевые слова: дети, аллергия, аллергены, гастроинтестинальные проявления, инфекция, *Helicobacter pylori*

GASTROINTESTINAL MANIFESTATIONS OF ALLERGY IN THE PRESENCE OF *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION

Barilo A.A., Smirnova S.V., Feizer A.A.

Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch,
Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastrointestinal tract disorders is one of the most common problems in the modern medicine. There are conflicting data in the literature on the role of *H. pylori* infection in development of allergic diseases and its effect on the course of gastrointestinal disorders in allergic conditions. There is currently no conclusive evidence about the role of *H. pylori* in etiology and pathogenesis of allergic states. Hence, the studies of gastrointestinal disorders in allergic conditions in the presence of *H. pylori* infection are of sufficient relevance. Our aim was to study the features of sensitization spectrum and clinical course of gastrointestinal manifestations in allergic disorders in the children infected with *H. pylori*.

We have carried out a retrospective analysis of medical histories of the children with gastrointestinal manifestations of allergies ($n = 29$) aged from 1 to 18 years (middle age, 11 ± 0.7 years), living in Eastern Siberia. The presence of *H. pylori* infection was determined with enzyme immunoassay technique, by measuring concentrations of total antibodies to the CagA *H. pylori* antigen. Depending on the carriage of *H. pylori* infection, 2 groups were discerned: HP-infected ($n = 8$), and HP-non-infected patients ($n = 21$). The spectrum of sensitization was determined by evaluating skin-prick tests for the non-infectious allergens. Gastrointestinal tract evaluation was based on the results of anamnesis, complaints, objective examination and data of esophagogastroduodenoscopy.

It was found that, in most cases, gastrointestinal manifestations of allergy were combined with dermatorespiratory syndrome (41.3% of total group). The incidence of *H. pylori* infection in the patients with gastrointestinal manifestations of allergies was 27.5% of the group. Among the gastrointestinal manifestations of allergies, inflammatory diseases of the esophagus, stomach, and intestines, e.g., gastroesophageal reflux, gastritis, and duodenitis were most common. In the group of HP-infected children the incompetence of cardia was more often, being statistically significant. In the group of HP-noninfected children, esophagitis, bulbitis, erosive lesions of the stomach and duodenum were more common, however, the difference did not reach statistical significance. The spectrum of sensitization in the patients with gastrointestinal manifestations of allergies showed some features depending on the presence of HP infection. E.g., sensitization to birch and meadow grass mixture was found to be significantly more often in the group of HP-infected children, Among the HP-noninfected children, sensitization to house dust mite, cat wool, and dog wool was more often detected. Hence, when examining children with gastrointestinal manifestations of allergies it is necessary to exclude the presence of *H. pylori* infection, which can modify the course of a genuine allergic pathology.

Keywords: children, allergy, allergens, gastrointestinal manifestations, infection, *Helicobacter pylori*

Введение

Ассоциация носительства инфекции *Helicobacter pylori* (HP) с патологией желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины [8]. Установлено, что грамотрицательная бактерия

Helicobacter pylori ассоциирована с гастритом, дуоденитом, язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки [5,11]. Важное место в патогенезе гастродуоденальной патологии у детей занимает аллергический фактор, так как желудочно-кишечный тракт является одним из основных барьеров на пути проникновения ал-

аллергенов в организм и шоковым органом развития аллергического воспаления. Аллергические заболевания часто имеют гастроинтестинальные проявления, которые могут быть ассоциированы с НР-инфекцией [6, 9]. В свою очередь, при нарушении барьерной функции слизистой оболочки пищеварительного тракта на фоне воспалительного процесса происходит повышение ее проницаемости, что увеличивает прохождение через нее различных аллергенов и, как следствие, приводит к развитию и расширению спектра сенсибилизации [1, 2, 10]. В литературе имеются противоречивые данные о роли инфекции *Helicobacter pylori* в формировании аллергических заболеваний и ее влиянии на течение гастроинтестинальных проявлений аллергии. В одних исследованиях определена высокая частота встречаемости НР-инфекции и обсуждается возможная протективная роль в развитии аллергических заболеваний в популяции [7, 12]. В других исследованиях, напротив, продемонстрирована вероятная причинно-следственная связь между НР-инфекцией и повышенным риском развития аллергии [3, 4]. Следовательно, убедительных доказательств о роли *Helicobacter pylori* в этиопатогенезе аллергических заболеваний в настоящее время не существует. Таким образом, изучение гастроинтестинальных проявлений аллергии на фоне инфекции *Helicobacter pylori* является актуальным.

Цель исследования – изучить особенности спектра сенсибилизации и клинического течения гастроинтестинальных проявлений аллергии на фоне инфекции *Helicobacter pylori* у детей.

Материалы и методы

Проведен анализ историй болезни детей с гастроинтестинальными проявлениями аллергии ($n = 29$) в возрасте от 1 до 18 лет (средний возраст $11 \pm 0,7$ лет), проживающих на территории Восточной Сибири. Тип исследования – ретроспективный. В зависимости от наличия носительства инфекции *Helicobacter pylori* выделены группы: НР-инфицированные (1-я группа, $n = 8$) и НР-неинфицированные (2-я группа, $n = 21$).

Наличие инфекции *Helicobacter pylori* определяли методом иммуноферментного анализа (измерение концентрации суммарных антител к антигену CagA *Helicobacter pylori*). Всем больным проведено специфическое аллергологическое обследование: сбор аллергологического анамнеза, кожное prick-тестирование с неинфекционными аллергенами (Микроген, Москва). Использованы панели аллергенов: пыльцевых (береза, микст луговых трав, микст сорных трав), бытовых (домашняя пыль, клещ домашней пыли), эпидермальных (шерсть кошки, шерсть собаки). Результаты кожного prick-тестирования оценивали по

установленной методике с учетом размеров волдырной реакции и величины гиперемии: отрицательная реакция – отсутствие волдыря, гиперемии (–), слабоположительная реакция – 3–5 мм (+), положительная – 6–9 мм (++) , резко положительная – 10–14 мм (+++), гиперергическая – 15 и более мм (++++). Состояние желудочно-кишечного тракта оценивали по результатам анамнеза, жалоб, объективного обследования и данных эзофагогастродуоденоскопии. Для статистического анализа применяли пакет прикладных программ Statistica 6.0. Статистическую обработку данных проводили методами вариационного анализа с использованием t-критерия для качественных признаков. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В общей группе обследованных гастроинтестинальные проявления аллергии чаще всего сочетались с дерматореспираторным синдромом (атопический дерматит, риносинусит, бронхиальная астма) – в 41,3% ($n = 12$) случаев. Дерматоинтестинальные проявления аллергии (атопический дерматит и гастроинтестинальные проявления) определены в 13,7% ($n = 4$) случаев. Отягощенный наследственный анамнез по аллергии (наличие аллергических реакций и/или заболеваний у близких родственников) выявлен в 61,1% ($n = 11/18$) случаев.

Наличие инфекции *Helicobacter pylori* у больных с гастроинтестинальными проявлениями аллергии определено в 27,5% ($n = 8$) случаев.

Выявлены особенности поражения желудочно-кишечного тракта у детей с гастроинтестинальными проявлениями аллергии. Диспепсические жалобы (тошнота, изжога, рвота) отмечены в 56,5% ($n = 13$) случаев. Изменения в характере стула (запор, диарея) определены в 8,6% ($n = 2$) случаев. Наличие клинических признаков патологии желудочно-кишечного тракта (гастроэзофагиальный рефлюкс, гастрит, дуоденит) определено в 95,6% ($n = 22$) случаев.

При анализе данных эзофагогастродуоденоскопии (ЭФГДС) в группах больных выявлены эндоскопические признаки повреждения желудочно-кишечного тракта и определены статистически значимые межгрупповые различия (табл. 1). В группе НР-инфицированных в сравнении с группой НР-неинфицированных детей статистически значимо чаще определена недостаточность кардии: 100,0% ($n = 8$) и 57,1% ($n = 12$) случаев соответственно, $p = 0,025$. В группе НР-неинфицированных детей чаще определены эзофагит, бульбит, эрозивные поражения желудка и двенадцатиперстной кишки, однако данные статистической значимости не достигли. В группе

ТАБЛИЦА 1. ДАННЫЕ ЭЗОФАГОГАСТРОДУОДЕНОСКОПИИ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ НР-ИНФЕКЦИИ, % (n)

TABLE 1. DATA OF ESOPHAGOGASTRODUODENOSCOPY IN THE STUDY GROUP DEPENDING ON THE PRESENCE OF HP INFECTION, % (n)

Заключение ЭФГДС Conclusion of EGDS	НР-неинфицированные дети HP-infected children n = 21	НР-инфицированные дети HP-noninfected children n = 8	p
Эзофагит Esophagitis	38% (8)	25% (2)	0,5
Недостаточность кардии Incompetence of cardia	57,1% (12)	100% (8)	0,025
Гастроэзофагальный рефлюкс Gastroesophageal reflux	14,2% (3)	37,5% (3)	0,16
Гастрит Gastritis	85,7% (18)	87,5% (7)	0,9
Бульбит Bulbitis	38% (8)	37,5% (3)	0,97
Дуоденит Duodenitis	9,5% (2)	25% (2)	0,28
Эрозивные поражения Erosive lesions	19% (4)	12,5% (1)	0,67
Бивалентные признаки поражения ЖКТ Bivalent signs of lesion of GIT	19% (4)	12,5% (1)	0,67
Поливалентные признаки поражения ЖКТ Polyvalent signs of lesion of GIT	62% (13)	87,5% (7)	0,18

Примечание. % (n) – относительные и абсолютные показатели данных ЭФГДС у обследованных больных.

Note.% (n), relative and absolute values of EGDS data in the examined patients.

НР-инфицированных детей поливалентные признаки поражения ЖКТ выявлены в 87,5% (n = 7), в то время как в группе НР-неинфицированных – в 62% (n = 13) случаев. Частота встречаемости бивалентных признаков поражения ЖКТ в группе НР-инфицированных детей – в 12,5% (n = 1), в группе НР-неинфицированных – в 19% (n = 4) случаев. Таким образом, проведение ЭФГДС позволило установить структурные и функциональные изменения со стороны ЖКТ у детей с гастроинтестинальными проявлениями аллергии и определить особенности поражения ЖКТ в зависимости от наличия НР-инфекции.

Определена структура сенсибилизации больных к неинфекционным аллергенам по результатам кожного prick-тестирования в зависимости от наличия инфекции *Helicobacter pylori* (табл. 2). Так, в группе НР-инфицированных в сравнении с показателями в группе НР-неинфицированных детей статистически значимо чаще определена сенсибилизация к березе и миксту луговых трав: 80% (n = 4) и 22,2% (n = 2) случаев, p = 0,03; 100% (n = 3) и 0% (n = 0) случаев соответственно,

p = 0,001. В группе НР-неинфицированных детей чаще выявлена сенсибилизация к домашней пыли, шерсти кошки, шерсти собаки, но данные статистической значимости не достигли.

Заключение

Таким образом, полученные в результате проведенного исследования данные указывают на то, что гастроинтестинальные проявления аллергии у детей Восточной Сибири нередко сопровождаются инфекцией *Helicobacter pylori* (в 27,5% случаев), которая может модифицировать течение истинной аллергической патологии. Проведенное исследование позволило выявить структурные и функциональные изменения и определить особенности поражения желудочно-кишечного тракта у детей с гастроинтестинальными проявлениями аллергии на фоне инфекции *Helicobacter pylori*. В группе НР-инфицированных детей статистически значимо чаще определена недостаточность кардии. В группе НР-неинфицированных детей отмечены эзофагит, бульбит, эрозивные поражения желудка и двенадцатиперстной киш-

ТАБЛИЦА 2. СПЕКТР СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К АЛЛЕРГЕНАМ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ НР-ИНФЕКЦИИ, % (n)/N

TABLE 2. SPECTRUM OF SENSITIZATION TO FOOD ALLERGENS IN THE STUDY GROUPS DEPENDING ON THE PRESENCE OF HP INFECTION, % (n)/N

Наименование аллергена Name of the allergen	НР-неинфицированные дети HP-infected children	НР-инфицированные дети HP-noninfected children	p
Пыльцевые аллергены Pollen allergens			
Береза Birch	22,2% (2)/9	80% (4)/5	0,03
Микст луговых трав Mixed of meadow grass	0/7	100% (3)/3	0,001
Микст сорных трав Mixed of weed grass	33,3% (4)/12	50% (3)/6	0,4
Бытовые аллергены Domestic allergens			
Домашняя пыль Domestic dust	38,4% (5)/13	28,5% (2)/7	0,65
Клещ домашней пыли House dust mite	27,2% (3)/11	37,5% (3)/8	0,63
Эпидермальные аллергены Epidermal allergens			
Шерсть кошки Cat wool	18,1% (2)/11	14,2% (1)/7	0,8
Шерсть собаки Dog wool	30% (3)/10	0/8	0,08

Примечание. % (n) – относительное и абсолютное количество сенсibilизированных больных; N – количество тестированных больных.

Note. % (n), relative and absolute number of sensitized patients; N, number of tested patients.

ки, но данные статистической значимости не достигли. По результатам анализа кожного prick-тестирования определен спектр сенсibilизации к неинфекционным аллергенам больных с гастроинтестинальными проявлениями аллергии. В группе НР-инфицированных детей статистически значимо чаще отмечена сенсibilизация к березе и миксту луговых трав, в группе НР-неинфицированных – к домашней пыли, шерсти кошки и собаки. Следовательно, при обследовании детей с гастроинтестинальными проявлениями аллергии необходимо исключить наличие инфекции *Helicobacter pylori*, которая может мо-

дифицировать течение истинной аллергической патологии. Наличие инфекции *Helicobacter pylori* у детей с гастроинтестинальными проявлениями аллергии диктует необходимость проведения этиотропной терапии (эрадикации НР-инфекции) наряду с методами специфической аллергологической терапии (элиминация причинно-значимых аллергенов, аллергенспецифическая иммунотерапия).

Источник финансирования

Участие в научном мероприятии поддержано Краевым фондом науки.

Список литературы / References

1. Барило А.А., Борисова И.В., Смирнова С.В. Дерматореспираторный синдром как проявление пищевой аллергии у детей // Российский аллергологический журнал, 2019. Т. 16, № 1-2. С. 32-34. [Barilo A.A., Borisova I.V., Smirnova S.V. The dermato-respiratory syndrome as a manifestation of food allergy in children. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2019, Vol. 16, no. 1-2, pp. 32-34. (In Russ.)]
2. Барило А.А., Смирнова С.В. Сравнительный анализ спектра сенсibilизации к пищевым, пыльцевым и грибковым аллергенам пациентов псориазом и атопическим дерматитом // Вопросы питания, 2020. Т. 89, № 5. С. 28-34. [Barilo A.A., Smirnova S.V. The comparative analysis of the spectrum of sensitization to food,

pollen and fungal allergens in patients with atopic dermatitis and psoriasis. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*, 2020, Vol. 89, no. 5, pp. 28-34. (In Russ.)

3. Akiner U., Yener H.M., Gozen E.D., Kuzu S.B., Canakcioglu S. *Helicobacter pylori* in allergic and non-allergic rhinitis does play a protective or causative role? *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2020, Vol. 277, no. 1, pp. 141-145.

4. den Hollander W.J., Sonnenschein-van der Voort A.M., Holster I.L., de Jongste J.C., Jaddoe V.W., Hofman A., Perez-Perez G.I., Moll H.A., Blaser M.J., Duijts L., Kuipers E.J. *Helicobacter pylori* in children with asthmatic conditions at school age, and their mothers. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2016, Vol. 43, no. 8, pp. 933-943.

5. Graham D.Y. *Helicobacter pylori* update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits. *Gastroenterology*, 2015, Vol. 148, no. 4, pp. 719-731.e3.

6. Kinoshita Y., Ishimura N., Oshima N., Mikami H., Okimoto E., Jiao D.J., Ishihara S. Recent progress in the research of eosinophilic esophagitis and gastroenteritis. *Digestion*, 2016, Vol. 93, no. 1, pp. 7-12.

7. Lankarani K.B., Honarvar B., Athari S.S. The mechanisms underlying *Helicobacter pylori*-mediated protection against allergic asthma. *Tanaffos*, 2017, Vol. 16, no. 4, pp. 251-259.

8. Leja M., Axon A., Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 2016, Vol. 21, no. 1, pp. 3-7.

9. Luzzza F., Parrello T., Monteleone G., Sebkoval L., Romano M., Zarrilli R., Imeneo M., Pallone F. Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 165, no. 9, pp. 5332-5337.

10. Matysiak-Budnik T., Coffin B., Lavergne-Slove A., Sabate J.M., Mégraud F., Heyman M. *Helicobacter pylori* increases the epithelial permeability to a food antigen in human gastric biopsies. *Am. J. Gastroenterol.*, 2004, Vol. 99, no. 2, pp. 225-232.

11. Muhammad J.S., Zaidi S.F., Sugiyama T. Epidemiological ins and outs of *Helicobacter pylori*: a review. *J. Pak. Med. Assoc.*, 2012, Vol. 62, no. 9, pp. 955-959.

12. Taye B., Enquselassie F., Tsegaye A., Amberbir A., Medhin G., Fogarty A., Robinson K., Davey G. Association between infection with *Helicobacter pylori* and atopy in young Ethiopian children: A longitudinal study. *Clin. Exp. Allergy*, 2017, Vol. 47, no. 10, pp. 1299-1308.

Авторы:

Барило А.А. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Смирнова С.В. — д.м.н., профессор, руководитель научного направления Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Фейзер А.А. — аспирант Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера — обособленного подразделения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Authors:

Barilo A.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Smirnova S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Research Program, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Feizer A.A., Postgraduate Student, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 15.07.2022

Отправлена на доработку 27.07.2022

Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022

Revision received 27.07.2022

Accepted 28.07.2022

СОДЕРЖАНИЕ PD-1⁺ И PD-L1⁺ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЛИЦ С ПЫЛЬЦЕВОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИЕЙ ДО И ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

Барковская М.Ш.¹, Севастьянов П.В.², Демина Д.В.¹, Козлов В.А.¹

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

² ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. Имеющиеся данные о вкладе молекулы PD-1 и ее лигандов в иммунорегуляторные процессы позволяют предположить их участие в развитии толерантности при иммунотерапии. В настоящий момент аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) является единственным способом лечения, позволяющим повлиять на исход аллергических заболеваний. Цель исследования – оценка экспрессии молекул PD-1/PD-L1 на клетках иммунной системы у пациентов с подтвержденной сенсibilизацией к аллергенам пыльцы растений в сравнении со здоровыми донорами до и после АСИТ. В исследование были включены пациенты с бронхиальной астмой (БА) (n = 5, возраст 33,8±2,7), аллергическим ринитом (АР) (n = 7, возраст 31,6±2,8) и здоровые доноры (n = 12, возраст 32,8±1,8). Образцы венозной крови получали у пациентов трижды: до начала АСИТ, после завершения курса АСИТ и в период сезонного обострения. У больных АР количество В-лимфоцитов снижалось, а экспрессия PD-L1 В-лимфоцитами повышалась после АСИТ в сравнении с донорскими показателями. В то же время у больных БА количество В-лимфоцитов было повышено до АСИТ и нормализовалось после АСИТ. При АР количество CD8⁺PD-1⁺Т-лимфоцитов было снижено до АСИТ, но нормализовалось после завершения АСИТ. Тогда как сниженное количество CD4⁺PD-1⁺Т-лимфоцитов нормализовалось после АСИТ только в сезон поллинииции. У больных БА экспрессия PD-1 и PD-L1 на CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитах не отличалась от аналогичных маркеров группы доноров до и после АСИТ. Экспрессия PD-1 регуляторными Т-клетками (Трег) была снижена по сравнению с донорами до АСИТ при БА, а также до и после лечения у больных АР. Ранее было показано, что низкая экспрессия PD-1 циркулирующими CD4⁺Т-клетками связана с высокими концентрациями специфических IgE. Таким образом, низкий уровень PD-1 на CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитах и Трег может свидетельствовать о наличии у них функциональных нарушений при аллергопатологии. В совокупности наши результаты свидетельствуют о регуляторной роли оси PD-1/PD-L1 в иммунном ответе в ходе АСИТ и отражают различия в патогенезе аллергических нарушений, которые связаны с дисбалансом процессов актива-

Адрес для переписки:

Барковская Маргарита Шамилевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
Тел./факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: margaritabarkovskaya@gmail.com

Address for correspondence:

Barkovskaya Margarita Sh.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 227-01-35.
Phone/fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: margaritabarkovskaya@gmail.com

Образец цитирования:

М.Ш. Барковская, П.В. Севастьянов, Д.В. Демина,
В.А. Козлов «Содержание PD-1⁺ и PD-L1⁺
лимфоцитов периферической крови у лиц с пыльцевой
сенсibilизацией до и после проведения аллерген-
специфической иммунотерапии» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 385-392.
doi: 10.46235/1028-7221-1192-COP
© Барковская М.Ш. и соавт., 2022

For citation:

M.Sh. Barkovskaya, P.V. Sevastyanov, D.V. Demina,
V.A. Kozlov "Content of PD-1⁺ and PD-L1⁺ peripheral blood
lymphocytes in individuals with pollen sensitization before
and after allergen-specific immunotherapy", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,
Vol. 25, no. 4, pp. 385-392.
doi: 10.46235/1028-7221-1192-COP
DOI: 10.46235/1028-7221-1192-COP

ции и подавления клеток. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы установить роль взаимодействий PD-1/PD-L1 в процессе АСИТ-индуцированной модификации аллергических реакций.

Ключевые слова: аллерген-специфическая иммунотерапия, аллергический ринит, бронхиальная астма, молекулы PD1/PD-L, В-лимфоциты, Т-хелперы, регуляторные Т-лимфоциты

CONTENT OF PD-1⁺ AND PD-L1⁺ PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN INDIVIDUALS WITH POLLEN SENSITIZATION BEFORE AND AFTER ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY

Barkovskaya M.Sh.^a, Sevastyanov P.V.^b, Demina D.V.^a, Kozlov V.A.^a

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

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

Abstract. The available data on the contribution of the PD-1 and its ligands to immunoregulatory processes suggest their involvement into development of tolerance during immunotherapy. Currently, allergen-specific immunotherapy (ASIT) is the single treatment option that can influence the outcome of allergic diseases. Our purpose was to evaluate the PD-1/PD-L1 expression on the immune cells in patients with confirmed sensitization to plant pollen allergens in comparison with healthy controls before and after ASIT. The patients with bronchial asthma (BA) (n = 5, age 33.8±2.7), allergic rhinitis (AR) (n = 7, age 31.6±2.8), and healthy donors (n = 12, age 32.8±1.8) were included. Venous blood samples were obtained from the patients three times: before starting ASIT, upon completion of the ASIT course, and during the period of seasonal exacerbation. In patients with AR, the number of B lymphocytes was decreased, and the expression of PD-L1 by B lymphocytes increased after ASIT in comparison with donor parameters. At the same time, B lymphocyte counts were increased in BA patients before ASIT and returned to normal after ASIT. In AR, the CD8⁺PD-1⁺T lymphocyte count was reduced before ASIT, however, returning to normal values after ASIT was completed. Meanwhile, the reduced number of CD4⁺PD-1⁺T lymphocytes returned to normal only during the pollination season following ASIT. In BA patients, both before or after ASIT, PD-1 and PD-L1 expression on CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes did not differ from the donor parameters. The PD-1 expression in the T regulatory cells (Tregs) was decreased comparing with donors before ASIT in BA, and in the patients with AR, both before and after treatment. It was shown earlier that low PD-1 expression in the circulating CD4⁺ T cells is associated with high specific IgE concentrations. Thus, low PD-1 levels on CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes and regulatory T cells may indicate their functional disorders in allergic pathology. In summary, our results show a regulatory role of PD-1/PD-L1 axis in the immune response during ASIT and reflect differences in pathogenesis of allergic disorders, which are associated with imbalance of the cell activation and suppression. Further studies are required to establish the role of PD-1/PD-L1 interactions in the process of ASIT-induced modification of allergic responses.

Keywords: allergen-specific immunotherapy, allergic rhinitis, bronchial asthma, PD1/PD-L molecules, B lymphocytes, T helpers, regulatory T lymphocytes

Введение

Данная работа выполнена в рамках ПНИ (номер гос. регистрации в ЕГИСУ НИОКТР 122012000386-7).

Аллергический ринит (АР) и атопическая бронхиальная астма (БА) являются широко распространенными хроническими заболеваниями,

которые опосредованы IgE-зависимым воспалением респираторного тракта, возникающим в результате действия аллергенов [1, 3]. Единственным этиотропным методом лечения АР и атопической БА, который способен повлиять на течение заболевания и достичь стойкой ремиссии, является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ). Цель АСИТ – достижение имму-

нологической толерантности к причинно-значимому аллергену путем введения его экстракта в организм пациента в постепенно возрастающих дозах [4]. Тем не менее у части пациентов клинический эффект от лечения отсутствует, что может быть связано с особенностями регуляции иммунного ответа. Важными иммунорегуляторными молекулами являются рецептор программируемой клеточной смерти (PD-1) и его лиганды (PD-L1 и PD-L2), основной функцией которых является коингибирование и костимуляция иммунного ответа при инфекционных, аутоиммунных, аллергических, а также онкологических заболеваниях [6]. Известно, что передача сигнала через молекулу PD-1 на поверхности Т-лимфоцитов приводит к ингибированию их пролиферации и передачи сигнала через Т-клеточный рецептор. Этот механизм играет роль в поддержании иммунологической толерантности [9]. Роль PD-1 пути при аллергических заболеваниях описана в научной литературе на моделях БА и АР [10]. Имеющиеся данные о вкладе оси PD-1/PD-L в иммунорегуляторные процессы позволяют предположить участие этих механизмов в развитии толерантности при проведении иммунотерапии. Поэтому задача исследования экспрессии PD-1 и его лиганда PD-L1 на различных субпопуляциях лимфоцитов периферической крови (ПК) пациентов, страдающих АР и БА в динамике проведения АСИТ представляется актуальной.

Материалы и методы

Материалом исследования служила периферическая венозная кровь, получаемая от пациентов с аллергопатологией и условно здоровых доноров. Критерием включения считалось наличие диагноза АР средней и тяжелой степени, а также наличие контролируемой атопической БА легкой или средней степени тяжести. Диагнозы АР и БА выставлялись в соответствии с клиническими рекомендациями ПРАКИ «Аллергический ринит» от 2018 г. и GINA-2019, соответственно. Забор крови производился с предварительного информированного согласия испытуемых, у доноров — однократно, у пациентов, в целях оценки изменений в динамике, трижды: вне обострения до начала АСИТ; вне обострения после завершения АСИТ; в период предполагаемого обострения после завершения АСИТ, т. е. во время поллинииции причинно-значимых растений. Наличие сенсibilизации к причинно-значимым аллергенам во всех случаях подтверждалось результатами кожного скарификационного тестирования. Лечение проводилось по стандартной схеме предсезонной подкожной АСИТ (пкАСИТ) вне сезона цветения растений, являющихся причинно-значимыми аллергенами.

Мононуклеарную фракцию (МНК) выделяли из ПК в градиенте плотности фиколл-урографин в соответствии со стандартной методикой. Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов и оценка уровня экспрессии молекул PD-1 и PD-L1 на них осуществлялись методом проточной цитофлуориметрии. Для каждого человека, участвующего в исследовании, использовали 1×10^6 МНК ПК, окрашивание проводили моноклональными антителами, меченными флуорохромом, в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (Biolegend, San Diego, CA, США). Анализ фенотипа лимфоцитов проводился на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США) с использованием программного обеспечения FACS Diva (BD, США). Клетки с фенотипом $CD19^+CD4^-$ расценивались как В-лимфоциты; цитотоксические Т-лимфоциты распознавались по фенотипу $CD3^+CD4^-$; Т-хелперы определялись как $CD3^+CD4^+$ клетки; фенотип $CD3^+CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$ соответствовал регуляторным Т-лимфоцитам (Treg). Для оценки экспрессии PD-1 и PD-L1 применялся также FMO-контроль (fluorescence minus one) для каждой пробы, который включал всю соответствующую панель, за исключением антител к указанным антигенам. Статистический анализ данных проводился с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий между группами пациентов и условно здоровых доноров использовался критерий Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Исследуемая группа составила 12 пациентов с АР и БА (6 женщин и 6 мужчин), в возрасте от 22 до 46 лет, из них 7 пациентов с АР (средний возраст $31,6 \pm 2,8$ года) и 5 пациентов с БА (средний возраст $33,8 \pm 2,7$ года). В качестве группы сравнения были обследованы условно здоровые доноры в количестве 12 человек (6 женщин и 6 мужчин), в возрасте от 23 до 44 лет (средний возраст $32,8 \pm 1,8$ года). В среднем стаж заболевания в группе пациентов с аллергопатологией составил 13,6 лет (4–29 лет). Все пациенты с БА имели в качестве сопутствующего диагноза АР. Более 50% всех пациентов имели сопутствующий аллергический конъюнктивит, у 33% пациентов проявления аллергического ринита сопровождались перекрестной пищевой непереносимостью, у 17% наблюдалась лекарственная аллергия.

Все пациенты с БА имели поливалентную сенсibilизацию. Большинство пациентов с АР — 6 человек (85,7%) также были сенсibilизированы к 2 и более аэроаллергенам, тогда как моновалентная сенсibilизация к пыльце деревьев наблюдалась лишь у 1 пациента с АР. Наиболее

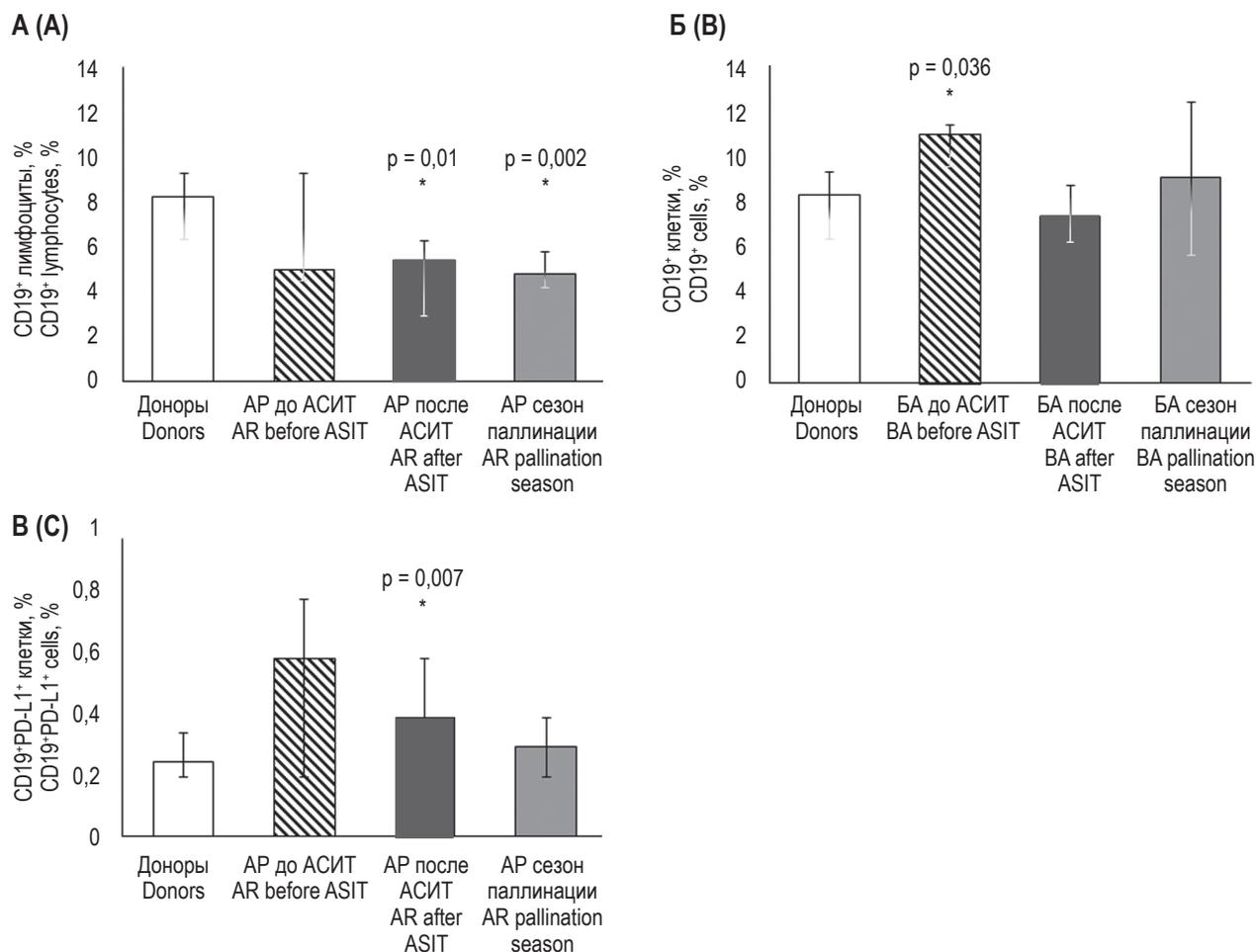


Рисунок 1. Относительное содержание В-лимфоцитов и PD-L1-позитивных В-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с БА и АР в сравнении с условно здоровыми донорами до и после проведения АСИТ

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (25 и 75 процентиля); * – указаны достоверные различия с группой доноров (U-критерий Манна–Уитни).

Figure 1. Relative content of B lymphocytes and PD-L1-positive B lymphocytes in peripheral blood of patients with BA and AR before and after ASIT in comparison with healthy donors

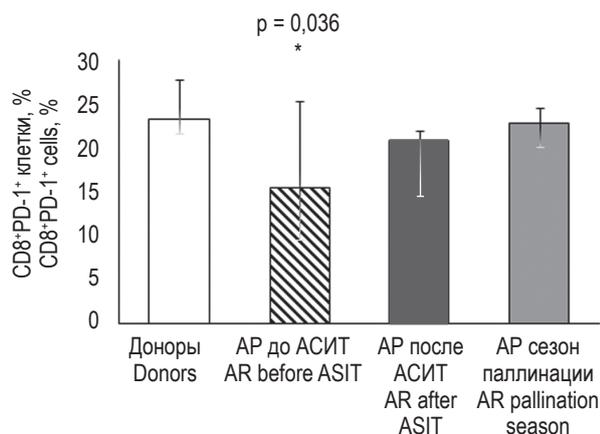
Note. Data in the diagram are given as median and interquartile range (25 and 75 percentiles). *, significant differences between patients and healthy donors (Mann–Whitney U test).

часто среди пациентов с обоими диагнозами встречалась клинически значимая сенсibilизация к пыльце деревьев и злаковых трав (83% всех пациентов), наиболее редко – эпидермальная сенсibilизация (25% всех пациентов). Учитывая тяжесть клинической симптоматики при контакте с аллергеном, всем пациентам была показана пКАСИТ пыльцевыми аллергенами. Большая часть пациентов – 8 человек (67%) получали смесь пыльцы деревьев во время проведения курса пКАСИТ. Из них всего 4 человека (33% всех пациентов) получали пыльцу деревьев в комбинации с аллергенами злаков или сорных трав. В то время как оставшиеся 2 человека (17% всех пациентов) получали моновалентную терапию пыль-

цей сорных трав, 1 человек – терапию пылью злаков и 1 человек – АСИТ комбинацией злаков и сорных трав.

Было показано, что количество В-лимфоцитов до начала терапии не отличалось от показателей группы доноров при АР (рис. 1А), но было повышено у пациентов с БА (рис. 1Б). После завершения курса АСИТ содержание В-лимфоцитов достоверно снижалось у пациентов с АР по сравнению с донорской группой и приходило в норму у пациентов с БА. Примечательно, что данные изменения сохранялись и в период предполагаемого обострения аллергопатологии в связи с цветением причинно-значимых растений в сравнении с условно здоровыми донорами (рис. 1 А, Б).

А (А)



Б (Б)

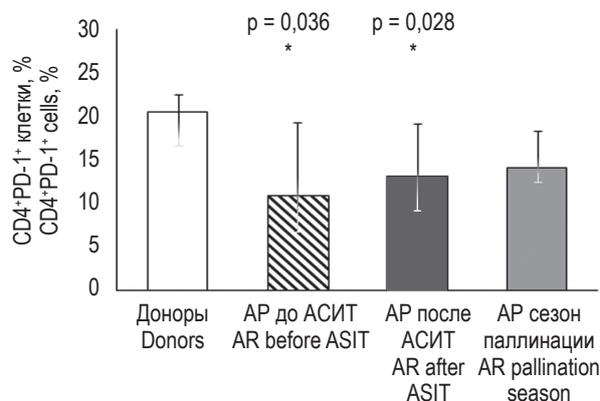


Рисунок 2. Относительное содержание PD-1-позитивных CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с АР в сравнении с условно здоровыми донорами до и после проведения АСИТ

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Relative content of PD-1-positive CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes in peripheral blood of patients with AR before and after ASIT compared with healthy donors

Note. As for Figure 1.

Экспрессия молекулы PD-1 В-лимфоцитами ПК не отличалась до начала лечения и на протяжении курса АСИТ у пациентов с АР и БА от показателей группы условно здоровых доноров (данные не представлены). Также было показано, что количество В-лимфоцитов, экспрессирующих молекулу PD-L1, не отличалось у пациентов с АР и БА до начала лечения и у доноров, однако, достоверно повышалось у больных АР после АСИТ, при этом в сезон полликации данные изменения не сохранялись — не было значимой разницы между пациентами и группой контроля (рис. 1В).

Относительное содержание CD8⁺Т-лимфоцитов ПК не изменялось у пациентов с АР и БА в сравнении с донорскими показателями во всех трех точках исследования. Также обнаружено, что процент PD-1⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов был ниже у пациентов с АР до начала терапии по сравнению с группой контроля, после проведения АСИТ относительное содержание данной популяции клеток приходило в норму. Примечательно, что эти изменения сохранялись в сезон полликации (рис. 2А). У пациентов с БА статистически значимой разницы в содержании этой субпопуляции клеток в сравнении с условно здоровыми донорами выявлено не было (данные не представлены).

Было показано, что между группой доноров и группами пациентов с АР и БА до начала курса терапии причинно-значимыми аллергенами

и после его окончания нет отличий в содержании Т-хелперов ПК. Были выявлены значимые изменения в относительном содержании PD-1⁺ хелперных Т-лимфоцитов у пациентов с АР: оно было достоверно ниже у пациентов до и после проведения АСИТ относительно группы доноров. Интересно, что в сезон предполагаемого обострения содержание данной популяции клеток приходило в норму, о чем свидетельствовало отсутствие значимых различий по сравнению с группой контроля (рис. 2Б). У пациентов с БА достоверной разницы по данному показателю ни в одной точке выявлено не было (данные не представлены).

Относительное содержание регуляторных Т-лимфоцитов не изменялось в группах пациентов в сравнении с группой доноров. Процент PD-1⁺ регуляторных Т-лимфоцитов оказался достоверно ниже у пациентов с АР и БА до проведения терапии, чем у контрольной группы, однако у больных АР это снижение сохранялось на протяжении всего эксперимента (рис. 3А). Тогда как у пациентов, страдающих БА, после лечения и в сезон полликации содержание PD-1⁺ регуляторных Т-лимфоцитов восстанавливалось до донорских значений (рис. 3Б).

По полученным данным больные БА имеют более высокое относительное содержание В-лимфоцитов ПК по сравнению со здоровыми людьми. Эти результаты соотносятся с данными других исследований [2,5] и могут быть связа-

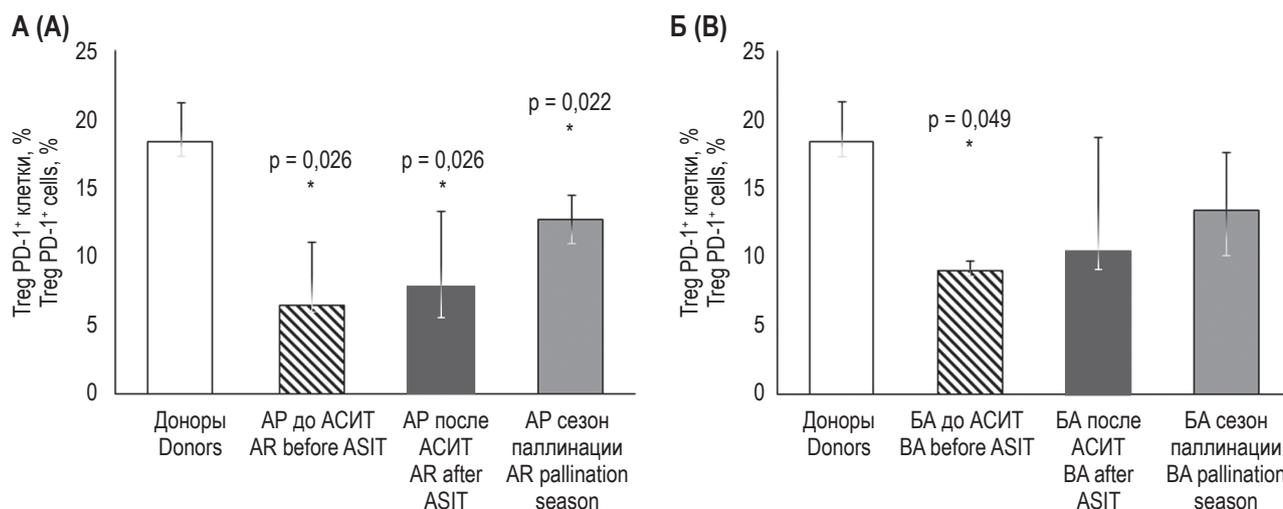


Рисунок 3. Относительное содержание PD-1-позитивных регуляторных Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с АР и БА в сравнении с условно здоровыми донорами до и после проведения АСИТ

Примечание. См. примечание к рисунку 1. Содержание клеток указано в % от общего числа CD4⁺ лимфоцитов.

Figure 3. Relative content of PD-1-positive regulatory T lymphocytes in peripheral blood of patients with AR and BA before and after ASIT in comparison with healthy donors

Note. As for Figure 1. The content of cells is given as % of the total number of CD4⁺ lymphocytes.

ны с высокой активностью гуморального звена иммунитета у лиц, страдающих БА. Проведение АСИТ приводило к значимому снижению содержания В-лимфоцитов в крови у пациентов с АР и БА относительно исходного уровня, что указывает на уменьшение активности В-клеточного иммунного ответа под воздействием терапии и согласуется с литературными данными [2]. Можно предположить, что повышение содержания PD-L1-позитивных В-лимфоцитов у пациентов с АР после проведения АСИТ связано с активацией регуляторных В-клеток (Vregs) после терапии, поскольку ранее было показано, что АСИТ индуцирует образование Vregs [7]. Кроме того, PD-L1 является одной из регуляторных молекул Vregs, участвующей в ингибировании CD4⁺Т-клеток [12].

При изучении экспрессии PD-1 удалось установить достоверное снижение относительного содержания в крови всех основных субпопуляций Т-лимфоцитов (хелперов, киллеров и регуляторных клеток), экспрессирующих данную молекулу, у больных АР до АСИТ относительно условно здоровых доноров. А также у пациентов с БА было установлено достоверное снижение относительного содержания PD-1⁺ регуляторных Т-клеток по сравнению с условно здоровыми донорами до проведения АСИТ, которое восстанавливалось после проведения АСИТ до донорских значений. Ранее было показано, что при БА низкая экспрессия PD-1 циркулирую-

щими CD4⁺Т-клетками ассоциирована с высокими концентрациями специфических IgE после провокации аллергеном при аллергической астме [8]. Таким образом, можно полагать, что низкий уровень PD-1 на Т-хелперах и регуляторных Т-клетках указывает на наличие у них функциональных нарушений при аллергопатологии. Поскольку дефекты Tregs у пациентов с аллергией могут быть восстановлены с помощью специфической иммунотерапии [13], то восстановление количества PD-1⁺ регуляторных Т-лимфоцитов при БА и PD-1⁺Т-хелперов и Т-киллеров при АР свидетельствует об их реконституции в результате АСИТ. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что снижение экспрессии PD-1 имеет патогенетическое значение для аллергопатологии, а повышение экспрессии играет протективную роль. Примечательно, что в исследовании Xi X. и соавт. полученные данные были противоположными: отмечалось аномальное увеличение количества PD-1⁺Tregs при БА [14]. Такое противоречие может объясняться тем, что исследование Xi X. проводилось на детской популяции.

Заключение

Проведенное исследование подтверждает гипотезу о том, что аллергические заболевания могут быть связаны с нарушением процессов активации и супрессии клеток иммунной системы, а также свидетельствуют об изменении данных

процессов в результате проведения АСИТ. Наблюдаемые между АР и БА различия в экспрессии PD-1 и PD-L1 в ответ на АСИТ можно рассматривать как различные паттерны иммунного ответа при этих заболеваниях. Учитывая, что в настоящее время отсутствуют достоверные прогностические маркеры эффективности АСИТ у пациентов с аллергопатологией, несмотря на на-

личие различных методов оценки этого показателя [11], ось PD-1/PD-L1 потенциально может стать перспективным маркером для диагностики и оценки эффективности АСИТ. Однако необходимы дальнейшие исследования, которые помогут установить роль взаимодействий PD-1 и PD-L1 в процессе модификации аллергических реакций, вызванной АСИТ.

Список литературы / References

1. Авдеев С.Н., Ненашева Н.М., Жуденков К.В., Петраковская В.А., Изюмова Г.В. Распространенность, заболеваемость, фенотипы и другие характеристики тяжелой бронхиальной астмы в Российской Федерации // Пульмонология, 2018. Т. 28, № 3. С. 341-358. [Avdeev S.N., Nenasheva N.M., Zhudenkov K.V., Petrakovskaya V.A., Izyumova G.V. Prevalence, morbidity, phenotypes and other characteristics of severe bronchial asthma in Russian Federation. *Pulmonologiya = Pulmonology*, 2018, Vol. 28, no. 3, pp. 341-358. (In Russ.)]
2. Балаболкин И.И., Порядин Г.В., Рябинина З.В., Ларькова И.А. Динамика экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов детей с atopической бронхиальной астмой под влиянием аллергенспецифической иммунотерапии // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. № 2. С. 67-74. [Balabolkin I.I., Poryadin G.V., Ryabinina Z.V., Larkova I.A. Dynamics of expression of surface markers of lymphocytes of children with moderate atopical bronchial asthma under the influence of allergen-specific immunotherapy. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2010, no. 2, pp. 67-74. (In Russ.)]
3. Попович В.И., Вильчинская Т., Кошель И.В. Современные взгляды на патофизиологию аллергического ринита // Оториноларингология. Восточная Европа, 2019. Т. 9, № 2. С. 199-212. [Popovich V.I., Wilczyńska T., Coshel I.V. Modern approaches to pathophysiology of allergic rhinitis. *Otorinolaringologiya. Vostochnaya Evropa = Otorhinolaryngology. Eastern Europe*, 2019, Vol. 9, no. 2, pp. 199-212. (In Russ.)]
4. Рахматуллина Н.М., Пастушенко Ю.В., Трофимова О.Р., Сибгатуллина Н.А., Ахмедзянова Д.Г., Закирова Г.Н. Современные методы аллерген-специфической иммунотерапии в лечении аллергического ринита // Казанский медицинский журнал, 2016. Т. 97, № 2. С. 288-294. [Rakhmatullina N.M., Pastushenko Yu.V., Trofimova O.R., Sibgatullina N.A., Akhmedzyanova D.G., Zakirova G.N. Modern methods of allergen-specific immunotherapy in allergic rhinitis treatment. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2016, Vol. 97, no. 2, pp. 288-294. (In Russ.)]
5. Скибо Ю.В., Курмаева Н.Ш., Цибулькина В.Н., Абрамова З.И. Структура основных популяций лимфоцитов у больных atopической бронхиальной астмой разной степени тяжести // Практическая медицина, 2012. Т. 9, № 65. С. 154-158. [Skibo Yu.V., Kurmaeva N.S., Tsiulikina V.N., Abramova Z.I. The structure of the main populations of lymphocytes in patients atopical asthma of varying severity. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2012, Vol. 9, no. 65, pp. 154-158. (In Russ.)]
6. Топтыгина А.П. Коингибирующие молекулы в норме и при патологии. Контрольные точки (checkpoint) иммунорегуляции. Часть 1. Роль коингибирующих молекул в нормальном иммунном ответе, при аллергии и аутоиммунных заболеваниях // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 20, № 4. С. 593-604. [Toptygina A.P. Co-inhibitory molecules in normal and pathological conditions. immunological checkpoints Part 1. Role of co-inhibitory molecules in normal immune response and in allergy and autoimmune diseases. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 20, no. 2, pp. 593-604. (In Russ.)]
7. Boonpiyathad T., Meyer N., Moniuszko M., Sokolowska M., Eljaszewicz A., Wirz O.F., Tomasiak-Lozowska M.M., Bodzenta-Lukaszyk A., Ruxrungtham K., van de Veen W. High-dose bee venom exposure induces similar tolerogenic B-cell responses in allergic patients and healthy beekeepers. *Allergy*, 2017, Vol. 72, no. 3, pp. 407-415.
8. Bratke K., Fritz L., Nokodian F., Geißler K., Garbe K., Lommatzsch M., Virchow J. C. Differential regulation of PD-1 and its ligands in allergic asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2017, Vol. 47, no. 11, pp. 1417-1425.
9. Chamoto K., Al-Habsi M., Honjo T. Role of PD-1 in Immunity and diseases. Springer, Cham, 2017. 75 p.
10. Morales M.A.G., Montero-Vargas J.M., Vizueta-de-Rueda J.C., Teran L.M. New Insights into the role of PD-1 and its ligands in allergic disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 21, 11898. doi: 10.3390/ijms222111898.
11. Shamji M.H., Kappen J.H., Akdis M., Jensen-Jarolim E., Knol E.F., Kleine-Tebbe J., Bohle B., Chaker A.M., Till S.J., Valenta R., Poulsen L.K., Calderon M.A., Demoly P., Pfaar O., Jacobsen L., Durham S.R., Schmidt-Weber C.B. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. *Allergy*, 2017, Vol. 72, no. 8, pp. 1156-1173.

12. Siewe B., Wallace J., Rygielski S., Stapleton J.T., Martin J., Deeks S.G., Landay A. Regulatory B cells inhibit cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity and elimination of infected CD4 T cells after *in vitro* reactivation of HIV latent reservoirs. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 4, e92934. doi: 10.1371/journal.pone.0092934.
13. Sørensen A.E., Johnsen C.R., Dalgaard L.T., Würtzen P.A., Kristensen B., Larsen M.H., Ullum H., Sørensen U., Hviid T.V.F. Human leukocyte antigen-G and regulatory T cells during specific immunotherapy for pollen allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2013, Vol. 162, no. 3, pp. 237-252.
14. Xi X., Liu J.-M., Guo J.-Y. Correlation of PD-1/PD-L1 signaling pathway with Treg/Th17 imbalance from asthmatic children. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2018, Vol. 176, no. 3-4, pp. 255-267.

Авторы:

Барковская М.Ш. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Севастьянов П.В. — студент ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Демина Д.В. — к.м.н., врач — аллерголог-иммунолог, заведующая отделением аллергологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

Authors:

Barkovskaya M.Sh., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sevastyanov P.V., Student, Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

Demina D.V., PhD (Medicine), Allergologist-Immunologist, Head, Department of Allergology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Поступила 15.07.2022

Отправлена на доработку 27.07.2022

Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022

Revision received 27.07.2022

Accepted 28.07.2022

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВРОЖДЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Боева О.С.^{1,2}, Беришвили М.Т.^{1,3}, Сизиков А.Э.¹, Пашкина Е.А.¹

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

² ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,
г. Новосибирск, Россия

³ ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Ревматоидный артрит (РА) на сегодняшний день является одним из самых распространенным аутоиммунным заболеванием в мире, которое связано с прогрессирующей инвалидизацией, системным поражением органов и тканей, а также социально-экономическими издержками для государства. Актуальным и научно значимым представляется изучение роли врожденных лимфоидных клеток (ILC) в развитии аутоиммунного воспаления при РА, в особенности роли пластичности данных клеток. ILC представляют собой резидентные в тканях врожденные лимфоидные клетки, которые имеют функциональное разнообразие, сходное с Т-клетками, а также ILC регулируют направленность иммунного ответа с помощью продукции цитокинов. В небольшом количестве ILC присутствуют в кровеносном русле, предположительно для миграции в целевые органы и ткани. Соответственно, изучение ILC при РА позволит расширить представление о патогенезе РА, а также возможно в перспективе разработать новые терапевтические стратегии, основанные на влиянии на иммунологический баланс, а также снижении воспалительного процесса при РА.

Целью данного исследования было определить субпопуляционный состав и фенотипические особенности ILC при РА.

В исследовании использовались мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) от 7 пациентов с РА и 6 условно здоровых доноров. Выделенные МНК ПК окрашивали моноклональными антителами, конъюгированными с флюорохромами: анти-Lineage (CD3/14/16/19/20/56) и анти-FcεR1 alpha-FITC, анти-CD294-APC/Cy7, анти-CD127-PerCP/Cy5.5, анти-CD336-PE, анти-CD117-APC. ILC определялись как Lin⁻CD127⁺, в общей популяции оценивали количество CD294⁺ILC (ILC2), CD117⁻CD294⁻ILC определялись нами как ILC1, а CD117⁺CD294⁻ILC были идентифицированы как ILC3. Фенотип клеток анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Biosciences, США).

Нами было определено относительное количество различных популяций ILC (ILC1, ILC2 и ILC3) среди МНК ПК. Было показано, что у пациентов с РА статистически значимо снижено число ILC2 клеток по сравнению со здоровыми донорами, в то время как в процентное соотношение ILC1 и ILC3

Адрес для переписки:

Боева Ольга Сергеевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
E-mail: starchenkova97@gmail.com

Address for correspondence:

Boeva Olga S.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 227-01-35.
E-mail: starchenkova97@gmail.com

Образец цитирования:

О.С. Боева, М.Т. Беришвили, А.Э. Сизиков,
Е.А. Пашкина «Фенотипические особенности
врожденных лимфоидных клеток при ревматоидном
артрите» // Российский иммунологический журнал,
2022. Т. 25, № 4. С. 393-398.
doi: 10.46235/1028-7221-1184-PFO

© Боева О.С. и соавт., 2022

For citation:

O.S. Boeva, M.T. Berishvili, A.E. Sizikov, E.A. Pashkina
“Phenotypic features of innate lymphoid cells in rheumatoid
arthritis”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 393-398.
doi: 10.46235/1028-7221-1184-PFO
DOI: 10.46235/1028-7221-1184-PFO

не наблюдалось достоверных различий между донорами и пациентами. Также нами была проведена оценка количества c-Kit⁺ILC2, достоверных различий в доле данных клеток между донорами и пациентами не наблюдалось.

Таким образом, ILC являются популяцией клеток, которые вносят свой вклад в патогенез РА, роль ILC2 предположительно является протективной при РА. Нарушение баланса ILC может способствовать развитию РА, для лучшего понимания патогенеза РА необходимо дальнейшее изучение субпопуляционного состава, фенотипических и функциональных характеристик ILC при данном заболевании.

Ключевые слова: врожденные лимфоидные клетки, ревматоидный артрит, цитокины, фенотипические особенности, субпопуляционный состав

PHENOTYPIC FEATURES OF INNATE LYMPHOID CELLS IN RHEUMATOID ARTHRITIS

Boeva O.S.^{a,b}, Berishvili M.T.^{a,c}, Sizikov A.E.^a, Pashkina E.A.^a

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

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

^c Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Currently, rheumatoid arthritis (RA) is considered among the most common autoimmune diseases worldwide, being associated with progressing disability, systemic organ and tissue lesions, as well as social and economic losses for the state. Studies of innate lymphoid cells (ILS) seems to be actual and significant when studying development of autoimmune inflammation in RA, in particular, the issues of the cell plasticity. ILC represent tissue resident lymphoid cells that display functional diversity, like as T cells. Moreover, ILC regulate orientation of immune response by means of cytokine production. Small amounts of ILCs are present in the bloodstream, presumably for migration to target organs and tissues. Accordingly, the study of ILC in RA will promote understanding of the RA pathogenesis. It is also possible in the future to develop new therapeutic strategies based on the impact on the immunological balance, as well as reducing the inflammatory process in RA. The aim of this study was to determine the subpopulation composition and phenotypic features of ILCs in RA.

We have isolated and studied peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 7 patients with RA and 6 healthy donors. The isolated blood MNCs were stained with monoclonal antibodies conjugated to fluorochromes: lineage-specific (CD3/14/16/19/20/56) and anti-FcεR1 alpha-FITC, anti-CD294-APC/Cy7, anti-CD127-PerCP/Cy5.5, anti-CD336-PE, anti-CD117-APC. ILCs were defined as Lin-CD127⁺. The numbers of CD294⁺ILCs (ILC2) were estimated in the general population, CD117-CD294-ILCs were defined as ILC1, and CD117⁺CD294-ILCs, as ILC3. The cell phenotype was analyzed with a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences, USA).

We determined relative numbers of different ILC subpopulations (ILC1, ILC2, and ILC3) among the total blood MNCs. It was shown, that the number of ILC2 cells in RA patients was statistically significantly reduced compared to healthy donors, whereas no significant differences in percentage of ILC1 and ILC3 were revealed between donors and patients. We also evaluated the amount of c-Kit⁺ILC2; there were no significant differences in the proportion of these cells between donors and patients.

ILCs represent a population of cells that contribute to the RA pathogenesis. The role of ILC2 in RA is, presumably, protective. The ILC imbalance may contribute to the development of RA. For a better understanding of the RA pathogenesis, further studies of the subpopulation profile, phenotypic and functional characteristics of ILC are required in this disorder.

Keywords: innate lymphoid cells, rheumatoid arthritis, cytokines, phenotypic features, subpopulation composition

Исследование выполнено в рамках темы НИР № 122012000366-9 «Изучение иммунопатогенеза фенотипов социально значимых заболеваний человека и полиморбидности как основа для разработки новых методов персонализированной диагностики и лечения».

Введение

Ревматоидный артрит (РА) на сегодняшний день является одним из самых распространенных аутоиммунных заболеваний в мире [4, 7]. Данная патология связана с прогрессирующей инвалидизацией, системным поражением органов и тканей, а также социально-экономическими издержками для государства [5].

РА до сегодняшнего дня остается важной и значимой проблемой ввиду того, что и противовоспалительная, и биологическая терапия не дают стопроцентных результатов и сопряжены риском развития тяжелых побочных эффектов. Ремиссия при данном виде заболевания достигается крайне редко и требует постоянного использования фармакотерапии [5]. В связи с этим необходимо подробно изучать патогенез РА для поиска новых мишеней лекарственных препаратов.

Интересным представляется изучение роли врожденных лимфоидных клеток (ILC) в развитии аутоиммунного воспаления при РА, в особенности роли пластичности данных клеток. ILC представляют собой резидентные в тканях врожденные лимфоидные клетки, которые имеют функциональное разнообразие, сходное с Т-клетками, а также ILC регулируют направленность иммунного ответа с помощью продукции цитокинов. В небольшом количестве ILC присутствуют в кровеносном русле, предположительно для миграции в целевые органы и ткани. Соответственно, изучение ILC при РА позволит расширить представление о патогенезе РА, а также, возможно, в перспективе разработать новые терапевтические стратегии, основанные на влиянии на иммунологический баланс, а также снижении воспалительного процесса при РА.

Материалы и методы

В исследование были включены 7 пациентов с РА и 6 условно здоровых доноров. После подписания информированного согласия у доноров и пациентов собирали 9 мл крови. Из гепаринизированной венозной крови выделяли мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) в градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/мл). Выделенные МНК ПК окрашивали моноклональными антителами, конъюгированными с флуорохромами: анти-Lineage

(CD3/14/16/19/20/56) и анти-FcεR1 alpha-FITC, анти-CD294-APC/Cy7, анти-CD127-PerCP/Cy5.5, анти-CD336-PE, анти-CD117-APC. ILC определялись как Lin⁻CD127⁺, в общей популяции оценивали количество CD294⁺ILC (ILC2), CD117⁻CD294⁻ILC определялись нами как ILC1, а CD117⁺CD294⁻ILC были идентифицированы как ILC3. Фенотип клеток анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Biosciences, США). Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета прикладных программ GraphPad Prism 9.0.0 с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В первую очередь нами было определено относительное количество различных популяций ILC (ILC1, ILC2 и ILC3) среди МНК ПК (рис. 1). Было показано, что у пациентов с РА статистически значимо снижено число ILC2 клеток по сравнению со здоровыми донорами, в то время как в процентном соотношении ILC1 и ILC3 не наблюдалось достоверных различий между донорами и пациентами.

Также нами была проведена оценка количества c-Kit⁺ILC2, достоверных различий в доле данных клеток между донорами и пациентами не наблюдалось (рис. 2). Данная субпопуляция обладает большей функциональной пластичностью и способна к трансдифференцировке [2].

В литературных источниках имеются противоречивые данные относительно количества различных субпопуляций ILC при РА. Так, Leijten E.F.A. и соавт. показали, что ILC3 клеток в синовиальной жидкости у пациентов, страдающих псориатическим артритом было в 4 раза больше, чем у пациентов страдающих РА [3]. В обзорной статье Wu X. сообщает, что у пациентов с РА процент ILC в синовиальной жидкости положительно коррелировал с количеством воспаленных суставов. Wu X. также сообщал о том, что ILC1 были значительно увеличены при РА и у лиц с высоким риском развития РА по сравнению с контрольной группой [8].

Исследование образцов лимфатических узлов, которые получили от пациентов с РА, показали, что ILC1 и ILC3 были повышены по сравнению со здоровыми людьми. Однако у пациентов с высоким риском развития РА были повышены только ILC1. Эти данные показывают, что распределение клеток может зависеть от стадии РА от самой ранней до активной фазы РА. В синовиальной оболочке у пациентов в активной фазе РА

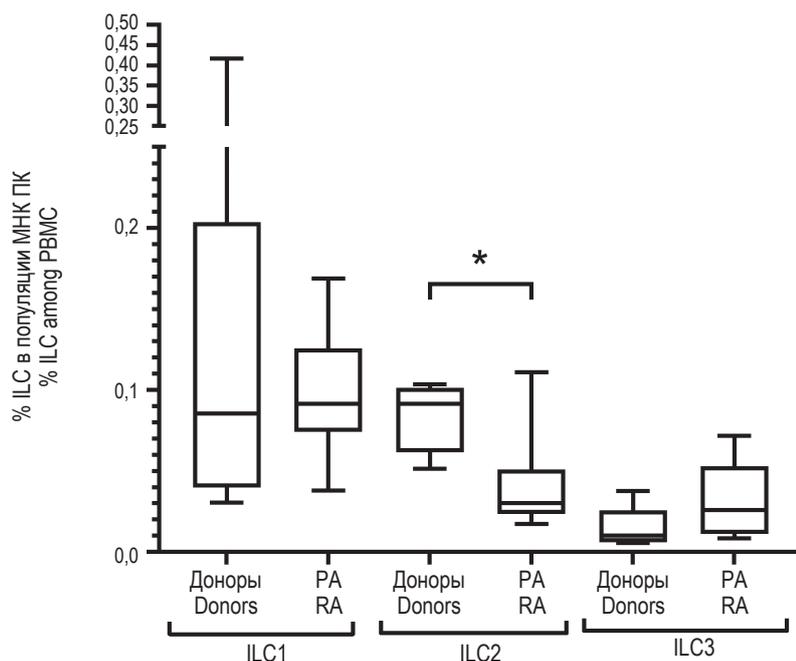


Рисунок 1. Относительное количество различных субпопуляций ILC в норме и при ревматоидном артрите
Примечание. * – достоверные различия по сравнению с донорами.

Figure 1. Number of different ILC subpopulations in normal and rheumatoid arthritis
Note. *, significant differences compared with donors.

было сниженное количество ILC2, а в ремиссии, наоборот, повышенное [1].

Имеются также и другие данные о протективной роли ILC2 [9], у пациентов со стабильным РА (DAS28 ≤ 3,2) была снижена доля ILC1 и уве-

личена доля ILC2 по сравнению с пациентами с активным РА (DAS28 > 3,2) и здоровыми донорами, кроме того, у пациентов с РА была снижена доля ILC3 по сравнению с донорами, а также наблюдалась отрицательная корреляция между долей ILC2 и активностью заболевания. В другом исследовании было показано, что ILC2 могут подавлять развитие артрита у мышей и препятствовать деструкции костной ткани [6].

Edilova M.I и соавт. показали, что ILC2 могут контролировать пролиферацию Treg. Отсутствие ILC2 приводило к увеличению воспаления, а индукция ILC2 приводила, наоборот к уменьшению воспаления [1].

Заключение

Таким образом, ILC являются популяцией клеток, которые вносят весомый вклад в патогенез РА, роль ILC2 предположительно является протективной при РА. Нарушение баланса ILC может способствовать развитию РА, для лучшего понимания патогенеза РА необходимо дальнейшее изучение субпопуляционного состава, фенотипических и функциональных характеристик ILC при данном заболевании.

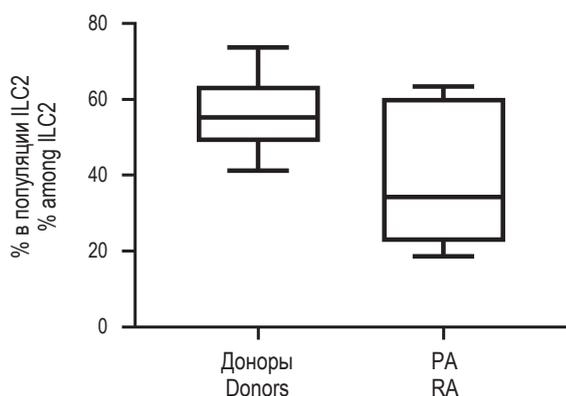


Рисунок 2. Относительное количество c-Kit⁺ILC2 в норме и при ревматоидном артрите

Figure 2. Number of c-Kit⁺ILC2 in normal and rheumatoid arthritis patients

Список литературы / References

1. Edilova M.I., Akram A., Abdul-Sater A.A. Innate immunity drives pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Biomed. J.*, 2021, Vol. 44, no. 2, pp. 172-182.
2. Hochdörfer T., Winkler C., Pardali K., Mjösberg J. Expression of c-Kit discriminates between two functionally distinct subsets of human type 2 innate lymphoid cells. *Eur. J. Immunol.*, 2019, Vol. 49, no. 6, pp. 884-893.
3. Leijten E.F., van Kempen T.S., Boes M., Michels-van Amelsfort J.M., Hijnen D., Hartgring S.A., van Roon J.A., Wenink M.H., Radstake T.R. Brief report: enrichment of activated group 3 innate lymphoid cells in psoriatic arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheumatol.*, 2015, Vol. 67, no. 10, pp. 2673-2678.
4. Marsal S., Julià A. Rheumatoid arthritis pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*, 2010, Vol. 11, no. 5, pp. 617-619.
5. McInnes I.B., Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.*, 2011, Vol. 365, no. 23, pp. 2205-2219.
6. Omata Y., Frech M., Primbs T., Lucas S., Andreev D., Scholtyssek C., Sarter K., Kindermann M., Yeremenko N., Baeten D.L., Andreas N., Kamradt T., Bozec A., Ramming A., Krönke G., Wirtz S., Schett G., Zaiss M.M. Group 2 innate lymphoid cells attenuate inflammatory arthritis and protect from bone destruction in mice. *Cell Rep.*, 2018, Vol. 24, pp. 169-180.
7. Smolen J.S., Aletaha D., Bijlsma J.W., Breedveld F.C., Boumpas D., Burmester G., Combe B., Cutolo M., de Wit M., Dougados M., Emery P., Gibofsky A., Gomez-Reino J.J., Haraoui B., Kalden J., Keystone E.C., Kvien T.K., McInnes I., Martin-Mola E., Montecucco C., Schoels M., van der Heijde D.; T2T Expert Committee. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, Vol. 69, no. 4, pp. 631-637.
8. Wu X. Innate lymphocytes in inflammatory arthritis. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 565275. doi: 10.3389/fimmu.2020.565275.
9. Yang F., Luo X., Zhu W., Li J., Zheng Z., Zhu P. Dysregulation of innate lymphoid cells in patients with active rheumatoid arthritis and mice with collagen-induced arthritis. *Mediators Inflamm.*, 2021, Vol. 2021, 1915068. doi: 10.1155/2021/1915068.

Авторы:

Боева О.С. — лаборант-исследователь лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; студентка ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Бершвили М.Т. — лаборант-исследователь лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; студентка ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Boeva O.S., Researcher Laboratory Assistant, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; Student, Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

Berishvili M.T., Researcher Laboratory Assistant, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; Student, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

Пашкина Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Pashkina E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 15.07.2022
Отправлена на доработку 26.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022
Revision received 26.07.2022
Accepted 28.07.2022

ЛЕЙКОЦИТАРНАЯ СИГНАТУРА микроРНК В КОНТЕКСТЕ ХРОНИЧЕСКОГО СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ СОСУДИСТОЙ ДЕМЕНЦИИ

Бурмистрова А.Л., Алексеева А.С., Казо М.Е., Филиппова Ю.Ю.

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

Резюме. Хроническое низкоуровневое воспаление, наблюдаемое в ходе старения организма, выступает ключевым фактором риска активации резидентных клеток врожденной иммунной системы мозга (микроглии и астроцитов). Такая активация приводит к развитию нейровоспаления и когнитивной недостаточности — базовых симптомов нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, сосудистая деменция, болезнь Паркинсона и других. В настоящее время практически не существует малоинвазивных, доступных по цене методов дифференциальной диагностики нейродегенеративных заболеваний старости и лекарственных препаратов, которые могли бы замедлить или предотвратить их прогрессию. Следовательно, остаются востребованными поиски новых периферических биомаркеров как для диагностики, так и для мониторинга эффективности лекарственной терапии. Обсуждается вопрос об использовании в качестве биомаркеров микроРНК. Цель — идентифицировать лейкоцитарную сигнатуру микроРНК при сосудистой деменции в сравнении со здоровой старостью и репродуктивным возрастом в контексте воспаления и когнитивной недостаточности. Обследовано 54 человека от репродуктивного до старческого возраста, включенных в группы: «Сосудистая деменция», «Здоровая старость» и «Репродуктивный возраст». Экспрессию микроРНК, выступающих регуляторами коммуникации иммунной и нервной систем: let-7d, let-7g, miR-21, miR-124, miR-146a, miR-155, miR-342-3p, определяли в лейкоцитах периферической крови. Лейкоциты были выбраны нами как клетки крови, отвечающие за иммунные функции, и, прежде всего, продукцию цитокинов при старении. Общую РНК получали фенол-хлороформным методом. Экспрессию микроРНК определяли в ходе количественной полимеразной цепной реакции с SYBRGreen. В качестве «гена домашнего хозяйства» использовали ген малой ядерной ДНК U6. Различия между группами определяли в тесте Краскела—Уоллиса с апостериорными попарными сравнениями по Коноверу—Инману. В результате работы показано, что экспрессия микроРНК-21 и микроРНК-342 в лейкоцитах людей пожилого/старческого возраста на фоне хронического низкоуровневого воспаления, как при здоровой старости, так и при сосудистой деменции, была значимо повышена по сравнению с лицами репродуктивного возраста. У персон с сосудистой деменцией уровень экспрессии микроРНК-124 и микроРНК-342 в лейкоцитах периферической крови был значимо выше, чем при здоровой старости. Таким образом, сигнатура из микроРНК лейкоцитов: микроРНК-124 и микроРНК-342 может выступать информативным биомаркером для диагностики сосудистой деменции. Однако требуются крупномасштабные исследования их биомаркерного потенциала.

Ключевые слова: микроРНК, лейкоциты, хроническое воспаление, старость, когнитивная недостаточность, сосудистая деменция, диагностика

Адрес для переписки:

Филиппова Юлия Юрьевна
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»
454001, Россия, г. Челябинск,
ул. Братьев Кашириных, 129.
Тел.: 8 (912) 404-52-72.
E-mail: julse@rambler.ru

Address for correspondence:

Filippova Yuliya Yu.
Chelyabinsk State University
454001, Russian Federation, Chelyabinsk, Bratiev
Kashirinykh str., 129.
Phone: 7 (912) 404-52-72.
E-mail: julse@rambler.ru

Образец цитирования:

А.Л. Бурмистрова, А.С. Алексеева, М.Е. Казо, Ю.Ю. Филиппова «Лейкоцитарная сигнатура микроРНК в контексте хронического системного воспаления при сосудистой деменции» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 399-404. doi: 10.46235/1028-7221-1187-MSO
© Бурмистрова А.Л. и соавт., 2022

For citation:

A.L. Burmistrova, A.S. Alekseeva, M.E. Cazaux, Yu.Yu. Filippova "MicroRNA signature of leukocytes in the context of chronic systemic inflammation in vascular dementia", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 399-404. doi: 10.46235/1028-7221-1187-MSO
DOI: 10.46235/1028-7221-1187-MSO

MICRORNA SIGNATURE OF LEUKOCYTES IN THE CONTEXT OF CHRONIC SYSTEMIC INFLAMMATION IN VASCULAR DEMENTIA

Burmistrova A.L., Alekseeva A.S., Cazaux M.E., Filippova Yu.Yu.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Chronic low-level inflammation during the aging process is a key risk factor for the activation of resident cells of the brain innate immune system of the (microglia and astrocytes). Such activation leads to the development of neuroinflammation and cognitive impairment which are typical to neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, vascular dementia, Parkinson disease etc. Currently, there is a lack of minimally invasive, affordable methods for diagnosing age-related neurodegenerative diseases and drugs that could slow down or prevent their progression. Hence, a search for new peripheral biomarkers is required, both for diagnostics and monitoring the efficiency of drug therapy. The option of using microRNAs as such biomarkers is under discussion. Our goal was to identify a leukocyte microRNA signature in vascular dementia as compared with healthy aging and reproductive age, in view of inflammation and cognitive deficits. We have examined 54 persons from young to senile age who were classified into the following groups: "Vascular dementia", "Healthy aging" and "Reproductive age". Expression of miRNAs known as regulators of communications between the immune and nervous systems (let-7d, let-7g, miR-21, miR-124, miR-146a, miR-155, miR-342-3p) was measured in peripheral blood leukocytes. The decision to study leukocytes was made, since these blood cells are responsible for immune functions, and, especially, cytokine production during aging. Total RNA was isolated by phenol-chloroform technique. The microRNA expression was determined by quantitative polymerase chain reaction with SYBRGreen. The U6 gene of small nuclear DNA was used as a reference "housekeeping" gene. The differences between groups were determined using the Kruskal–Wallis test with post hoc pairwise comparisons according to Conover–Inman. As a result of the study, it was found that the expression of microRNA-21 and microRNA-342 in leukocytes of elderly/senile people, both in healthy aging and in vascular dementia, was increased when compared to the persons in their reproductive age. In the persons with vascular dementia, the expression level of miRNA-124 and miRNA-342 in peripheral blood leukocytes was higher than in healthy aging group. Hence, microRNA-124 and microRNA-342 may be informative biomarkers for the diagnostics of vascular dementia. However, large-scale studies of their biomarker potential are warranted.

Keywords: miRNA, leukocytes, chronic inflammation, ageing, cognitive impairment, vascular dementia, diagnostics

Введение

Современная точка зрения свидетельствует, что хроническое низкоуровневое воспаление, наблюдаемое в ходе старения организма, выступает ключевым фактором риска активации резидентных клеток врожденной иммунной системы мозга (микроглии и астроцитов), вступающих на путь секреции классических цитокинов воспаления — IL-1 β , IL-6, TNF α , внутри мозга. Последующая сверхактивация этих клеток приводит к развитию нейровоспаления, цереброваскулярных нарушений и когнитивной недостаточности, презентация которых является базовым и/или ко-ассоциированными симптомами нейродегенеративных заболеваний (НЗ), таких как болезнь Альцгеймера, сосудистая деменция, болезнь Паркинсона и других [3, 4, 8, 12].

Как отмечают авторы, несмотря на широкий спектр работ, посвященных НЗ, существует недостаток в понимании ряда вопросов, касающихся механизмов и инициации их развития: в частности, они могут развиваться без симптомов в течение 10–20 лет до их клинической манифеста-

ции; для них характерны общность коморбидов и перекрест синдромов, таких как когнитивная недостаточность, и все это осложняет дифференциальную диагностику НЗ и их лечение. К сожалению, на сегодня практически не существует лекарственных препаратов, которые могли бы замедлить или предотвратить прогрессию НЗ пожилого/старческого возраста, и малоинвазивных методов диагностики [3, 4]. В свете сказанного, остаются востребованными поиски новых периферических биомаркеров, не только для дифференциальной диагностики, но и мониторинга эффективности лекарственной терапии.

В настоящее время проводятся масштабные исследования по использованию в качестве таких биомаркеров микроРНК (miR). МикроРНК представляют собой эндогенные некодирующие РНК, длиной около 22 нуклеотидов. Известно, что более 60% всех протеин-кодирующих генов регулируется микроРНК. МикроРНК функционирует как посттранскрипционный регулятор генной экспрессии, запуская деградацию или репрессию трансляции матричной РНК. Индивидуальные микроРНК могут образовывать связь

с сотнями различных матричных РНК, и, наоборот, каждая матричная РНК может регулироваться множеством микроРНК. Неправильная регуляция специфическими микроРНК приводит к различным заболеваниям, включая иммунные дисфункции и нейродегенеративные процессы [6].

Цель исследования – идентифицировать лейкоцитарную сигнатуру микроРНК при сосудистой деменции в сравнении со здоровой старостью и репродуктивным возрастом в контексте воспаления и когнитивной недостаточности.

Материалы и методы

В работе обследовано 54 человека от репродуктивного до старческого возраста. Основную группу составили 9 персон пожилого/старческого возраста (средний возраст – 81,4±2,0 года) с диагнозом по МКБ-10 – F 01 «Сосудистая деменция». В качестве первой контрольной группы включены лица соответствующего пола и возраста без выраженных когнитивных нарушений – группа «Здоровая старость», 21 человек, средний возраст – 79,3±1,1 год. Все персоны находились под постоянным наблюдением врачей терапевтов и психотерапевтов в «Челябинском геронтологическом центре» и имели одинаковые возраст-ассоциированные заболевания. В качестве второй контрольной группы в работу включены условно-здоровые доноры ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови» – группа «Репродуктивный возраст», 24 человека, средний возраст – 35,2±4,9 года. Исследование выполнено в рамках Соглашения с «Челябинским геронтологическим центром» от 08.02.2015 г., одобрено этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 2 от 27.08.2019). Письменное информированное согласие получено от всех участников.

Экспрессию микроРНК: *let-7d-5p*, *let-7g-5p*, *miR-21*, *miR-124-3p*, *miR-146a-5p*, *miR-155*, *miR-342-3p* определяли в лейкоцитах периферической крови. Выделение фракции лейкоцитов проводили центрифугированием цельной крови на 3000 об/мин в течение 10 мин, отбором плазмы с тромбоцитами, сбором кольца лейкоцитов, лизированием эритроцитов с помощью NH_4Cl и последующей отмывкой лейкоцитов в фосфатно-солевом буфере. Общую РНК получали фенол-хлороформным методом с использованием реагента TRIzol (MRC, США). Концентрацию и чистоту выделения РНК анализировали на флуориметре Quatus (Promega, США). кДНК синтезировали из общей РНК с применением набора реагентов «ОТ-1» для обратной транскрипции («Синтол», Москва). ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора реагентов для количественной ПЦР с SYBRGreen («Синтол», Москва) на приборе ДТ-прайм («ДНК-диагностика», Москва), каж-

дый образец анализировали в двух повторах. Программа для обратной транскрипции и амплификации была взята из работы Yang и соавт.: ОТ – инкубация при 42 °С в течение 60 мин; амплификация – 1 цикл – 95 °С в течение 3 мин, затем 40 циклов 95 °С – 5с, 62 °С – 35с [15]. Были использованы следующие нуклеотидные последовательности праймеров для микроРНК: *let-7d-5p* forward 5'-GCGCGAGGAAACCAGGAT-3', reverse 5'-GCACCACAGGAAGGCTTTTTT-3'; *let-7g-5p* forward 5'-CAGTAAGAAATATGGTGTGGACCTCA-3', reverse 5'-GATGTATTTGTTGTCATGCAAGGAC-3'; *miR-21* forward 5'-GCCCCGCTAGCTTATCAGACTGATG-3', reverse 5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'; *miR-124-3p* forward 5'-TAAGGCACGCGGTGAATGCC-3', reverse 5'-GATTGAATCGAGCACCAGTTAC-3'; *miR-146a-5p* forward 5'-ACATCCAGCTGGTGAGAAGCTGAATCCATG-3', reverse 5'-TGTCGTGGAGTCCGCAATTC-3'; *miR-155* forward 5'-GCGGTTAATGCTAATCGTGATA-3', reverse 5'-CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT-3'; *miR-342-3p* forward 5'-TCCTCGCTCTCACA CAGAAATC-3', reverse 5'-TATGGTTGTTTCAC GACTCCTTCAC-3'. В качестве «гена домашнего хозяйства» использовали ген малой ядерной ДНК *U6* forward 5'-AACGCTT CACGAATTTGCGT-3', reverse 5'-CTCGCTT CGGCAGCACA-3'.

Уровень экспрессии микроРНК (у. е.) рассчитывали путем прямого сравнения данных по формуле: $R = E^{(C(T)1 - C(T)2)} = E^{\Delta C(T)}$, где

R – относительная концентрация продукта реакции; E – эффективность ПЦР; $C(T)1$ – номер цикла ПЦР, на котором наблюдается флуоресценция реакционной смеси контрольного гена (*U6*); $C(T)2$ – номер цикла ПЦР, на котором наблюдается флуоресценция реакционной смеси исследуемого гена (микроРНК).

Все значения экспрессии микроРНК были умножены на 10000.

В ходе статистической обработки данных были рассчитаны медиана и интерквартильный диапазон. Для сравнения выборок применяли метод Краскела–Уоллиса с попарными сравнениями по Коноверу–Инману. Расчеты выполнены программе PAST v. 3.20. Во всех случаях статистически значимыми считались различия и зависимости при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В рамках нашего пилотного обследования лиц пожилого/старческого возраста с сосудистой деменцией, при здоровом старении, лиц репродуктивного возраста, в лейкоцитах периферической крови была проведена оценка уровня экспрессии семи микроРНК, участвующих в воспалении и нейроиммунных функциях (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ микроРНК В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛИЦ С НАЛИЧИЕМ / ОТСУТСТВИЕМ СОСУДИСТОЙ ДЕМЕНЦИИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. MicroRNA EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES OF PEOPLE WITH/WITHOUT VASCULAR DEMENTIA, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели, у. е. Indicators, с. u.	Репродуктивный возраст Adults (n = 24)	Здоровая старость Healthy ageing (n = 21)	Сосудистая деменция Vascular dementia (n = 9)
let-7d	15,61 (10,84-18,22)	14,80 (11,22-23,23)	19,54 (15,61-24,65)
let-7g	405,32 (334,93-569,91)	441,94 (301,86-525,56)	525,56 (457,53-1134,40)
микроРНК-21 miR-21	0,02 (0,01-0,03)	0,28* (0,01-1,26)	0,45* (0,04-0,65)
микроРНК-124 miR-124	0,32 (0,22-0,40)	0,24 (0,17-0,70)	1,12* ** (0,69-1,40)
микроРНК-146a miR-146a	0,02 (0,003-0,074)	0,004 (0,003-0,011)	0,01 (0,003-0,013)
микроРНК-155 miR-155	0,20 (0,13-0,36)	0,09 (0,024-0,310)	0,19 (0,06-0,34)
микроРНК-342 miR-342	0,003 (0,002-0,007)	0,10* (0,003-0,650)	0,50* ** (0,330-1,500)

Примечание. * – значимые различия между группами «Здоровая старость» / «Деменция» и группой «Репродуктивный возраст» (p ≤ 0,05). ** – значимые различия между группами «Здоровая старость» и «Деменция» (p ≤ 0,05).

Note. *, statistically significant differences between groups of Healthy ageing / Dementia and Adults (p ≤ 0.05); **, statistically significant differences between groups of Healthy ageing and Dementia (p ≤ 0.05).

Различия между группами были характерны только для микроРНК-21, микроРНК-124 и микроРНК-342.

У персон пожилого/старческого возраста, по сравнению с лицами репродуктивного возраста, значимо повышена экспрессия: в группе «Здоровая старость» – микроРНК-21 и микроРНК-342, в группе «Сосудистая деменция» – микроРНК-21, микроРНК-124 и микроРНК-342 (табл. 1).

При сравнении персон пожилого/старческого возраста с наличием/отсутствием когнитивных нарушений показано, что у лиц с сосудистой деменцией уровень экспрессии микроРНК-124 и микроРНК-342 в лейкоцитах был значимо выше, чем у персон при здоровой старости (табл. 1).

В настоящее время процессы старения определены как хроническая стрессовая ситуация, сопровождающаяся конверсией функций клеток врожденной иммунной системы от эффекторных к гуморальным – продукции цитокинов, создателей хронического низкоуровневого системного воспаления, выступающих инициаторами развития нейровоспаления, когнитивной недостаточности и нейродегенеративных заболеваний (сосудистая деменция, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др.) [2]. Для данных патологий характерны общие факторы риска и клинические симптомы, что затрудняет их дифференциальную диагностику, подходы к эффек-

тивным методам лечения и инициирует поиски значимых и малоинвазивных биомаркеров указанных патологий.

Большой поток литературы рассматривает в качестве таких биологических маркеров микроРНК – критических модуляторов генной экспрессии практически всех биологических процессов, в том числе иммунных и нервных при старении [14].

Рядом авторов была предпринята попытка сегрегации сосудистой деменции от других форм НЗ на основе циркуляторных микроРНК. Так, в обзоре Blount и соавт. показано, что изменение уровней: микроРНК-17, микроРНК-18a, микроРНК-21, микроРНК-29a, микроРНК-7a, микроРНК-10b и микроРНК-130b в циркуляции ассоциировано с сосудистой деменцией [4]. В то же время Prabhakar и соавт. продемонстрировано, что для идентификации сосудистой деменции от болезни мелких сосудов головного мозга могут быть использованы низкие уровни экспрессии микроРНК-409 и высокие – микроРНК-451a, микроРНК-486 и микроРНК-502 в плазме крови [9]. Без рассмотрения лейкоцитарной сигнатуры микроРНК лимитируется информация о ее роли в патогенезе патологических процессов и, следовательно, поиск мишеней для терапии [11]. Поэтому нами был применен другой подход.

Как отмечено нами ранее, что важной составляющей всех НЗ, в том числе и сосудистой деменции, является нейровоспаление, инициатором которого выступает системное хроническое низкоуровневое воспаление. Ранее нами получены аналогичные данные: у персон пожилого/старческого возраста группы «Здоровая старость» были обнаружены значимо высокие концентрации IL-6, IL-1 β , IFN γ и IL-10, в плазме крови по сравнению с показателями людей репродуктивного возраста. У людей с сосудистой деменцией воспалительный потенциал был выше, достигая значимо повышенных концентрации IL-6 и TNF α на фоне низких уровней IL-1 β , по сравнению с персонами группы «Здоровая старость» [1].

Ключевыми регуляторами цитокиновой сети и нейровоспаления, а также инициаторами НЗ выступают некоторые микроРНК. Среди них наиболее изученные провоспалительные: микроРНК-155 и микроРНК-342; противовоспалительные: микроРНК-146а, микроРНК-21, микроРНК-124; и микроРНК, обладающие как про-, так и противовоспалительными свойствами: представители семейства let-7 [7, 13].

Важно отметить, что, по данным авторов, микроРНК-124, микроРНК-146а, микроРНК-155 и ряд дополнительных, в том числе микроРНК-21 и микроРНК-342, не только участвуют в регуляции воспалительных путей, но и определены в качестве посредников между иммунной и нервной системами [4, 8, 14]. Они контролируют обоюдонаправленную коммуникацию, в ходе которой модулируются функции иммунной системы и мозга, в частности при физиологических условиях, его высших функций – пластичность, когнитивные способности, нейрогенез, способность восстанавливаться после ментальных стрессов [5, 14]. Однако такая тесная эволюционная интеграция стала основой развития нейроиммунных копатологий, таких как аутизм, шизофрения, болезнь Альцгеймера, сосудистая деменция и других.

В результате в своем пилотном исследовании мы оценили уровень экспрессии семи представленных выше микроРНК в лейкоцитах периферической крови людей пожилого/старческого возраста с сосудистой деменцией и при здоровом старении. Для характеристики хронического низкоуровневого системного воспаления, ассоциированного со здоровой старостью, в качестве контроля в работу была включена группа персон репродуктивного возраста. Лейкоциты были выбраны нами как клетки крови, отвечающие за иммунные функции, и, прежде всего, продукцию цитокинов при старении. Необходимо отметить, что существуют различия профилей экспрессии микроРНК в лейкоцитах и плазме крови, что можно объяснить фактом наличия в плазме микроРНК, освобождаемой не только клетками крови, но также внеклеточной микроРНК, происходящей из других тканей, в частности, мозга [11].

В результате работы, между исследуемыми группами нами не обнаружено статистически значимых различий в уровнях экспрессии важного активатора провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6 и TNF α) – микроРНК 155. Такой результат может быть связан сильными межличудивидуальными различиями внутри групп, небольшими выборками обследованных лиц или нивелированием различий в связи с перекрытием уровней экспрессии разными типами клеток, входящими в пул лейкоцитов, что требует дальнейшего изучения.

Тем не менее мы продемонстрировали, что у лиц с сосудистой деменцией в лейкоцитах периферической крови регистрируется повышенная экспрессия микроРНК-342, которая обладает не только провоспалительными эффектами, но и играет важную роль в пролиферации, дифференцировке нервных клеток и нейротоксичности [4].

На фоне высокой экспрессии микроРНК-342 при сосудистой деменции нами показаны высокие уровни противовоспалительных, нейроиммунных микроРНК: микроРНК-21 и микроРНК-124, что вероятно, может носить компенсаторный характер. Известно, что микроРНК-21 индуцируется множеством провоспалительных молекул, таких как патоген-ассоциированные и повреждение-ассоциированные молекулярные паттерны; функционально лимитирована при нормальных физиологических условиях, а при патологических транскрибируется до высоких уровней. Как отмечено группой авторов [8], у персон с различными возраст-ассоциированными заболеваниями наблюдаются значимые отклонения в уровнях экспрессии микроРНК-21 по отношению к аналогичным показателям при здоровой старости. МикроРНК-124 – определена как критический модулятор иммунных клеток и органов, включая мононуклеары периферической крови, костный мозг, лимфоидные узлы, тимус, а также нервных и глиальных клеток центральной нервной системы, включая астроциты, микроглию, олигодендроциты. В большинстве случаев микроРНК-124 индуцируется воспалительными иммунными сигналами, но функционирует как негативный регулятор для таких сигналов, формируя негативную петлю обратной связи для поддержания гомеостаза [10].

Заключение

Таким образом, в нашем пилотном исследовании мы показали, что оценка уровней экспрессии микроРНК: микроРНК-124 и микроРНК-342 в лейкоцитах периферической крови может выступать информативным биомаркером для диагностики сосудистой деменции.

Однако работа требует продолжения в нескольких направлениях: в увеличении количества обследованных лиц, расширения сигнатуры рассматриваемых РНК и нейродегенеративных патологий.

Список литературы / References

1. Бурмистрова А.Л., Казо М.Е., Алексеева А.С., Филиппова Ю.Ю. Молекулярные меседжи периферии – цитокины и гормоны стресса – в контексте фенотипов когнитивного старения: здоровая старость/депрессия/деменция // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 4. С. 215-222. [Burmistrova A.L., Cazaux M.E., Alekseeva A.S., Filippova Yu.Yu. Peripheral molecular messages – cytokines and stress hormones – in the context of cognitive aging phenotypes: healthy ageing/depression/dementia. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2021, Vol. 24, no. 4, pp. 215-222. (in Russ.)]
2. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
3. Barbagallo C., Mostile G., Baglieri G., Giunta F., Luca A., Raciti L., Zappia M., Purrello M., Ragusa M., Nicoletti A. Specific signatures of serum miRNAs as potential biomarkers to discriminate clinically similar neurodegenerative and vascular-related diseases. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2020, Vol. 40, no. 4, pp. 531-546.
4. Blount G.S., Coursey L., Kocerha J. MicroRNA networks in cognition and dementia. *Cells*, 2022, Vol. 11, no. 12, 1882. doi: 10.3390/cells11121882.
5. Croese T., Castellani G., Schwartz M. Immune cell compartmentalization for brain surveillance and protection. *Nat. Immunol.*, 2021, Vol. 22, no. 9, pp. 1083-1092.
6. Mahesh G., Biswas R. MicroRNA-155: a master regulator of inflammation. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2019, Vol. 39, no. 6, pp. 321-330.
7. Nuzziello N., Liguori M. The microRNA centrism in the orchestration of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Cells*, 2019, Vol. 8, no. 10, 1193. doi: 10.3390/cells8101193.
8. Olivieri F., Prattichizzo F., Giuliani A., Maticchione G., Ripponi M.R., Sabbatinelli J., Bonafè M. miR-21 and miR-146a: the microRNAs of inflammaging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.*, 2021, Vol. 70, 101374. doi: 10.1016/j.arr.2021.101374.
9. Prabhakar P., Chandra S.R., Christopher R. Circulating microRNAs as potential biomarkers for the identification of vascular dementia due to cerebral small vessel disease. *Age Ageing*, 2017, Vol. 46, no. 5, pp. 861-864.
10. Qin Z., Wang P.Y., Su D.F., Liu X. miRNA-124 in immune system and immune disorders. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 406. doi: 10.3389/fimmu.2016.00406.
11. Schwiensbacher C., Foco L., Picard A., Corradi E., Serafin A., Panzer J., Zanigni S., Blankenburg H., Facheris M.F., Giannini G., Falla M., Cortelli P., Pramstaller P.P., Hicks A.A. Plasma and white blood cells show different miRNA expression profiles in Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.*, 2017, Vol. 62, no. 2, pp. 244-254.
12. Sheinerman K.S., Toledo J.B., Tsivinsky V.G., Irwin D., Grossman M., Weintraub D., Hurtig H.I., Chen-Plotkin A., Wolk D.A., McCluskey L.F., Elman L.B., Trojanowski J.Q., Umansky S.R. Circulating brain-enriched microRNAs as novel biomarkers for detection and differentiation of neurodegenerative diseases. *Alzheimers Res. Ther.*, 2017, Vol. 9, no. 1, 89. doi: 10.1186/s13195-017-0316-0.
13. Slota J.A., Booth S.A. MicroRNAs in neuroinflammation: implications in disease pathogenesis, biomarker discovery and therapeutic applications. *Noncoding RNA*, 2019, Vol. 5, no. 2, 35. doi: 10.3390/ncrna5020035.
14. Soreq H., Wolf Y. NeurimmiRs: microRNAs in the neuroimmune interface. *Trends Mol. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 10, pp. 548-555.
15. Yang L.H., Wang S.L., Tang L.L., Liu B., Ye W.L., Wang L.L., Wang Z.Y., Zhou M.T., Chen B.C. Universal stem-loop primer method for screening and quantification of microRNA. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 12, e115293. doi: 10.1371/journal.pone.0115293.

Авторы:

Бурмистрова А.Л. – д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Алексеева А.С. – аспирант кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Казо М.Е. – аспирант кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Филиппова Ю.Ю. – к.б.н., доцент, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Burmistrova A.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Alekseeva A.S., Postgraduate Student, Department of Microbiology, Immunology and General biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Cazaux M.E., Postgraduate Student, Department of Microbiology, Immunology and General biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Filippova Yu. Yu., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 15.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022
Accepted 28.07.2022

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *HBD1* И *LL37* ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

Быстрицкая Е.П.¹, Мурашкин Н.Н.^{2,3}, Материкин А.И.²,
Наумова Е.А.⁴, Яковлева И.В.¹, Вартанова Н.О.¹, Свитич О.А.^{1,3}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Резюме. Атопический дерматит – мультифакторное генетически детерминированное воспалительное заболевание кожи, характеризующееся зудом, хроническим рецидивирующим течением, возрастными особенностями локализации и морфологии очагов поражения. Атопический дерматит принадлежит к группе заболеваний, которые, как полагают, возникают в результате сложных взаимодействий между генетическими, иммунологическими факторами и факторами окружающей среды. При атопическом дерматите нарушается барьерная функция кожи. Противомикробные пептиды типа LL-37, β-дефенсины участвуют в поддержании барьерной функции кожи (в частности межклеточных контактов). Дисбаланс противомикробных пептидов приводит к развитию различных заболеваний, в том числе и аллергических. Целью этого исследования является изучение экспрессионного профиля генов противомикробных пептидов *HBD1* и *LL37* в коже и мононуклеарных клетках крови при среднетяжелом и тяжелом течении атопического дерматита у детей в динамике. С помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени в образцах кожи и в мононуклеарных клетках крови был выявлен уровень экспрессии генов *HBD1* и *LL37*. Анализ экспрессионного профиля таргетных генов показал достоверное ($p \leq 0,017$) повышение уровней экспрессии *HBD1* (Н-критерий = 24,76; 2, $n = 72$; $p = 0,00001$) и *LL37* (Н-критерий = 15,69; 2, $n = 72$; $p = 0,00039$) в крови у пациентов с атопическим дерматитом по отношению к группе сравнения, а также снижение ($p \leq 0,05$) уровня экспрессии *HBD1* в пораженной коже по отношению к контрольной группе. Наши данные по гену кателицидина в коже не расходятся с примерами из литературы, поскольку его экспрессия в случае атопического дерматита снижена. В нашем случае также имеет место повышение экспрессии этого гена в МНК. Пептид *HBD1* экспрессируется как в моноцитах, так и в макрофагах и является, таким образом, связующим звеном между врожденным и приобретенным иммунитетом. В нашем исследовании экспрессия гена *HBD1* повышалась только в крови, что свидетельствует об активации структур врожденного иммунитета на системном уровне в ответ на воспаление. Выявление роли иммунологических маркеров в течении атопического дерматита позволит создать новые прогностические подходы при ведении па-

Адрес для переписки:

Быстрицкая Елизавета Петровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (915) 155-86-18.
E-mail: lisabystritskaya@gmail.com

Address for correspondence:

Bystritskaya Elizaveta P.
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a.
Phone: 7 (915) 155-86-18.
E-mail: lisabystritskaya@gmail.com

Образец цитирования:

Е.П. Быстрицкая, Н.Н. Мурашкин, А.И. Материкин, Е.А. Наумова, И.В. Яковлева, Н.О. Вартанова, О.А. Свитич «Экспрессия генов *HBD1* и *LL37* при атопическом дерматите у детей и подростков» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 405-410.
doi: 10.46235/1028-7221-1194-HAL

© Быстрицкая Е.П. и соавт., 2022

For citation:

E.P. Bystritskaya, N.N. Murashkin, A.I. Materikin, Naumova E.A., I.V. Yakovleva, N.O. Vartanova, O.A. Svitich “*HBD1* and *LL37* gene expression in children with atopic dermatitis”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 405-410.
doi: 10.46235/1028-7221-1194-HAL

DOI: 10.46235/1028-7221-1194-HAL

циентов с атопической патологией. Поэтому важно иметь полное представление о патогенетических механизмах аллергического заболевания.

Ключевые слова: атопический дерматит, противомикробные пептиды, кателицидин, человеческий β -дефенсин 1, врожденный иммунитет, экспрессия генов

HBD1 AND LL37 GENE EXPRESSION IN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS

Bystritskaya E.P.^a, Murashkin N.N.^{b, c}, Materikin A.I.^b, Naumova E.A.^d, Yakovleva I.V.^a, Vartanova N.O.^a, Svitich O.A.^{a, c}

^a I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

^c I. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^d M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Atopic dermatitis (AD) is a multifactorial genetically determined inflammatory skin disease characterized by itching, chronic course, age-related features of localization and lesion morphology. Atopic dermatitis is caused by complex interactions between genetic, immunological, and environmental factors. The barrier function of the skin is impaired in atopic dermatitis. Antimicrobial peptides, e.g., LL-37, β -defensins are involved in maintaining the skin barrier function (especially, intercellular contacts). An imbalance of antimicrobial peptides may cause different disorders, including allergic pathologies. The aim of this study is to investigate gene expression profile of the *HBD1* and *LL37* encoding antimicrobial peptides in the samples of skin and blood mononuclear cells obtained from the children with moderate and severe atopic dermatitis before and after treatment. By means of real-time polymerase chain reaction, the levels of *HBD1* and *LL37* gene expression were evaluated in the samples. Statistical analysis showed significantly increased ($p \leq 0.017$) expression levels of both *HBD1* (H-test = 24.76; 2, $n = 72$; $p = 0.00001$), and *LL37* genes (H-test = 15.69; 2, $n = 72$; $p = 0.00039$) in blood cells of AD patients compared to the control group, as well as decreased ($p \leq 0.05$) levels of *HBD1* expression in the affected skin compared to the control group. Our data on the cathelicidin gene in the skin do not differ from the literature data, since its expression is reduced in AD. In our series, an increase of the gene expression was revealed in PBMCs. The HBD1 peptide is expressed in both monocytes and macrophages, representing a link between innate and adaptive immunity. In our study, the expression of the *HBD1* gene was increased only in blood, thus suggesting activation of innate immunity components at the systemic level in response to inflammation. Of importance, understanding the role of immunological markers in AD will help to develop novel prognostic approaches in management of the patients with atopic disorders. Therefore, one should understand pathogenetic mechanisms of allergic diseases.

Keywords: atopic dermatitis, antimicrobial peptides, cathelicidin, human β -defensin 1, innate immunity, gene expression

Введение

Атопический дерматит (АтД) — генетически детерминированное воспалительное заболевание кожи, характеризующееся зудом, хроническим рецидивирующим течением, возрастными особенностями локализации и морфологии очагов поражения [1]. Дебют заболевания, как правило, приходится на детский возраст. Распространенность АтД среди детского населения достигает 20%, среди взрослого населения — 8%.

АтД принадлежит к группе заболеваний, которые, как полагают, возникают в результате

сложных взаимодействий между генетическими, иммунологическими факторами и факторами окружающей среды. Наследственность играет важную роль в развитии заболевания. Происходит также нарушение иммунного ответа (чаще всего баланс сдвигается в сторону Th2-ответа). Также повышается уровень IgE, наблюдается инфильтрация Т-клеток в коже [6]. Помимо генетических факторов, также определенную роль в развитии и поддержании заболевания играют эпигенетические механизмы. Нарушается и барьерная функция эпидермиса, что приводит

к проникновению различных факторов окружающей среды (т. е. микроорганизмов, раздражителей, аллергенов, загрязняющих агентов); снижается способность кожи удерживать воду. Повышение уровня рН, нарушение барьерной функции и снижение уровня противомикробных пептидов вкупе способствуют дисбиозу кожи, возникновению кожных инфекций [8]. К первой линии защиты от патогенов относятся противомикробные пептиды. Это структуры врожденного иммунитета, обладающие антимикробной активностью. Дисбаланс противомикробных пептидов приводит к развитию различных заболеваний [2, 5], в том числе и аллергических. Противомикробные пептиды типа LL-37, β -дефенсины участвуют в поддержании барьерной функции кожи (в частности межклеточных контактов) [7].

Целью этой работы является изучение экспрессионного профиля генов противомикробных пептидов *HBD1* и *LL37* в кератиноцитах кожи и мононуклеарных клетках крови при среднетяжелом и тяжелом течении атопического дерматита у детей в динамике.

Материалы и методы

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» (протокол заседания локального совета по этике № 5 от 12 мая 2022 г.). Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Из ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России был получен клинический материал от 53 пациентов обоих полов от 6 до 18 лет с диагнозом L.20 «Атопический дерматит» среднетяжелой (SCORAD 25-50) и тяжелой (SCORAD \geq 50) степени. 48 пациентов получали топическую терапию (МГК средней и высокой активности, топические ингибиторы кальциневрина); 5 пациентов проходили системную терапию с применением препарата дупилумаба. Материалом для исследований послужили биопсии пораженных участков кожи и образцы цельной крови (пробирки с ЭДТА), из которых впоследствии выделялись мононуклеарные клетки крови (МНК). При анализе уровней экспрессии генов в образцах крови в группу «до лечения» вошли 36 пациентов, в группу «после лечения» – 22 пациента; группу сравнения («контроль») составили 17 здоровых доноров; при анализе экспрессии генов в коже

группу пациентов «до лечения» составили 9 пациентов (повторную биопсию не брали), а группу сравнения – 9 здоровых волонтеров.

Из части биопсийного материала и МНК последовательно была выделена РНК (Extract RNA, Евроген, Россия), проведена реакция обратной транскрипции («ОТ-1», «Синтол», Россия). Методом ПЦР-РВ были определены уровни экспрессии генов *LL37* и *HBD1*. В реакции использовались специфические последовательности праймеров («Синтол», Россия), которые подбирались с помощью программы Primer-BLAST (NCBI). ПЦР-анализ в режиме реального времени проводился на приборе Rotor-Gene Q (QIAGEN Hiden, Германия). Реакция проводилась при следующих условиях: 1) 95 °С – 5 мин – 1 цикл; 2) 95 °С – 15 сек, 60 °С (или 58 °С) – 50 сек – 40 циклов. Обработка полученных данных (Ct) проводилась методом $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ относительно уровня экспрессии гена домашнего хозяйства β -актина (*ACTB*).

Анализ полученных данных, представленных в относительных единицах, проводился в несколько этапов в программе MS Excel. Статистическая достоверность между группами данных рассчитывалась при помощи непараметрического U-критерия Манна–Уитни, а также Н-теста Краскела–Уоллиса.

Результаты и обсуждение

Так, на рисунках 1 и 2 представлены уровни экспрессии гена *LL37* у больных с АТД по сравнению со здоровым контролем в крови и коже. Как видно из графиков, экспрессия *LL37* снижена у пациентов с АТД на локальном уровне: медианные значения составляют 0,5 и 1 в группе пациентов и здоровых доноров соответственно ($p \leq 0,05$). В крови, напротив, наблюдается повышение уровня экспрессии этого показателя как до терапии, так и после нее по сравнению с контролем (Н-критерий = 15,69; 2, $n = 72$; $p = 0,00039$). Медианы равны 9, 7,6, 0,3 в группах до лечения, после лечения и в контрольной группе соответственно.

Для гена *HBD1* локально в коже разницы между группой пациентов и контрольной группой выявлено не было. Однако в крови его экспрессия значительно отличалась и имела тенденцию к снижению после лечения. На рисунке 3 представлены уровни экспрессии гена *HBD1* в крови. Как показано на графике, экспрессия *HBD1* повышалась в крови по сравнению с контролем (Н-критерий = 24,76; 2, $n = 72$; $p = 0,00001$). Медианы равны 127, 18, 1 в группах до лечения, после лечения и в контрольной группе соответственно.

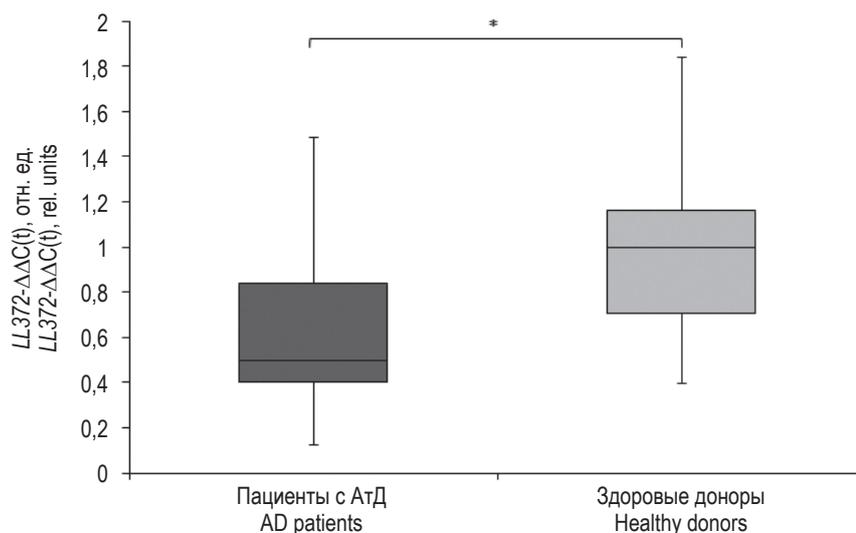


Рисунок 1. Уровень экспрессии гена *LL37* в коже пациентов с АтД по сравнению с контролем

Примечание. * – $p \leq 0,05$.

Figure 1. *LL37* gene expression level in the skin of AD patients compared to the control group

Note. *, $p \leq 0.05$.

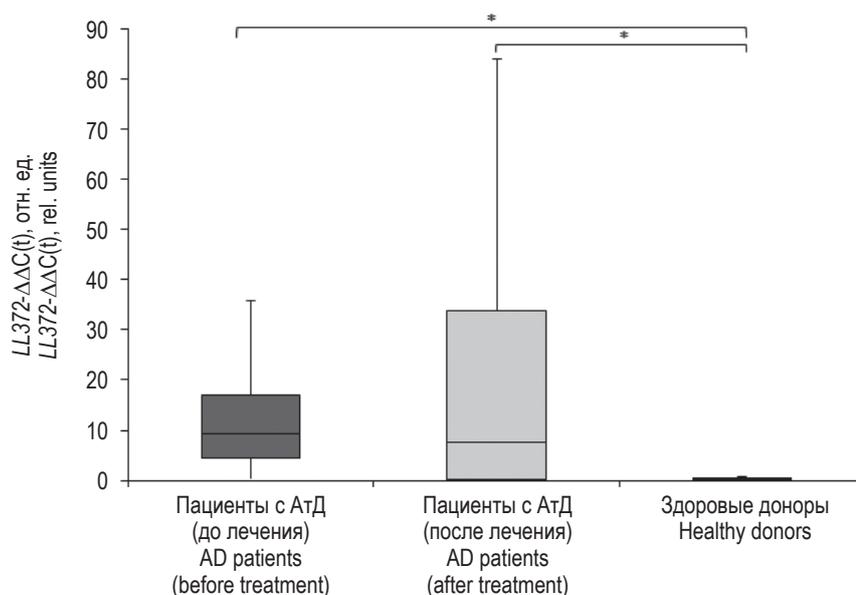


Рисунок 2. Уровень экспрессии гена *LL37* в крови пациентов с АтД по сравнению с контролем

Примечание. * – $p \leq 0,017$.

Figure 2. *LL37* gene expression level in the blood of AD patients compared to the control group

Note. *, $p \leq 0.017$.

Известно, что *LL37* стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов. Однако существуют данные, что при развитии АтД его экспрессия может быть снижена [7]. Наши данные по гену кателицидина в коже не расходятся с примерами из литературы, поскольку его экспрессия в случае АтД снижена. В другом исследовании было показано, что влияние кателицидина в крови на Т-клетки снижало их пролиферативную актив-

ность и увеличивало количество Т-регуляторных клеток [3]. В нашем случае имеет место повышение экспрессии этого гена в МНК. В настоящий момент недостаточно данных по поводу функционального значения этого пептида в крови при АтД, поэтому предстоит выяснить, в чем заключается подобное повышение этого показателя.

В отношении пептида *HBD1* можно сказать, что он экспрессируется как в моноцитах, так и в

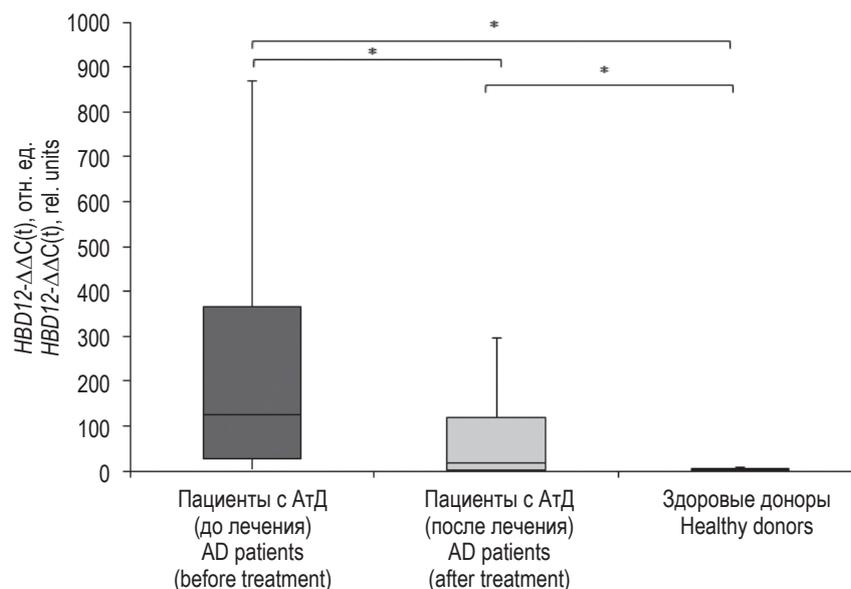


Рисунок 3. Уровень экспрессии гена *HBD1* в крови пациентов с АтД по сравнению с контролем

Примечание. * – $p \leq 0,017$.

Figure 3. *HBD1* gene expression level in the blood of AD patients compared to the control group

Note. *, $p \leq 0.017$.

макрофагах и является, таким образом, связующим звеном между врожденным и приобретенным иммунитетом [4]. Исследований *HBD1* при АтД значительно меньше (например, по сравнению с *HBD2* и *HBD3*). В нашем исследовании экспрессия гена *HBD1* повышалась только в крови, что свидетельствует об активации структур врожденного иммунитета на системном уровне в ответ на воспаление.

Заключение

Выявление роли иммунологических маркеров в течении АтД позволит создать новые про-

гностические подходы при ведении пациентов с атопической патологией. Поэтому важно иметь полное представление о патогенетических механизмах аллергического заболевания.

Благодарности

Выражаем благодарность Центру коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова», Москва, Россия. Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

Список литературы / References

1. Мурашкин Н.Н., Амбарчян Э.Т., Материкин А.И., Епишев Р.В. Роль нарушений эпидермального барьера при атопическом дерматите: современные концепции патогенеза заболевания // Вопросы современной педиатрии, 2018. Т. 17, № 1. С. 85-88. [Murashkin N.N., Ambarchian E.T., Materikin A.I., Epishev R.V. The role of epidermal barrier impairments in atopic dermatitis: modern concepts of disease pathogenesis. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2018, Vol. 17, no. 1, pp. 85-88. (In Russ.)]
2. Свитич О.А., Ганковская Л.В., Рахманова И.В., Зайцева И.А., Ганковский В.А. Ассоциация полиморфных маркеров, локализованных в 5'-нетранслируемой области гена *Defb1*, с гипертрофией аденоидных вегетаций // Вестник Российского государственного медицинского университета, 2012. Т. 3. С. 59-62. [Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Rakhmanova I.V., Zaytseva I.A., Gankovskiy V.A. The association of polymorphic markers in the 5'-untranslated region of the *DEFB1* gene with adenoid hypertrophy vegetations. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Russian State Medical University*, 2012, Vol. 3, pp. 59-62. (In Russ.)]
3. Alexandre-Ramos D.S., Silva-Carvalho A.É., Lacerda M.G., Serejo T.R.T., Franco O.L., Pereira R.W., Carvalho J.L., Neves F., Saldanha-Araujo F. LL-37 treatment on human peripheral blood mononuclear cells modulates immune response and promotes regulatory T-cells generation. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, Vol. 108, pp. 1584-1590.

4. Chieosilapatham P, Ogawa H., Niyonsaba F. Current insights into the role of human β -defensins in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2017, Vol. 190, no. 2, pp. 155-166.
5. Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Gankovskaya O.A., Lavrov V.F. Herpes simplex virus: treatment with antimicrobial peptides. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007, no. 601, pp. 369-376.
6. Luger T., Adaskevich U., Anfilova M., Dou X., Murashkin N.N., Namazova-Baranova L., et al. Practical algorithm to inform clinical decision-making in the topical treatment of atopic dermatitis. *J. Dermatol.*, 2021, Vol. 48, no. 8, pp. 1139-1148.
7. Reinholz M., Ruzicka T., Schaubert J. Cathelicidin LL-37: An Antimicrobial Peptide with a Role in Inflammatory Skin Disease. *Ann. Dermatol.*, 2012, Vol. 24, no. 2, 126. doi: 10.5021/ad.2012.24.2.126.
8. Weidinger S., Beck L.A., Bieber T., Kabashima K., Irvine A.D. Atopic dermatitis. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2018, Vol. 4, 1. doi: 10.1038/s41572-018-0001-z.

Авторы:

Быстрицкая Е.П. — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Мурашкин Н.Н. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующий отделением дерматологии с группой лазерной хирургии, заведующий лабораторией патологии кожи у детей отдела научных исследований в педиатрии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Материкин А.И. — к.м.н., врач-дерматовенеролог отделения дерматологии с группой лазерной хирургии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ Москва, Российская Федерация

Наумова Е.А. — научный сотрудник кафедры генетики, биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Яковлева И.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных гибридов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Вартанова Н.О. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории условно-патогенных бактерий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Authors:

Bystritskaya E.P., Postgraduate Student, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Murashkin N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Research Associate, Head, Department of Dermatology, Head, Laboratory of Skin Pathology in Children, Federal Medical Research Center for Children's Health; Professor, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Materikin A.I., PhD (Medicine), Dermatovenereologist, Department of Dermatology, Federal Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Naumova E.A., Research Associate, Department of Genetics, Faculty of Biology, M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Yakovleva I.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cells Hybridomas, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Vartanova N.O., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Microbiology of Opportunistic Bacteria, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 15.07.2022

Отправлена на доработку 20.07.2022

Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022

Revision received 20.07.2022

Accepted 28.07.2022

ПОВЫШЕНИЕ НЕЙРЕГУЛИНА-4 В КРОВИ СВЯЗАНО С СД 2-го ТИПА И ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ У БОЛЬНЫХ ОЖИРЕНИЕМ

Вульф М.А.¹, Сафиуллина Л.А.¹, Газатова Н.Д.¹, Кузнецов Г.Л.²,
Комар А.А.¹, Кириенкова Е.В.¹, Литвинова Л.С.¹

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

² ГБУЗ КО «Областная клиническая больница», г. Калининград, Россия

Резюме. Ожирение и сахарный диабет 2-го типа (СД 2 типа) являются мировыми эпидемиями современного человечества и серьезной проблемой общественного здравоохранения. Повышение числа людей, страдающих ожирением, увеличивает у них риск формирования сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), некоторых видов рака. В развитии патологий, сопряженных с метаболической дисфункцией (в частности, СД 2-го типа, ожирение, гипертоническая болезнь), значительную роль отводят сигнальному пути ErbB. Нейрегулин-4 (NRG4) – новый адипокин с действием, аналогичным адипонектину. Взаимодействие между рецепторами – ErbB3, ErbB4 и их лигандом – NRG4 запускает процессы, необходимые для поддержания энергетического гомеостаза в клетке.

Данные мировой литературы относительно уровней NRG4 в циркуляции, неоднозначны. В частности, информация, описывающая функции / механизм действия NRG4 получена с использованием модельных животных и на клеточных линиях, что не всегда находит отражение в масштабе организма человека. По мнению некоторых авторов, печень может являться ключевым органом-мишенью для NRG4.

Статья посвящена оценке взаимосвязей уровня NRG4 в крови с параметрами углеводного и липидного обменов, а также с наличием заболеваний, ассоциированных с ожирением. В исследование были включены больные ожирением с СД 2-го типа и без него. Содержание NRG4, показателей углеводного и липидного обменов в крови оценивали с помощью иммуноферментного анализа и биохимических методов, соответственно.

Выявлено, что уровень NRG4 был повышен у больных ожирением с СД 2-го типа относительно здоровых доноров и больных ожирением без СД 2-го типа. Методами корреляционного и регрессионного анализов обнаружены многочисленные взаимосвязи NRG4 с показателем липидного и углеводного обменов, а также выявлены ассоциации этого анализита с наличием сопутствующих ожирению патологий (СД 2-го типа и ГБ).

Таким образом, NRG4 вовлечен в формирование дислипидемии у больных ожирением. Рост уровня NRG4 в крови у больных ожирением с СД 2-го типа мы рассматриваем как компенсаторную реакцию в ответ на усиление липогенеза, опосредованного действием инсулина.

Адрес для переписки:

Литвинова Лариса Сергеевна
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта»
236029, Россия, г. Калининград, ул. Гайдара, 6.
Тел.: 8 (4012) 59-55-95 (доб. 6134).
E-mail: larisalitinova@yandex.ru

Address for correspondence:

Litvinova Larisa S.
I. Kant Baltic Federal University
236029, Russian Federation, Kaliningrad, Gaidar str., 6.
Phone: 7 (4012) 59-55-95 (acc. 6134).
E-mail: larisalitinova@yandex.ru

Образец цитирования:

М.А. Вульф, Л.А. Сафиуллина, Н.Д. Газатова,
Г.Л. Кузнецов, А.А. Комар, Е.В. Кириенкова,
Л.С. Литвинова «Повышение нейрегулина-4 в крови
связано с СД 2-го типа и гипертонической болезнью у
больных ожирением» // Российский иммунологический
журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 411-418.
doi: 10.46235/1028-7221-1207-IOB

© Вульф М.А. и соавт., 2022

For citation:

M.A. Vulf, L.A. Safiullina, N.D. Gazatova, G.L. Kuznetsov,
A.A. Komar, E.V. Kirienkova, L.S. Litvinova "Increase of
blood neuregulin 4 is associated with type 2 diabetes
mellitus and hypertension in obese patients", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,
Vol. 25, no. 4, pp. 411-418.
doi: 10.46235/1028-7221-1207-IOB

DOI: 10.46235/1028-7221-1207-IOB

Полученные данные имеют важное значение для поиска новых точек воздействия на патогенез заболеваний, сопряженных с нарушением метаболизма. Нейрегулин-4 и его рецепторы могут являться перспективными мишенями для лечения социально-значимых патологий.

Ключевые слова: ожирение, СД 2-го типа, нейрегулин-4, гипертоническая болезнь, ERBB сигнальный путь

INCREASE OF BLOOD NEUREGULIN 4 IS ASSOCIATED WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND HYPERTENSION IN OBESE PATIENTS

Vulf M.A.^a, Safiullina L.A.^a, Gazatova N.D.^a, Kuznetsov G.L.^b,
Komar A.A.^a, Kirienkova E.V.^a, Litvinova L.S.^a

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

^b Regional Clinical Hospital, Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. Obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) are global epidemics at the present time, being a serious public health issue. An increased prevalence in the number of obese people promotes a risk for developing cardiovascular diseases (CVD) and some types of cancer. The ErbB signaling pathway plays a significant role in development of the disorders associated with metabolic dysfunction (e.g., T2DM, obesity, arterial hypertension). Neuregulin 4 (NRG4) is a new adipokine with similar effects to adiponectin. Interaction between the ErbB3, ErbB4 receptors and their ligand, NRG4, launches the processes required to maintain the energy balance in the cells. There are controversial literature data on NRG4 levels in blood circulation. In particular, the existing data concerning functions / mechanism of NRG4 action has been obtained in experimental animals and cell lines, which is not always reproducible in humans. According to some works, liver may be the key target organ for NRG4. The present article is devoted to assessment of relationships between the NRG4 level in blood, and the parameters of carbohydrate and lipid metabolism, as well as presence of diseases associated with obesity. The study included obese patients with and without type 2 diabetes. The content of NRG4, indices of carbohydrate and lipid metabolism in the blood was assessed by means of enzyme immunoassay and biochemical techniques, respectively. It was found that the level of NRG4 was increased in obese patients with T2DM compared with healthy donors, and obese patients without T2DM. Statistical evaluation by correlation and regression analysis revealed numerous relationships between NRG4 and the parameters of lipid and carbohydrate metabolism, as well as some correlations between the NRG4 levels and clinical disorders associated with obesity (type 2 diabetes and arterial hypertension). Thus, NRG4 may be involved into the development of dyslipidemia in obese patients. We consider an increase of blood NRG4 levels in obese patients with type 2 diabetes as a compensatory response to the increased insulin-mediated lipogenesis. The data obtained are important in search for new points of influence upon pathogenesis of diseases associated with metabolic disorders. Neuroregulin 4 and its receptors may be promising targets for the treatment of socially significant clinical disorders.

Keywords: obesity, diabetes mellitus type 2, neuregulin 4, arterial hypertension, ERBB signal pathway

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам президента РФ № МК-2072.2022.3, Государственного задания № FZWM2020-0010 и Программы стратегического академического лидерства Балтийского федерального университета им. И. Канта (ПРИОРИТЕТ 2030).

Введение

Люди, страдающие ожирением, подвержены высокому риску развития сахарного диабета (СД

2-го типа), сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) и др. Наличие данных патологий значительно снижает качество и продолжительность жизни.

Нейрегулины представляют собой группу факторов роста, осуществляющих передачу сигналов через рецепторные тирозин-протеинкиназы / рецепторы человеческого эпидермального фактора роста (ErB/HER) – ErbB3 и ErbB4 и регулируют разнообразные биологические процессы (регене-

рацию, воспаление, аутофагию, апоптоз и др.) [1]. Нейрегулин-4 (NRG4) экспрессируется в ткани печени, легких, поджелудочной железы и, наиболее активно, в жировой ткани [6]. Установлено, что чрезмерная активация сигнального пути ErbB запускает процессы, имеющие непосредственное отношение к патогенезу заболеваний, связанных с нарушением метаболизма (ожирение, СД 2-го типа, НАЖБП), способствуя дисрегуляции углеводного и липидного обменов [6]. Однако данные, представленные в мировой литературе относительно содержания NRG4 в крови при различных заболеваниях, весьма противоречивы. Так, значительное снижение уровня NRG4 в крови обнаружено у детей и взрослых с ожирением, у пациентов с впервые диагностированным СД 2 типа [2, 12, 13]. Напротив, другие авторы не выявили изменений NRG4 в крови у больных НАЖБП [5]. В связи с вышесказанным, целью исследования явилась оценка содержания NRG4 в крови больных ожирением с СД 2-го типа и без него, с последующей оценкой взаимосвязей NRG4 с показателями углеводного и липидного обменов и наличием сопутствующих заболеваний.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 89 человек. Из них: 34 пациента с ожирением без СД 2-го типа (ИМТ = $41,5 \pm 6,5$ кг/м² 26 женщин, 8 мужчин, возраст 39 ± 2 лет); 34 пациента с ожирением с СД 2-го типа (ИМТ = $47,1 \pm 8,7$ кг/м² 25 женщин, 9 мужчин, возраст 46 ± 8 лет) и 21 условно здоровый донор (ИМТ = $22,5 \pm 2,6$ кг/м², 8 женщин, 13 мужчин, возраст 36 ± 9 лет). Взятие образцов крови осуществлялось утром натощак.

Наличие ожирения, СД 2-го типа и гипертонической болезни устанавливали на основании детального клинико-инструментального обследования в специализированном стационаре, руководствуясь критериями Всемирной организации здравоохранения (1999–2013). Пациенты с СД 2-го типа принимали метформин в дозе 500–1500 мг в сутки и не получали инсулинотерапию. Информированное согласие было подписано всеми пациентами. Верификацию диагноза и набор пациентов в группы исследования проводили в Областной клинической больнице г. Калининграда. Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации. Протокол исследования был утвержден Локальным этическим комитетом Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта (протокол № 1 БФУ им. И. Канта от 28 февраля 2019 г.). Анализ показателей углеводного и липидного обменов в сыворотке крови проводили

на автоматическом биохимическом анализаторе Furuno CA-180 (Furuno Electric Company, Япония) с использованием тест-систем DiaSys (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Germany). Содержание NRG 4 в плазме крови определяли на автоматическом иммуноферментном анализаторе Lasurit (Dynerx Technologies, Шантильи, Вирджиния, США) с использованием набора ИФА (Cloud-Clone Corp., Китай). Расчет коэффициента атерогенности (КА) проводили по формуле: $КА = (\text{общий холестерин} - \text{ЛПВП}) / \text{ЛПВП}$, референтные значения 2–3 усл. ед.

Статистическую обработку результатов осуществляли в программе GraphPad Prism 9.4.1. (GraphPad Software, США). Идентификацию выбросов проводили с использованием метода ROUT ($Q = 1\%$). Нормальность распределения количественных показателей определяли с помощью тестов Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. Гипотеза о равенстве средних значений выборки была проверена с помощью t-критериев Стьюдента. Очищенные от выбросов данные анализировали на наличие достоверных различий с использованием непараметрического теста Краскела–Уоллиса. Для выявления статистически значимых различий между группами был проведен попарный анализ с применением непараметрического теста Манна–Уитни для независимых групп. Корреляционные связи между изучаемыми показателями определяли с помощью корреляционного анализа Спирмена. Достоверными считали различия при уровне $p < 0,05$. Линейная регрессия была рассчитана методом наименьших квадратов. Для визуализации данных использовали программу GraphPad Prism 9.4.

Результаты и обсуждение

Уровень глюкозы и ГГТ в сыворотке крови у пациентов с ожирением и СД 2-го типа был повышен по сравнению с аналогичными показателями условно здоровых доноров и пациентов с ожирением без СД 2-го типа (табл. 1).

Значения АпоВ, ЛПНП, КА у всех пациентов с ожирением были выше относительно показателей группы условно здоровых доноров. Напротив, уровень ЛПВП у больных ожирением с СД 2-го типа был ниже аналогичных значений больных ожирением без СД 2-го типа и здоровых доноров. Сывороточное содержание свободных жирных кислот (СЖК) и прямого билирубина значимо не отличались у пациентов исследуемых групп.

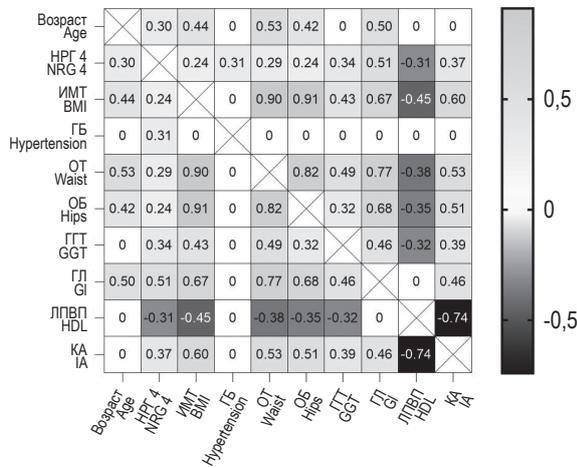
У больных ожирением с СД 2-го типа концентрация NRG4 в крови была достоверно выше в

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКИЕ И ЛАБОРАТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

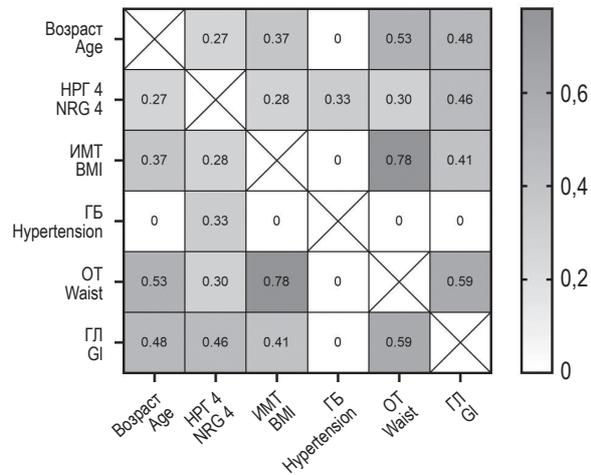
TABLE 1. CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF THE STUDY GROUPS

Показатели Indicators		Условно здоровые доноры (1) Healthy donors (1) n = 21	Больные ожирением без СД 2-го типа (2) Obese patients without type 2 diabetes (2) n = 34	Больные ожирением с СД 2-го типа (3) Obese patients with type 2 diabetes (3) n = 34
ИМТ, кг/м ² BMI, kg/m ²		22,5±2,6	41,5±6,5	47,1±8,7
Возраст, лет Age, years		36±9	39±2	46±8
Пол Sex	мужчины men	13	8	9
	женщины women	8	26	25
Наличие СД 2-го типа Type 2 diabetes		0	0	34
Наличие ГБ Hypertension		0	10	24
Обхват талии, см Waist, cm		71,0±9,1	114,7±14,9 p ₁₋₂ = 0,001	130,00±15,35 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,013
Обхват бедер, см Hips, cm		93,0±9,2	127,00±10,71 p ₁₋₂ = 0,001	138,00±16,09 p ₁₋₃ = 0,001
ЛПВП, ммоль/л HDL, mmol/L		2,38±0,16	1,39±0,50	1,30±0,79 p ₁₋₃ = 0,046
ЛПНП, ммоль/л LDL, mmol/L		1,55±0,10	3,43±0,76 p ₁₋₂ = 0,002	3,02±0,77 p ₁₋₃ = 0,044
КА, усл. ед. IA, units		1,89±0,62	3,40±1,13 p ₁₋₂ = 0,001	3,70±1,55 p ₁₋₃ < 0,001
АpoB, мг/дл ApoB, mg/dL		79,36±4,70	112,8±27,4 p ₁₋₂ = 0,019	118,00±19,29 p ₁₋₃ < 0,001
СЖК, ммоль/л FFA, mmol/L		0,56±0,22	0,66±0,25	0,83±0,47
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L		4,57±0,32	4,7±0,7	5,41±0,95 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001
Прямой билирубин, мкмоль/л Direct bilirubin, μmol/l		4,06±0,80	2,90±1,10	2,75±1,30
ГГТ, ед/л GGT, units/L		22,3±4,2	42,63±20,80	44,69±26,80 p ₁₋₃ < 0,018
NRG4, пг/мл NRG 4, pg/mL		91,26 (77,22-115,80)	91,26 (75,47-121,10)	119,30 (98,28-152,70) p ₁₋₃ < 0,02 p ₂₋₃ < 0,007

А (A)



Б (B)



В (C)

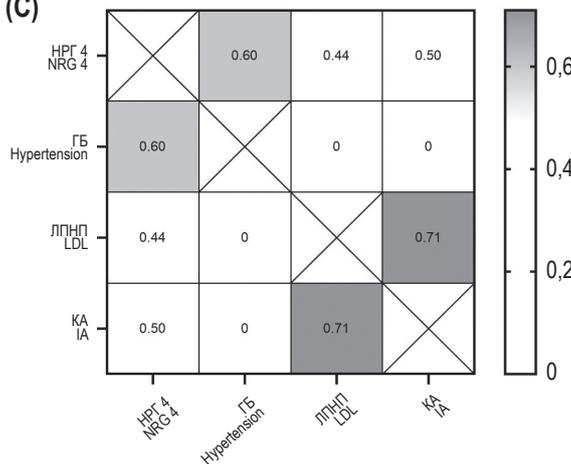


Рисунок 1. Корреляционные взаимосвязи NRG4 с антропометрическими и биохимическими показателями у пациентов исследуемых групп

Примечание. А – все исследуемые группы; Б – пациенты с ожирением независимо от состояния углеводного обмена; В – больные ожирением с СД 2-го типа. Представленные данные имеют значимость $p < 0,05$.

Figure 1. Correlations of NRG4 with anthropometric and biochemical parameters in patients of the studied groups

Note. (A) all study groups. (B) patients with obesity, regardless of the state of carbohydrate metabolism. (C) obese patients with type 2 diabetes. The data presented have a $p < 0.05$ significance.

сравнении с пациентами без СД 2-го типа и параметрами здоровых лиц.

Корреляционный анализ позволил выявить многочисленные взаимосвязи NRG4 с показателя углеводного и липидного обменов, антропометрическими данными, а также с наличием патологий, ассоциированных с ожирением – ГБ, СД 2-го типа (рис. 1).

В результате регрессионного анализа было обнаружено, что у больных ожирением без СД 2-го типа прямой билирубин, АроВ и СЖК были взаи-

мосвязаны с NRG4 ($R = 0,31, p = 0,037$; $R = 0,40, p = 0,014$; $R = 0,40, p = 0,015$).

У больных СД 2-го типа КА и наличие ГБ были ассоциированы с уровнем NRG4 в плазме крови ($R = 0,24, p = 0,023$; $R = 0,22, p = 0,007$ соответственно). Следует отметить, что у всех больных ожирением уровень глюкозы, наличие СД 2-го типа, ГБ были взаимосвязаны с содержанием NRG4 в плазме крови ($R = 0,14, p = 0,003$; $R = 0,14, p = 0,003$; $R = 0,11, p = 0,003$ соответственно).

Ожирение является результатом дисбаланса между потреблением энергии и ее расходом, что приводит к избыточному накоплению жировой ткани [11]. Увеличение жировых отложений связано с развитием СД 2-го типа, гипертонией, дислипидемией и НАЖБП, которые способствуют развитию сердечно-сосудистых патологий. В последние годы доказано, что жировая ткань – центральный эндокринный орган, играющий ключевую роль в регуляции энергетического гомеостаза [9].

Нарушение углеводного и липидного обмена было характерно, в большей степени, для больных ожирением с СД 2-го типа. В то же время увеличение ИМТ у всех больных ожирением имело положительную ассоциацию с уровнем глюкозы ($r = 0,67, p < 0,05$), КА ($r = 0,60, p < 0,05$) и отрицательную – с ЛПВП ($r = -0,45, p < 0,05$). Согласно результатам корреляционного и регрессионного анализов, повышение уровня NRG4 в крови у больных ожирением связано с наличием СД 2-го типа и ГБ.

На азиатской популяции было показано, что уровень NRG4 значительно снижен у больных метаболическим синдромом с СД 2-го типа относительно лиц без СД 2-го типа [13]. Выявлено, что содержание NRG4 у больных ожирением и НАЖБП ниже, чем у лиц без НАЖБП [4]. Известно, что СД 2-го типа и НАЖБП – взаимосвязанные патологии, до 75% лиц с СД 2-го типа имеют НАЖБП [10]. В другой работе, напротив, у пациентов с СД 2-го типа обнаружено повышение содержания NRG4 в циркуляции, которое положительно коррелировало с уровнем глюкозы, триглицеридов и индексом НОМА-IR [7], что частично согласуется с результатами нашей работы.

Исследования на мышцах с делецией гена NRG4 в жировой ткани продемонстрировали, что недостаточная экспрессия NRG4 может быть вовлечена в патогенез НАЖБП. Также экспери-

ментально доказано, что NRG4 способен снижать липогенез *de novo* в печени [8], активировать β -окисление жирных кислот в митохондриях и кетогенез [3]. NRG4 передает свои сигналы через активацию рецепторов ErbB4 и ErbB3; по этой причине печень может являться ключевым органом-мишенью для NRG4. Отмечено, что жировая ткань экспрессирует низкие уровни рецепторов ErbB3 и ErbB4.

У больных ожирением с СД 2-го типа наличие положительных корреляционных взаимосвязей NRG4 с ЛПНП ($r = 0,44, p < 0,05$) и КА ($r = 0,50, p < 0,05$) может свидетельствовать о его вкладе в развитие гиперлипидемии/дислипидемии. Более того, регрессионный анализ выявил зависимость КА от уровня NRG4 ($R = 0,24, p = 0,023$) у данной категории пациентов. В работе Yan P. (2018) у больных СД 2-го типа были обнаружены положительные корреляции NRG4 с ЛПВП и апоА, отрицательные с ТГ [13]. Наше исследование, напротив, выявило негативные взаимосвязи NRG4 с ЛПВП ($r = -0,31, p < 0,05$) и КА ($r = -0,37, p < 0,05$) у всех больных ожирением. Учитывая экспериментальные данные, полученные другими группами, мы предполагаем, что повышение NRG4 в плазме крови у больных ожирением с СД 2-го типа можно рассматривать в качестве компенсаторной реакции в ответ на усиление липогенеза, опосредованного действием инсулина.

Выводы

Таким образом, NRG4 способен регулировать метаболизм глюкозы и липидов у больных ожирением. NRG4 следует рассматривать как маркер СД 2-го типа и гипертонической болезни. В будущих исследованиях планируется расширить выборку лиц, включенных в исследование, выявить особенности тканеспецифической экспрессии гена рецептора ERBB4 и NRG4, его сплайсинговые изоформы.

Список литературы / References

1. Blüher M. Neuregulin 4: A “Hotline” between brown fat and liver. *Obesity*, 2019, Vol. 27, no. 10, pp. 1555-1557.
2. Cai C., Lin M., Xu Y., Li X., Yang S., Zhang H. Association of circulating neuregulin 4 with metabolic syndrome in obese adults: a cross-sectional study. *BMC Med.*, 2016, Vol. 24, no. 14, 165. doi: 10.1186/s12916-016-0703-6.
3. Chen Z., Wang G.X., Ma S.L., Jung D.Y., Ha H., Altamimi T., Zhao X.Y., Guo L., Zhang P., Hu C.R., Cheng J.X., Lopaschuk G.D., Kim J.K., Lin J.D. Nrg4 promotes fuel oxidation and a healthy adipokine profile to ameliorate diet-induced metabolic disorders. *Mol. Metab.*, 2017, Vol. 6, no. 8, pp. 863-872.
4. Dai Y.N., Zhu J.Z., Fang Z.Y., Zhao D.J., Wan X.Y., Zhu H.T., Yu C.H., Li Y.M. A case-control study: Association between serum neuregulin 4 level and non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 2015, Vol. 64 no. 12, pp. 1667-1673.
5. de Munck T.J.I., Boesch M., Verhaegh P., Masclee A.A.M., Jonkers D., van Pelt J.F., du Plessis J., Korf H., Nevens F., Koek G.H., van der Merwe S., Verbeek J. Is there a role for neuregulin 4 in human nonalcoholic fatty liver disease? *PLoS One*, 2021 Vol. 14 no. 16, e0251822. doi: 10.1371/journal.pone.0251822.

6. Gumà A., Díaz-Sáez F., Camps M., Zorzano A. Neuregulin, an effector on mitochondria metabolism that preserves insulin sensitivity. *Front. Physiol.*, 2020, Vol. 11, 696. doi: 10.3389/fphys.2020.00696.
7. Kang Y.E., Kim J.M., Choung S., Joung K.H., Lee J.H., Kim H.J., Ku B.J. Comparison of serum Neuregulin 4 (Nrg4) levels in adults with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus and controls without diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2016, Vol. 117, pp. 1-3.
8. Ma Y., Gao M., Liu D. Preventing high fat diet-induced obesity and improving insulin sensitivity through neuregulin 4 gene transfer. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 26242. doi: 10.1038/srep26242.
9. Tayebi S.M., Ghanbari-Niaki A., Saeidi A., Hackney A.C. Exercise training, neuregulin 4 and obesity. *Ann. Appl. Sport Sci.*, 2017, Vol. 5. no. 2, pp. 1-2.
10. Tomah S., Alkhouri N., Hamdy O. Nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: where do Diabetologists stand? *Clin. Diabetes Endocrinol.*, 2020, Vol. 6, 9. doi: 10.1186/s40842-020-00097-1.
11. Tutunchi H., Ostadrahimi A., Hosseinzadeh-Attar M.J., Miryan M., Mobasseri M., Ebrahimi-Mameghani M. A systematic review of the association of neuregulin 4, a brown fat-enriched secreted factor, with obesity and related metabolic disturbances. *Obes. Rev.*, 2020, Vol. 21, no. 2, e12952. doi: 10.1111/obr.12952.
12. Wang R., Yang F., Qing L., Huang R., Liu Q., Li X. Decreased serum neuregulin 4 levels associated with non-alcoholic fatty liver disease in children with obesity. *Clin. Obes.*, 2019, Vol. 9, no. 1, 12289. doi: 10.1111/cob.12289.
13. Yan P., Xu Y., Wan Q., Feng J., Li H., Yang J., Zhong H., Zhang Z. Plasma Neuregulin 4 levels are associated with metabolic syndrome in patients newly diagnosed with Type 2 diabetes mellitus. *Dis. Markers*, 2018, Vol. 2018, e6974191. doi: 10.1155/2018/6974191.

Авторы:

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

Сафиуллина Л.А. — аспирант ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Газатова Н.Д. — к.б.н., заведующая лабораторией экспериментальных исследований препаратов крови ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Кузнецов Г.Л. — к.м.н., заведующий вторым хирургическим отделением ГБУЗ КО «Областная клиническая больница», г. Калининград, Россия

Authors:

Vulf M.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnologies, I Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Safiullina L.A., Postgraduate Student, I Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Gizatova, N.D., PhD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Blood Preparation Studies, I Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Kuznetsov G.L., PhD (Medicine), Head, Second Surgical Department, Regional Clinical Hospital, Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russian Federation

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

Кириенкова Е.В. — д.м.н., научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

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

Komar A.A., Engineer, Center of Immunology and Cell Biotechnologies, I Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Kirienkova E.V., PhD, MD (Medicine), Research Associate, Center of Immunology and Cell Biotechnologies, I Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Litvinova L.S., PhD, MD (Medicine), Head, Centre of Immunology and Cell Biotechnologies, I Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Поступила 18.07.2022
Отправлена на доработку 27.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 18.07.2022
Revision received 27.07.2022
Accepted 28.07.2022

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ У ЖИТЕЛЕЙ КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ К АКТУАЛЬНЫМ АНТИГЕННЫМ ВАРИАНТАМ ВИРУСОВ ГРИППА В ПЕРИОД 2018-2021 гг.

Гончаров А.Г., Егоренкова О.А., Шуплецова В.В.

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

Резюме. В статье приведены результаты оценки популяционного иммунитета у жителей Калининградской области к актуальным антигенным вариантам вирусов гриппа в период 2018-2021 гг. Для оценки спектра циркулирующих на территории Калининградской области типов гриппа, использовался метод ПЦР в реальном времени с использованием наборов реагентов «АмплиСенс». Материалом для исследования служили мазки из рото-носоглотки, полученные от лиц, обратившихся в поликлиники с воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей или проходящих лечение в амбулаторных или стационарных условиях в ЛПУ Калининградской области. Для оценки гуморального иммунитета служила сыворотка крови, полученная от здоровых жителей Калининградской области, при прохождении периодических профилактических осмотров в поликлиниках города и области. Исследования проводились во всех возрастных группах. За изучаемый период 2018-2021 гг. проведено более 14000 исследований. Определение специфических антител в сыворотке крови проводилось постановкой реакции торможения гемагглютинации с использованием актуальных гриппозных диагностикумов (ООО «ППДП», Санкт-Петербург). Определение титра антител в сыворотках на уровне 1/40 и выше считалось достаточным для снижения риска заболевания по крайней мере на 50%. За исследуемый период в области было лабораторно подтверждено 2165 случаев гриппа. В исследуемый период, основным штаммом, вызывающим грипп, был серотип A(H1N1) pdm, его удельный вес достигал 57,5%. Однако, наряду с A(H1N1) pdm, в эпидемический процесс внесли существенный вклад, будучи этиологической причиной гриппозной инфекции, в 2019 г. штамм A(H3N2) – 42,2%, а в 2020 г. штаммы гриппа типа B – 42,5%. На наличие антител за период 2018-2021 гг. обследовано 420 образцов сывороток крови вакцинированных и не вакцинированных лиц. Сыворотки забирались через 1-2 месяца после вакцинации и в период между подъемами заболеваемости (апрель-май). У вакцинированных лиц титр антител был протективным у 58,3-64,5%. У этой группы лиц, достаточный для поддержания иммунитета титр сохранялся и в весенне-летний период. Среди лиц, отказавшихся от вакцинации защитный титр антител в предэпидемический период отмечен у 41,2% обследованных, а в период межсезонья выявлен у 37,4% добровольцев. Таким образом, основной этиологической причиной, вызывающей грипп на территории Калининградской области в 2018-2021 гг. был штамм A(H1N1) pdm. Защитный уровень антител у привитого населения, в период предшествующий эпи-

Адрес для переписки:

Гончаров Андрей Геннадьевич
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени Иммануила Канта»
236010, Россия, г. Калининград, пр. Победы, 189, кв. 5.
Тел.: 8 (911) 865-20-66.
E-mail: agoncharov59@mail.ru

Address for correspondence:

Goncharov Andrey G.
I. Kant Baltic Federal University
236010, Russian Federation, Kaliningrad,
Pobedy ave., 189, apt 15.
Phone: 7 (911) 865-20-66.
E-mail: agoncharov59@mail.ru

Образец цитирования:

А.Г. Гончаров, О.А. Егоренкова, В.В. Шуплецова
«Популяционный иммунитет у жителей
Калининградской области к актуальным антигенным
вариантам вирусов гриппа в период 2018-2021 гг.»
// Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 4. С. 419-422.
doi: 10.46235/1028-7221-1170-PII

© Гончаров А.Г. и соавт., 2022

For citation:

A.G. Goncharov, O.A. Egorenkova, V.V. Shupletsova
“Population immunity in residents of the Kaliningrad
region to current antigenic variants of influenza viruses over
2018-2021”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 419-422.
doi: 10.46235/1028-7221-1170-PII

DOI: 10.46235/1028-7221-1170-PII

демическому подъему заболеваемости, отмечался на 30% чаще, чем у не привитых лиц. Отмеченная в 2020 году высокая заболеваемость гриппом, вызванным штаммами гриппа В, по-видимому требует смены вакцинного препарата.

Ключевые слова: популяционный иммунитет, Калининградская область, вирусы гриппа, эпидемический процесс, титры антител, вакцинация

POPULATION IMMUNITY IN RESIDENTS OF THE KALININGRAD REGION TO CURRENT ANTIGENIC VARIANTS OF INFLUENZA VIRUSES OVER 2018-2021

Goncharov A.G., Egorenkova O.A., Shupletsova V.V.

I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. The article presents the results of population immunity assessment in residents of the Kaliningrad region to current antigenic variants of influenza viruses over the period of 2018 to 2021. To assess spectrum of influenza types circulating in Kaliningrad region, the real-time PCR method was used using AmpliSense reagent kits. The biological material for the study was obtained from oropharyngeal swabs from the persons who applied to polyclinics with inflammatory diseases of upper respiratory tract, or underwent treatment at the out- or inpatient basis in a healthcare facilities of Kaliningrad region. Humoral immunity was assessed by testing blood sera obtained from healthy residents of Kaliningrad region during periodic prophylactic examinations at the city and regional polyclinics. The study of residents covered all age groups. For the period of 2018–2021, more than 14,000 studies have been carried out. Determination of specific serum antibody titers was carried out by staging the hemagglutination suppression reaction using local influenza antigens (LLC «PPDP», St. Petersburg). Antibody titers of 1/40 and higher were considered sufficient to reduce the risk of disease by > 50%. During the study period, 2165 cases of influenza were confirmed in the region by laboratory tests. Over the study period, the A(H1N1) pdm serotype proved to be the major strain causing influenza, its proportion reached 57.5%. However, along with A(H1N1) pdm, a significant contribution was also made the A(H3N2) strain to the epidemic process, being the etiological cause of influenza infection in 2019 (42.2%), type B influenza strains being actual in 2020 (42.5%). Over the period of 2018–2021, 420 samples of blood sera from vaccinated and non-vaccinated individuals were tested for specific antibodies. The sera were taken 1–2 months after vaccination and between epidemic rises of influenza (April–May). In vaccinated individuals, the antibody titer was protective in 58.3–64.5%. In this group of persons, the titer sufficient to produce immunity was maintained over the spring/summer period. Among those persons who refused vaccination, a protective antibody titer in the pre-epidemic period was noted in 41.2% of the examined, and during the off-season it was detected in 37.4% of the volunteers. Thus, the A(H1N1) pdm strain was the main etiological factor of influenza in Kaliningrad Region in 2018–2021. The protective level of antibodies in vaccinated population over the period preceding the epidemic peak, was observed 30% more often than in unvaccinated individuals. High incidence of influenza B strains noted in 2020 appears to require a change of specific vaccine preparation.

Keywords: population immunity, Kaliningrad region, influenza viruses, epidemic process, antibody titers, vaccination

Введение

Достижения в исследовании структуры, репродукции, генетики вируса гриппа, совершенствование вакцинопрофилактики позволили достичь определенного прогресса в борьбе с этим заболеванием [3]. Тем не менее грипп и его осложнения являются причиной смерти более полумиллиона человек в год. Экономический ущерб от респираторных вирусных инфекций складывающийся из прямых и косвенных затрат

в год составляет более 14 миллиардов долларов, причем до 86 процентов из этой суммы приходится на расходы, связанные с гриппозной инфекцией [4]. Несмотря на то, что в последние годы внимание медицинской общественности было сосредоточено на борьбе с коронавирусной инфекцией COVID-19, вопросы эпидемиологии, диагностики и профилактики гриппа не утратили своего значения. Немаловажное значение в этой работе имеет изучение напряженности противо-

гриппозного иммунитета среди населения отдельных территорий РФ.

Цель исследования — оценка популяционного иммунитета к актуальным антигенным вариантам вирусов гриппа по содержанию специфических антител в сыворотке крови у жителей Калининградской области.

Материалы и методы

Для оценки спектра циркулирующих на территории Калининградской области типов гриппа, использовался метод ПЦР в реальном времени с использованием наборов реагентов «Ампли-Сенс». Для выделения нуклеиновых кислот использовался набор «РИБОпреп» (производитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), синтез кДНК проводили с использованием набора реагентов «Реверта L» в соответствии с инструкциями производителя. Материалом для исследования служили мазки из рото-носоглотки, полученные от лиц, обратившихся в поликлиники с воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей или проходящих лечение в амбулаторных или стационарных условиях в ЛПУ Калининградской области. Для оценки гуморального иммунитета служила сыворотка крови, полученная от здоровых жителей Калининградской области, при прохождении периодических профилактических осмотров в поликлиниках города и области. Все доноры или их законные представители дали информированное согласие на участие в исследовании. Исследования проводились во всех возрастных группах. За изучаемый период 2018–2021 гг. проведено более 14000 исследований. Определение специфических антител в сыворотке крови проводилось в соответствии с Методическими указаниями Роспотребнадзора № 3.3.2.1758-03 «Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа» постановкой реакции торможения геммагглютинации с использованием актуальных гриппозных диагностикумов (ООО «ППДП», Санкт-Петербург). Определение титра антител в сыворотках на уровне 1/40 и выше считалось достаточным для снижения риска заболевания по крайней мере на 50% [1]. В 2018–2021 гг. вакцинация на территории проводилась в основном трехвалентной вакциной «Совигрипп», против

гриппа ежегодно прививалось до 60% населения области. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программ Statistica 6.0 и StatsDirect.

Результаты и обсуждение

За исследуемый период в области было лабораторно подтверждено 2165 случаев гриппа. В целом в исследуемый период основным штаммом, вызывающим грипп, был серотип А(Н1N1) pdm, его удельный вес достигал 57,5%. Однако, наряду с А(Н1N1) pdm, в эпидемический процесс внесли существенный вклад, будучи этиологической причиной гриппозной инфекции, в 2019 г. штамм А(Н3N2) — 42,2%, а в 2020 г. штаммы гриппа типа В — 42,5%.

На наличие антител за период 2018–2021 гг. обследовано 420 образцов сывороток крови вакцинированных и не вакцинированных лиц. Сыворотки забирались через 1–2 месяца после вакцинации и в период между подъемами заболеваемости (апрель–май). У вакцинированных лиц по нашим данным титр антител был протективным у 58,3–64,5%. У этой группы лиц, достаточный для поддержания иммунитета титр сохранялся и в весенне-летний период. Среди лиц, отказавшихся от вакцинации защитный титр антител в предэпидемический период отмечен у 41,2% обследованных, а в период межсезонья выявлен у 37,4% добровольцев.

Таким образом, основной этиологической причиной, вызывающей грипп на территории Калининградской области в 2018–2021 гг. был штамм А(Н1N1) pdm. Уровень заболеваемости гриппом у жителей Калининградской области мало отличался от общероссийских данных [1]. Защитный уровень антител у привитого населения в период предшествующий эпидемическому подъему заболеваемости, отмечался на 30% чаще, чем у не привитых лиц. В период межэпидсезонья эти показатели незначительно различались между собой. Отмеченная в 2020 году, высокая заболеваемость гриппом, вызванным штаммами гриппа В, по-видимому требует смены вакцинного препарата. Предполагаем, что замена трехвалентной вакцины, применяемой для массовой иммунизации населения на новый четырехвалентный препарат будет оптимальной [2, 5].

Список литературы / References

1. Кривицкая В.З., Кузнецова Е.В., Майорова В.Г., Петрова Е.Р., Соминина А.А., Даниленко Д.М. Влияние вакцинации против гриппа на уровень специфического гуморального иммунитета здоровых лиц // Инфекция и иммунитет, 2022. Т. 12, № 1. С. 127–141. [Krivitskaya V.Z., Kuznetsova E.V., Mayorova V.G., Petrova E.R., Somina A.A., Danilenko D.M. Influence of influenza vaccination on the level of specific humoral immunity in healthy individuals. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 1, pp. 127–141. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-IVI-1750.

2. Лioзнов Д.А., Харит С.М., Ерофеева М.К., Зубкова Т.Г., Горчакова О.В., Николаенко С.Л. Оценка реактогенности и иммуногенности вакцины гриппозной четырехвалентной инактивированной субъединичной // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2018. Т. 17, № 3 (100) С. 57-62. [Lioznov D.A., Kharit S.M., Erofeeva M.K., Zubkova T.G., Gorchakova O.V., Nikolaenko S.L. Evaluation of the reactogenicity and immunogenicity of the influenza quadrivalent inactivated subunit vaccine. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2018, Vol. 17, no. 3 (100), pp. 57-62. (In Russ.)]
3. Смирнов В.С., Петленко С.В. Грипп и острые респираторные вирусные инфекции (характеристика, патогенез, профилактика и лечение). 3-е изд., перераб. и доп. СПб.: Гиппократ, 2019. 248 с. [Smirnov V.S., Petlenko S.V. Influenza and acute respiratory viral infections (characteristics, pathogenesis, prevention and treatment). 3rd ed., revised and enlarged]. St. Petersburg: Hippocrates, 2019. 248 p.
4. de Courville C., Cadarette S.M., Wissinger E., Alvarez F.P. The economic burden of influenza among adults aged 18 to 64: A systematic literature review. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2022, Vol. 16, no. 3, pp. 376-385.
5. Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Ramsay E.S., Vasin A.V. Influenza B: prospects for the development of cross-protective vaccines. *Viruses*, 2022, Vol. 14, no. 6, 1323. doi: 10.3390/v14061323.

Авторы:

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

Егоренкова О.А. — магистрант высшей школы живых систем ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

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

Authors:

Goncharov A.G., MD (Medicine), Senior Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Egorenkova O.A., Master Student, Higher School of Living Systems, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Shupletsova V.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Поступила 11.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 11.07.2022
Accepted 28.07.2022

ДИНАМИКА УРОВНЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ *IN VIVO*

Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Гойман Е.В., Вольский Н.Н.,
Козлов В.А.

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

Резюме. Повышение концентрации внеклеточной ДНК (внДНК) является отличительной чертой патологий, в основном протекающих с острым воспалением (инфаркт миокарда, сепсис, инсульт, травма). При хронических воспалительных процессах, онкологических, аутоиммунных заболеваниях повышение внДНК менее значительны и обусловлены в основном аберрантно протекающими процессами гибели клеток. К числу таких заболеваний относится системная красная волчанка (СКВ). Недавно было показано, что помимо повышенной концентрации внДНК, степень воспаления может отражать индекс N/L (соотношение нейтрофилов к лимфоцитам), являясь простым и информативным маркером активности болезни у пациентов с СКВ. Целью исследования было изучить динамику уровня внДНК и индекса N/L в модели ЛПС-индуцированной воспалительной реакции у интактных мышей и их связь с фенотипической неоднородностью модельной СКВ. В работе использовали половозрелых 6–8-недельных самок мышей (C57Bl/6хDBA/2)F1 и самок мышей линий DBA/2. ЛПС *E. coli* штамма 111: B4 (Sigma) вводили внутрибрюшинно однократно в дозах 10 нг, 1 мкг и 100 мкг на мышью в PBS, контрольной группе вводился соответствующий объем буфера. В качестве ингибитора TNF α был использован TNF α -связывающий домен белка CRMV вируса натуральной оспы, который вводили за 30 мин. до введения ЛПС. Динамику ответа на ЛПС оценивали через 4, 8, 11, 24 часа по индексу N/L и уровню внДНК, в нулевой точке параметры определялись до введения ЛПС. Через сутки после однократного введения ЛПС в дозе 1 мкг/мышью, на этих же мышьях-гибридах была индуцирована модель СКВ (двукратное внутривенное введение с интервалом 6 дней клеток селезенки линии DBA/2 по $60\text{--}70 \times 10^6$ клеток). Через три месяца при протеинурии 3 мг/мл и более мышью относили к группе СКВ^{нефрит+}, при белке менее 3 мг/мл к группе СКВ^{нефрит-}. Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с использованием теста Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Установлено, что изменение индекса N/L, как и изменение уровня внДНК зависит от дозы вводимого ЛПС. Показано, что уровень внДНК максимальный через 8 и 11 часов после введения ЛПС достоверно снижается при использовании ингибитора TNF α . Ретроспективный анализ свидетельствует о том, что существует определенная зависимость между ответом интактных мышью на ЛПС до индукции хРТПХ и их последующим разделением на варианты СКВ^{нефрит+} и СКВ^{нефрит-} при развитии заболевания.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, ЛПС, фенотипическая гетерогенность, экспериментальная модель СКВ

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Е.Н. Демченко, Е.Д. Гаврилова, Е.В. Гойман,
Н.Н. Вольский, В.А. Козлов «Динамика уровня
внеклеточной ДНК в ЛПС-индуцированной модели
воспаления *in vivo*» // Российский иммунологический
журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 423-430.
doi: 10.46235/1028-7221-1179-DOC
© Демченко Е.Н. и соавт., 2022

For citation:

E.N. Demchenko, E.D. Gavrilova, E.V. Goiman, N.N. Volskiy,
V.A. Kozlov "Dynamics of cell-free DNA levels in the *in vivo*
LPS-induced inflammation model", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,
Vol. 25, no. 4, pp. 423-430.
doi: 10.46235/1028-7221-1179-DOC
DOI: 10.46235/1028-7221-1179-DOC

DYNAMICS OF CELL-FREE DNA LEVELS IN THE *IN VIVO* LPS-INDUCED INFLAMMATION MODEL

Demchenko E.N., Gavrilova E.D., Goiman E.V., Volskiy N.N., Kozlov V.A.

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

Abstract. An increased concentration of extracellular cell free DNA (cfDNA) is a distinctive characteristic of pathologies that mainly occur in acute inflammation (myocardial infarction, sepsis, stroke, trauma). The increase of cfDNA in chronic inflammatory processes, oncological, autoimmune diseases is less significant and is mainly due to aberrant cell death processes. One of such diseases is systemic lupus erythematosus (SLE). It has recently been shown that, in addition to increased cfDNA concentration, the degree of inflammation can reflect the N/L index (neutrophil to lymphocyte ratio), being a simple and informative marker of disease activity in patients with SLE. The aim of the study was to study the dynamics of the level of cfDNA and the N/L index in the model of LPS-induced inflammatory response as observed in intact mice, and their relation to the phenotypic heterogeneity of model SLE. We used female hybrid mice (C57Bl/6xDBA/2) F1 and female DBA/2 mice at the age of 6–8 weeks. LPS of *E. coli* strain 111: B4 (Sigma) was injected intraperitoneally once at doses of 10 ng, 1 µg and 100 µg per mouse in PBS. The control group was injected with the appropriate volume of buffer. The TNFα-binding domain of the variola virus CRMB protein was used as an inhibitor of TNFα, which was administered 30 min before the introduction of LPS. The dynamics of the response to LPS was assessed after 4, 8, 11, 24 hours by the N/L index and the level of cfDNA; at the zero point, the parameters were determined before the introduction of LPS. A day after a single injection of LPS at a dose of 1 µg/mouse, a SLE model was induced on the same hybrid mice (double intravenous administration with an interval of 6 days of spleen cells of the DBA/2 line, 60–70 × 10⁶ cells each). Three months later, with proteinuria of 3 mg/mL or more, mice were assigned to the SLE^{nephritis+} group, with a protein of less than 3 mg/mL, to the SLE^{nephritis-} group. Statistical processing of the results was carried out by nonparametric statistics using the Mann–Whitney test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. It was found that the change in the N/L index, as well as the change in the level of cfDNA, depends on the dose of LPS administered. It was shown that the level of cfDNA reaches its maximum after 8 and 11 hours after the introduction of LPS is reliably reduced when using the inhibitor TNFα. A retrospective analysis indicates that there is a definite relationship between the response of intact mice to LPS before induction of cGVHD, and their subsequent division into variants of SLE^{nephritis+} and SLE^{nephritis-} in the course of disease development.

Keywords: extracellular DNA, LPS, phenotypic heterogeneity, systemic lupus erythematosus, experimental model

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

Введение

Феномен повышенной концентрации внеклеточной ДНК (внДНК) определяется как признак воспалительных состояний и является отличительной чертой патологий, в основном протекающих с острым воспалением (инфаркт миокар-

да, сепсис, инсульт, травма) [8]. Менее выражена повышенная концентрация внДНК при хронических воспалительных процессах, онкологических, аутоиммунных заболеваниях, обусловленная в основном aberrantly протекающими процессами гибели клеток. К числу таких заболеваний относится системная красная волчанка (СКВ), одной из основных черт которой является наличие антител к двуцепочечной ДНК. Ранее в экспериментальной модели фенотипически гетерогенной СКВ: с нефритом (СКВ^{нефрит+}) и без нефрита (СКВ^{нефрит-}), индуцированной хронической реакцией трансплантат против хозяина (хРТПХ), показано, что к моменту полного формирования патологии среднее значение уровня внеклеточ-

ной ДНК (внДНК) в группе СКВ^{нефрит+} почти в 2 раза превышало аналогичный показатель у мышей в группе СКВ^{нефрит-}, однако изменения оказались статистически не достоверны [1, 4].

Учитывая то, что начальный этап развития хРТПХ, связанный с генерацией иммунного ответа и формированием различных клинических вариантов СКВ, характеризуется чрезмерной/неконтролируемой продукцией провоспалительных цитокинов, рассматриваемой как «синдром цитокинового шторма», биологические механизмы которого до сих пор неясны, представлялось адекватным оценить уровень внДНК в простой ЛПС-индуцированной модели. Было высказано предположение, что маркером патологических состояний может служить не только уровень внДНК, как при остром воспалении, но и динамика изменения уровня внДНК, которая может соответствовать различным механизмам протекания воспалительных реакций. Недавно было показано, что помимо повышенной концентрации внДНК, степень воспаления может отражать индекс N/L (соотношение нейтрофилов к лимфоцитам), являясь простым и информативным маркером активности болезни у пациентов с СКВ [5].

Целью работы являлось изучение динамики уровня внДНК и индекса N/L в модели ЛПС-стимулированной воспалительной реакции у интактных мышей и связи этих параметров с последующей фенотипической неоднородностью индуцированной СКВ.

Материалы и методы

В работе использовали половозрелых 6-8-недельных самок мышей (C57Bl/6xDBA/2)F1 и самок мышей линий DBA/2, полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАН (г. Новосибирск). Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1986). Исследование одобрено этическим комитетом НИИФКИ (протокол № 92 от 10.11.2015 г.)

Интakтным самкам (C57BL/6xDBA/2)F1 внутрибрюшинно однократно вводили ЛПС *E. coli* штамма 111: B4 (Sigma), в дозах 10 нг, 1 мкг и 100 мкг на мышшь в PBS (PBS-10 мМ фосфатный буфер pH 7,4, 0,15 М NaCl), контрольной группе вводился соответствующий объем буфера. В качестве ингибитора TNF α был использован TNF α -связывающий домен белка CRMB виру-

са натуральной оспы (TNF-BD) любезно предоставленный Щелкуновым С.Н., обозначаемый нами как TNF α -связывающий белок [3]. TNF α -связывающий белок вводили за 30 мин. до введения ЛПС. Динамику ответа на ЛПС оценивали через 4, 8, 11, 24 часа по индексу N/L и уровню внДНК, в нулевой точке параметры определялись до введения ЛПС.

Выделение и количественное определение ДНК из плазмы крови проводили согласно методике [9]. Для выделения ДНК забор крови (примерно 100 мкл) производили из хвостовой вены животных в пробирки, содержащие 3 \times PBS, 30 мМ ЭДТА. Плазму отделяли от фракции клеток центрифугированием в течение 20 мин при 400 g. Выделение ДНК из плазмы проводили на колонках компании «БиоСилика» (г. Новосибирск) согласно инструкции по применению «Набора для выделения ДНК из плазмы крови». Определение ДНК проводили с помощью флуоресцентного красителя PicoGreen (Invitrogen). Концентрация ДНК пересчитывалась по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций стандартной двуцепочечной λ ДНК. Через сутки после однократного введения ЛПС в дозе 1 мкг/мышшь, на этих же мышшах-гибридах была индуцирована модель СКВ: самкам (C57Bl/6xDBA/2)F1 вводили клетки селезенки линии DBA/2 [10]. Каждая мышшь-реципиент получала по 60-70 $\times 10^6$ клеток в 0,5 мл среды путём внутривенной инъекции в хвостовую вену двукратно с интервалом 6 дней. Количество белка в моче животных определяли через 3 месяца колориметрически с красителем Кумасси бриллиантовый синий: при протеинурии 3 мг/мл и более мышшь относили к группе СКВ^{нефрит+}, при белке менее 3 мг/мл к группе СКВ^{нефрит-}. Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

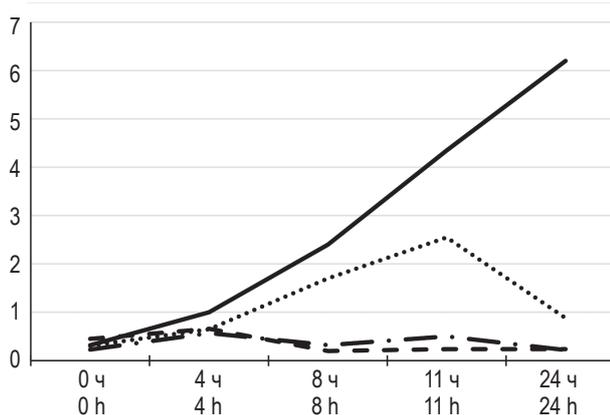
Показана зависимость изменения средних значений индекса N/L от дозы вводимого ЛПС (рис. 1А). Дозы 1 мкг и 100 мкг через 8 и 11 часов после введения препарата вызывают существенное повышение индекса N/L. Через 24 часа после введения 1 мкг ЛПС, влияние препарата нивелируется, индекс снижается, в то время как, при дозе 100 мкг на мышшь влияние ЛПС еще достаточно выражено, показатель индекса N/L высокий. Доза ЛПС 10 нг/мышшь не меняет показателя индекса. Повышение индекса в ЛПС-стимулированной

модели может быть вызвано как рекрутированием нейтрофилов в кровотоки так и тем, что, как сообщается в некоторых исследованиях, под действием воспалительных медиаторов снижается скорость апоптоза нейтрофилов [6, 7]. На рисунке 1Б представлена динамика изменения средних значений уровня внДНК в плазме в зависимости от дозы ЛПС. Видно, что через 8 часов после введения препарата у животных контрольной группы и с дозой 10 нг ЛПС наблюдается значительное повышение уровня внДНК, через 11 часов уровень внДНК в группе с 10 нг ЛПС превышает уровень в контрольной группе в 2,5 раза. Изменения уровня внДНК в контрольной группе мышей, по-видимому, могут быть обусловлены забором образцов крови в контрольных точках, так в работе [11] показали, что кровопотеря ведет к повышению продукции провоспалительных цитокинов. Дозы 1 мкг и 100 мкг ЛПС увеличивают уровень внДНК в 2,5-3 раза уже к 4 часам, далее уровень существенно повышается к 8 и 11 часам и снижается к 24 часам. Сравнимые значения уровня внДНК на 11 часов при дозах 1 мкг и 100 мкг, как и то, что через 8 часов при дозе 100 мкг уровень внДНК ниже, чем при дозе 1 мкг, видимо, объясняется снижением апоптоза нейтрофилов под воздействием ЛПС. По-видимому, через 8 часов после введения препарата в дозе 100 мкг, вклад гибели других клеток в появлении внДНК в плазме менее значителен, чем влияние увели-

чения времени жизни нейтрофилов. Показано, что изменение уровня внДНК и индекса N/L в течение 24 часов после однократного введения мышам различных доз ЛПС зависит от дозы вводимого препарата. Для работы была выбрана доза 1 мкг ЛПС.

На рисунке 2А представлены данные о влиянии TNF α -связывающего белка в дозе 10 нг/на мышь на изменение средних значений индекса N/L при введении 1 мкг ЛПС. Видно, что белок не влияет ни на сам индекс N/L, ни на изменение индекса под действием ЛПС. Увеличение дозы TNF α -связывающего белка в 100 раз также не влияло на значения индекса (данные не приведены). Данные представленные на рисунке 2Б показывают, что предварительное введение TNF α -связывающего белка достоверно ингибирует ЛПС-стимулированное повышение уровня внДНК через 8 и 11 часов. Однако через 24 часа группа мышей с совместным введением ЛПС и TNF α -связывающего белка демонстрирует повышение уровня внДНК, несмотря на то, что в ЛПС-индуцированной группе уровень внДНК к этому времени снижается. Анализ картины изменения среднего по группе значения уровня внДНК при введении TNF α -связывающего белка свидетельствует о том, что повышение уровня внДНК через 24 часа вызвано непосредственно белком (рис. 2В). Кроме того, в этой группе через 8 часов после введения белка наблюдается

А (А)



Б (Б)

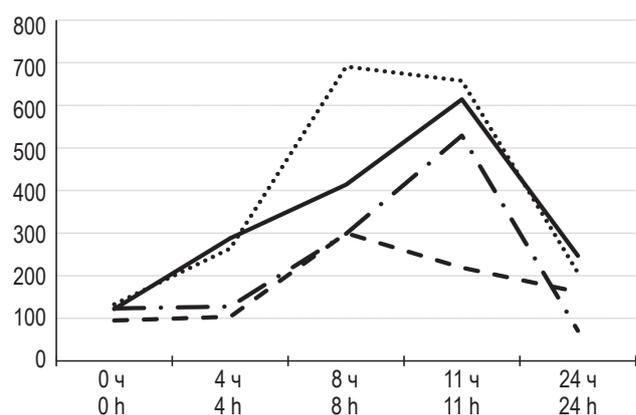


Рисунок 1. Изменение средних значений индекса N/L (А) и уровня вн ДНК (Б) в группах мышей при введении ЛПС

Примечание. По оси абсцисс: время, часы; по оси ординат: А – величина индекса N/L; Б – концентрация внДНК (нг/мл).

Контроль – штрих (n = 3); 10 нг ЛПС – длинный штрих-пунктир (n = 3); 1 мкг ЛПС – круглые точки (n = 3); 100 мкг ЛПС – сплошная линия (n = 3).

Figure 1. Change in the average values of the NL index and the level of ex DNA in groups of mice after the introduction of LPS

Note. On the abscissa: time, hours; along the y-axis: A, the value of the N/L index; B, cfDNA concentration (ng/mL). Control, stroke (n = 3); 10 ng LPS, long dash-dotted line (n = 3); 1 µg LPS, round dots (n = 3); 100 µg LPS, solid line (n = 3).

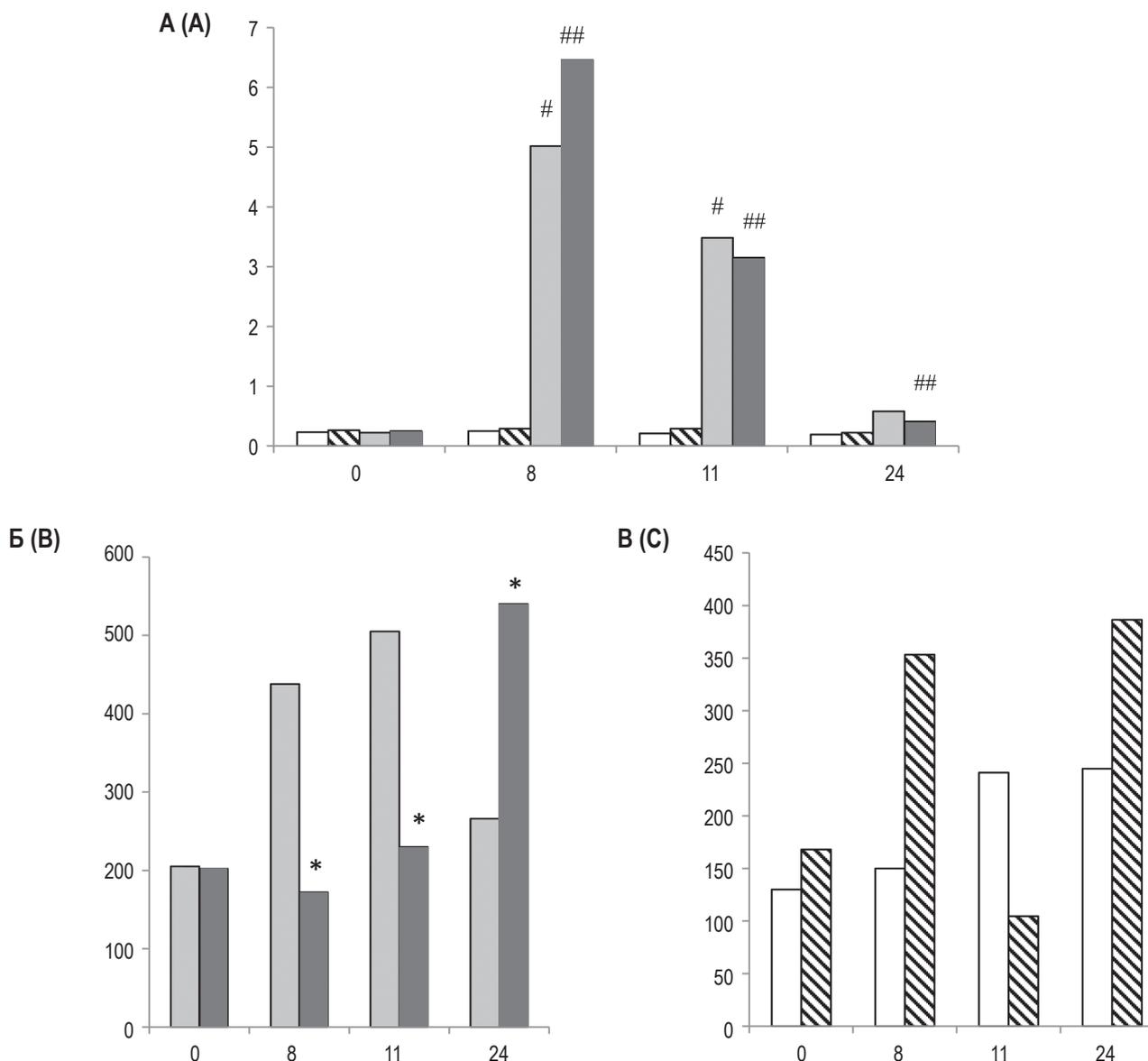


Рисунок 2. Динамика изменения средних значений индекса N/L (А) и уровня вн ДНК (Б, В) при введении TNF-св. белка

Примечание. По оси абсцисс: время, часы; по оси ординат: А – значение индекса N/L; Б, В – концентрация внДНК (нг/мл). Белые столбцы – контроль (n = 9); столбцы со штриховкой – TNF-св. белок (n = 6); серые столбцы – ЛПС (n = 8); черные столбцы – ЛПС + TNF-св. белок (n = 6). # – p < 0,05 – между ЛПС и контролем; ## – p < 0,05 – между TNF-св. белок и ЛПС + TNF-св. белок; * – p < 0,05 – между ЛПС и ЛПС + TNF-св. белок.

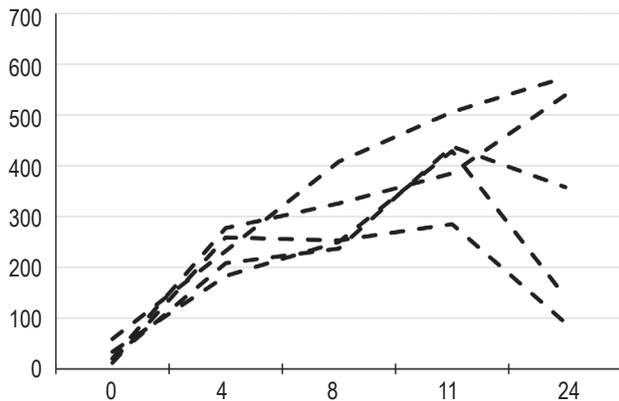
Figure 2. Dynamics of changes in the average values of the N/L index (A) and the level of ext DNA (B, C) with the introduction of TNF-binding protein

Note. On the abscissa: time, hours; along the y-axis: A, index value N/L; B, C, cfDNA concentration (ng/mL). White columns, control (n = 9); hatched columns, TNF-binding protein (n = 6); gray columns, LPS (n = 8); black columns, LPS + TNF-binding protein (n = 6). #, p < 0.05, between LPS and control; ##, p < 0.05, between TNF-binding protein and LPS + TNF-binding protein; *, p < 0.05, between LPS and LPS + TNF-binding protein.

увеличение в 2 раза среднего уровня внДНК по сравнению с контрольной интактной группой, через 11 часов уровень внДНК в группе с TNF α -связывающим белком ниже, чем в контрольной группе.

Существуют литературные данные о том, что ингибирование активности TNF- α ослабляет экспрессию CD44, влияя на апоптоз, что в свою очередь приводит к снижению удаления фагоцитами разрушенного клеточного материала, спо-

А (A)



Б (B)

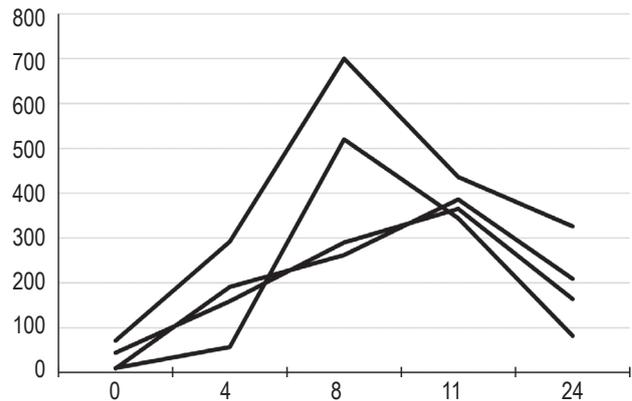


Рисунок 3. Уровень вДНК у индивидуальных животных в разных группах модельного СКВ заболевания.

Примечание: А – СКВ^{нефрит-}; Б – СКВ^{нефрит+}. По оси абсцисс: время, часы. По оси ординат: концентрация вДНК (нг/мл).

Figure 3. Level of cfDNA in individual animals in different groups of the model SLE disease.

Note: A, SLE^{nephritis-}; B, SLE^{nephritis+}. On the abscissa: time, hours. Y-axis: cfDNA concentration (ng/mL).

собствуя образованию аутоантител, в том числе к ДНК [2]. Видимо, через 8 и 24 часа мы наблюдаем обусловленное TNF α -связывающим белком ослабление фагоцитоза, и повышение уровня вДНК. Снижение уровня вДНК через 11 часов может быть объяснено тем, что в коротком временном промежутке между заборами крови на 8 и 11 часов, уровень индуцированного кровопотерей TNF α в плазме животных достаточен для полного ингибирования TNF α -связывающего белка. Это определяет более низкий уровень вДНК в группе с TNF α -связывающим белком, чем в группе интактных мышей. Таким образом, показано, что TNF α является одним из медиаторов ЛПС-индуцированного повышения уровня вДНК *in vivo*, TNF α -связывающий белок действует как ингибитор повышения уровня вДНК. В системе индукции ЛПС TNF α -связывающий белок сам вызывает повышение уровня вДНК.

Ранее нами было показано, что однократное введение 1 мкг ЛПС и последующая индукция СКВ не изменяет баланс процентного содержания животных в группах СКВ^{нефрит+} / СКВ^{нефрит-} по сравнению со стандартной индукцией патологии. Было проведено измерение уровня вДНК у интактных мышей после введения ЛПС, а через сутки после введения ЛПС на этих мышах была индуцирована модель СКВ, через 12 недель мышей разделили на группы СКВ^{нефрит+} и СКВ^{нефрит-}. Установлено, что при введении ЛПС интактные генетически однородные гибриды BDF демонстрируют разную динамику изменения уровня вДНК. Ретроспективный анализ связи уровня вДНК и определенного клинического варианта заболевания показал, что в группе мышей с СКВ^{нефрит+} у ча-

сти мышей отмечается резкое повышение уровня вДНК на 8 часов и снижение уровня к 24 часам у всех мышей, а в группе мышей с СКВ^{нефрит-} наблюдается плавное возрастание уровня вДНК к 11 часу, с дальнейшим повышением или понижением на 24 часа (рис. 3). Обе группы не являются однородными по динамике изменения уровня вДНК, и в то же время кривые, приведенные на рисунках 3 А и Б, позволяют предположить, что реакции, обуславливающие гетерогенность заболевания, могут иметь различные пути и скорости прохождения процесса, отражаемые в динамике изменений уровня вДНК.

Заключение

В результате измерения уровня вДНК в динамике установлена выраженная гетерогенность ответа на ЛПС у генетически однородных животных. Возможно, это обусловлено влиянием многочисленных внутренних факторов, в том числе эпигенетическими изменениями в системе врожденного иммунитета, вызывающими сдвиг баланса активности Th1- и Th2-субпопуляций, и приводящими к конечному выбору варианта, по которому пойдет развитие иммунного процесса в каждом конкретном случае.

Таким образом, исследование уровня вДНК в ЛПС-индуцированной реакции, моделирующей ранние события формирования аутоиммунной патологии, показало, что концентрация вДНК является достаточно чувствительным и лабильным параметром, который может быть использован для изучения фенотипической гетерогенности индуцированной СКВ.

Список литературы / References

1. Колесникова О.П., Кудяева О.Т., Вольский Н.Н., Гойман Е.В., Гаврилова Е.Д., Перминова О.М., Демченко Е.Н., Козлов В.А. Экспериментальная модель аутоиммунного процесса: роль эпигенетической изменчивости в популяции мышей-гибридов // Вестник РАМН, 2015. Т. 70, № 2. С. 152-158. [Kolesnikova O.P., Kudaeva O.T., Volskiy N.N., Goiman E.V., Gavrilova E.D., Perminova O.M., Demchenko E.N., Kozlov V.A. Experimental model of the autoimmune process: the role of epigenetic variability in the population of hybrid mice. *Vestnik RAMN = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, Vol. 70, no. 2. pp. 152-158. (In Russ.)]
2. Almoallim H., Al-Ghamdi Y., Almaghrabi H., Alyasi O. Anti-tumor necrosis factor-alpha induced systemic lupus erythematosu. *Open Rheumatol. J.*, 2012, Vol. 6, pp. 315-319.
3. Gileva I.P., Nepomnyashchikh T.S., Ryazankin I.A., Shchelkunov S.N. Recombinant TNF-binding protein from variola virus as a novel potential TNF antagonist. *Biochemistry (Mosc.)*, 2009, Vol. 74, no. 12, pp. 1356-1362.
4. Kudaeva O.T., Kolesnikova O.P., Goiman E.V., Tkachev V.O., Volskiy N.N., Perminova O.M., Gavrilova E.D., Kozlov V.A. The experimental model of the autoimmune glomerulonephritis induced by the chronic graft versus host reaction // An update on glomerulopathies – Etiology and pathogenesis. Ed. by S.S.Prabhakar. Rijeka: In Tech, 2011, pp. 49-86.
5. Li L., Xia Y., Chen C., Cheng P., Peng C. Neutrophil-lymphocyte ratio in systemic lupus erythematosus disease: a retrospective study. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015, Vol. 8, no. 7. pp. 11026-11031.
6. Miralda I., Uriarte S.M., McLeish K.R. Multiple phenotypic changes define neutrophil priming. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2017, Vol. 7, 217. doi: 10.3389/fcimb.2017.00217.
7. Sabroe I., Dower S.K., Whyte M.K. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin. Infect Dis.*, 2005, Vol. 41, Suppl. 7, pp. S421-S426.
8. Swarup V., Rajeswari M.R. Circulating (cell-free) nucleic acids – a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett.*, 2007, Vol. 581, no. 5, pp. 795-799.
9. Tamkovich S.N., Litviakov N.V., Bryzgunova O.E., Dobrodeev A.Y., Rykova E.Y., Tuzikov S.A., Zav'ialov A.A., Vlassov V.V., Cherdyntseva N.V., Laktionov P.P. Cell-surface-bound circulating DNA as a prognostic factor in lung cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, Vol. 1137, pp. 214-217.
10. Tschetter J.R., Mozes E., Shearer G.M. Progression from Acute to chronic disease in a murine parent-into-F1 model of graft-versus-host disease. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 165, pp. 5987-5994.
11. Yang Q.S., He L.P., Zhou X.L., Zhao Y., Shen J., Xu P., Ni S.Z. Kaempferol pretreatment modulates systemic inflammation and oxidative stress following hemorrhagic shock in mice. *Chin. Med.*, 2015, no. 10, 6. doi: 10.1186/s13020-015-0035-z.

Авторы:

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

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

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

Authors:

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

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

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

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

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

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

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

Поступила 15.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022
Accepted 28.07.2022

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ CD45⁺ И CD46⁺ НА СУБПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ

Добрынина М.А.¹, Зурочка А.В.^{1, 2}, Комелькова М.В.^{1, 2}, Ло Ш.³,
Зурочка В.А.^{1, 2}, Ху Д.³, Рябова Л.В.⁴, Сарапульцев А.П.^{1, 2}

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

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

³ Хуачжунский университет науки и технологий, Ухань, Китай

⁴ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. Вирус SARS-CoV-2 может проникать в клетки с помощью S1 вирусного шипового (S) белка не только через связывание с ACE2, но и через другие рецепторы клеток. К таким кандидатным рецепторам относится CD46, который также, как и CD45, относится к панлейкоцитарным рецепторам и экспрессируется на всех видах лимфоцитов. В свою очередь SARS-CoV-2-инфекция сопровождается повреждением практически всех компартментов иммунной системы и в первую очередь Т-лимфоцитов.

Целью исследования явилось изучение уровней экспрессии CD45⁺ и CD46⁺ на различных субпопуляциях лимфоцитов у пациентов, перенесших SARS-CoV-2-инфекцию.

Было обследовано 72 пациента, перенесших SARS-CoV-2-инфекцию. Методом проточной цитометрии определены CD45⁺ и CD46⁺ (панлейкоцитарный маркер для гейтирования лимфоцитов), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺ (Т-лимфоциты), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD4⁺ (хелперы индукторы), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD56⁺ (ТНК-клетки), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD56⁺ (натуральные киллеры), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD19⁺ (В-лимфоциты), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺ (активированные хелперы, ранняя активация лимфоцитов), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, HLA-DR (активированные Т-лимфоциты – поздняя активация лимфоцитов).

Исследования показали, что снижение экспрессии CD46⁺ на Т-лимфоцитах (CD3⁺) сопровождается таким же снижением его экспрессии на цитотоксических Т-лимфоцитах (CD3⁺, CD8⁺), ТНК (CD3⁺, CD56⁺), а также Т-хелперах, несущих маркеры ранней активации (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺). При этом наиболее выраженное снижение отмечалось как среди общих Т-лимфоцитов, так и цитотоксических. У этих больных несколько повышался уровень экспрессии CD46⁺ на В-лимфоцитах. Последние данные говорят об отсутствии вовлечения в нарушение рецептора CD46 на В-лимфоцитах. Полученные нами данные говорят о том, что вирус SARS-CoV-2 может воздействовать на рецептор CD46. Такое воздействие может приводить к усилению симптомов лонг-ковида (постковидного синдрома) у таких пациентов и требует формированию новых подходов к коррекции этих нарушений.

Ключевые слова: иммунная система, Т-клетки, Т-лимфоциты, ТНК-лимфоциты, В-лимфоциты, CD46, SARS-CoV-2-инфекция, постковидные пациенты

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

М.А. Добрынина, А.В. Зурочка, М.В. Комелькова,
Ш. Ло, В.А. Зурочка, Д. Ху, Л.В. Рябова,
А.П. Сарапульцев «Исследование экспрессии CD45⁺
и CD46⁺ на субпопуляциях лимфоцитов периферической
крови постковидных пациентов» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 431-436.
doi: 10.46235/1028-7221-1160-SOC

© Добрынина М.А. и соавт., 2022

For citation:

M.A. Dobrynina, A.V. Zurochka, M.V. Komelkova, S. Luo,
V.A. Zurochka, D. Hu, L.V. Ryabova, A.P. Sarapultsev
“Studies of CD45⁺ and CD46⁺ expression on the peripheral
blood lymphocyte subsets of the post-COVID patients”, Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 431-436.
doi: 10.46235/1028-7221-1160-SOC

DOI: 10.46235/1028-7221-1160-SOC

STUDIES OF CD45⁺ AND CD46⁺ EXPRESSION ON THE PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE SUBSETS OF THE POST-COVID PATIENTS

Dobrynina M.A.^a, Zurochka A.V.^{a, b}, Komelkova M.V.^{a, b}, Luo S.^c,
Zurochka V.A.^{a, b}, Hu D.^c, Ryabova L.V.^d, Sarapultsev A.P.^{a, b}

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

^b South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

^c University of Science and Technology, Wuhan, China

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

Abstract. The SARS-CoV-2 virus can enter the cells using S1 viral spike (S) protein, not only by binding to ACE2, but also through other cellular receptors. These candidate receptors include CD46, which, like CD45, belongs to pan-leukocyte receptors and is expressed on all types of lymphocytes. In turn, SARS-CoV-2 infection is accompanied by damage to almost all compartments of the immune system, mainly T lymphocytes. The purpose of the study was to evaluate the expression levels of CD45⁺ and CD46⁺ in various subpopulations of lymphocytes in patients who had undergone SARS-CoV-2 infection.

72 patients who had undergone SARS-CoV-2 infection were examined. Using flow cytometry technique, we determined CD45⁺ and CD46⁺ (panleukocyte marker for lymphocyte gating), CD45⁺ and CD46⁺, CD3⁺ (T lymphocytes), CD45⁺ and CD46⁺, CD3⁺, CD4⁺ (helper inducers), CD45⁺ and CD46⁺, CD3⁺, CD8⁺ (cytotoxic T-lymphocytes), CD45⁺ and CD46⁺, CD3⁺, CD56⁺ (TNK cells) CD45⁺ and CD46⁺, CD3⁺, CD56⁺ (natural killers), CD45⁺ and CD46⁺, CD3⁺, CD19⁺ (B lymphocytes), CD45⁺ and CD46⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺ (activated helpers, early activation of lymphocytes), CD45⁺ and CD46⁺, CD3⁺, HLA-DR (activated T lymphocytes – late activation of lymphocytes). Our studies have shown that a decrease in CD46⁺ expression in T lymphocytes (CD3⁺) is accompanied by similar decrease of its expression in cytotoxic T lymphocytes (CD3⁺, CD8⁺), TNK (CD3⁺, CD56⁺), as well as in helpers T carrying markers of early activation (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺). At the same time, the most pronounced decrease was observed both among total T lymphocytes and cytotoxic T cells. In these patients, the expression level of CD46⁺ in B lymphocytes was slightly increased. Recent data suggest that there is no involvement of CD46 receptor on B lymphocytes. Our data suggest that the SARS-CoV-2 virus may affect the CD46 receptor. Such exposure may lead to promotion of the long-COVID (post-COVID) symptoms in such patients, thus requiring new approaches to correction of these disorders.

Keywords: immune system, T cells, T lymphocytes, TNK lymphocytes, B lymphocytes, CD46, SARS-CoV-2 infection, post-COVID patients

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

Введение

Известно, что развитие SARS-CoV-2-инфекции обусловлено связыванием SARS-CoV-2 с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) и является критическим шагом в патофизиологии клинических проявлений у пациентов с COVID-19 [13]. Согласно литературе, вирус SARS-CoV-2 может проникать в клетки не только с помощью S1 вирусного шипового (S) белка через связывание с ACE2, но и через другие рецепторы клеток. К таким кандидатным рецепторам относится CD46, который, так же как и CD45, относится к панлейкоцитарным рецепторам и

экспрессируется на всех видах лимфоцитов [8, 11]. CD46 представляет собой мембранный гликопротеин I типа, экспрессируемый на всех ядерных клетках, характеризующийся как регуляторный белок комплемента и как рецептор для ряда патогенов человека, включая вакцинный штамм вируса кори, аденовирусов (группы В и D) и вирусов герпеса 6 типа [12].

В то же время SARS-CoV-2-инфекция сопровождается повреждением практически всех компартов иммунной системы и в первую очередь Т-лимфоцитов [3, 4]. При этом именно нарушение лимфоцитарного звена иммунной системы оказывается критическим в случае SARS-CoV-2, поскольку сверх активный цитокиновый ответ, типичный для тяжелых случаев заболевания, приводит к развитию системных осложнений, полиорганной недостаточности и, в конечном итоге, к смерти [9]. У больных COVID-19 отмечается уменьшение количества CD3⁺CD4⁺Т-

лимфоцитов, CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов, CD19⁺В-лимфоцитов и CD16⁺CD56⁺NK-клеток в периферической крови [7, 14].

В свою очередь, известно, что при дефиците CD46 или его лиганда (С3/С3b) отмечается нарушение Th1-ответа и увеличивается риск рецидивирующих инфекций [6], в то время как нарушения со стороны Т-клеточного ответа отмечаются как входе самого заболевания [7], так и спустя длительные промежутки времени после клинического выздоровления [10].

Работ, определявших экспрессию CD46⁺ на лимфоцитах у пациентов с постковидным синдромом, в доступной литературе обнаружено не было.

Однако полученные фундаментальные знания о панлейкоцитарных маркерах лимфоцитов и их субпопуляций у постковидных пациентов являются крайне востребованными, так как могут позволить разработать новые подходы к лечению и реабилитации больных, в том числе и при иных вирусных (в том числе и сезонных) заболеваниях.

Таким образом, учитывая роль активации системы комплемента при COVID-19, регуляторные свойства CD46 и его потенциальную вовлеченность в процессы проникновения вируса в клетку, мы сочли необходимым изучить параметры иммунной системы, связанные с нарушением уровней CD45⁺ и CD46⁺ на различных субпопуляциях лейкоцитов у постковидных пациентов.

Цель исследования – изучить уровень экспрессии CD45⁺ и CD46⁺ на различных субпопуляциях лимфоцитов у пациентов, перенесших SARS-CoV-2-инфекцию.

Материалы и методы

Было обследовано 72 пациента, перенесших SARS-CoV-2-инфекцию. Критерием включения в группы исследований были: подтвержденный диагноз SARS-CoV-2-инфекции методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), наличие IgA, IgM, IgG к вирусу SARS-CoV-2-инфекции, данные компьютерной томографии о перенесенной пневмонии (варианты: КТ1 – поражение до 25% легких, КТ2 – поражение до 50% легких, КТ3 – поражением до 75% легких, КТ4 – поражение свыше 75% легких). Исследование проводилось не менее чем через 6 месяцев после перенесенной пневмонии вызванной SARS-CoV-2-инфекцией.

Все пациенты были предварительно обследованы врачом терапевтом и иммунологом-аллергологом, для выявления сопутствующих заболеваний. Группы были рандомизированы по полу, возрасту, сопутствующим заболеваниям по критерию 2. Пациенты были разделены на 2 группы сравнения по гейтированию панлейкоцитарными маркерами: 1. Пациенты с уровнем CD45⁺ больше уровня CD46⁺ на Т-лимфоцитах (n = 52). 2. Пациенты с CD45⁺, равным или меньшим уровня CD46⁺ на Т-лимфоцитах (n = 20).

Критерием общие Т-лимфоциты были выбраны в связи с тем, что их повреждение наиболее часто встречается при обследовании как ковидных, так и постковидных пациентов [7, 10]. Все исследования были одобрены Независимым локальным этическим комитетом при ГАУЗ ОТКЗ «Городская клиническая больница № 1» г. Челябинска, протокол № 8 от 11.04.2022, на базе которой проводились данные исследования.

Иммунологические исследования

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

Методом проточной цитометрии CD45⁺ и CD46⁺ (панлейкоцитарный маркер для гейтирования лимфоцитов), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺ (Т-лимфоциты), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD4⁺ (хелперы индукторы), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD56⁺ (ТНК-клетки) CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD56⁺ (натуральные киллеры), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD19⁺, CD5⁺ (В-лимфоциты), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺ (активированные хелперы, ранняя активация лимфоцитов), CD45⁺ и CD46⁺, CD3⁺, HLA-DR (активированные Т-лимфоциты – поздняя активация лимфоцитов), Beckman Coulter, BioLegend (США). Оценку иммунного статуса осуществляют методом проточной цитометрии на цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter, США) по стандартизованной технологии оценки лимфоцитарного звена иммунитета [1, 2].

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

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования было выявлено, что при гейтировании лимфоцитов по CD45⁺ по сравнению с CD46⁺ у части пациентов процент Т-лимфоцитов несущих рецептор CD45⁺ был достоверно выше, чем при гейтировании CD46⁺, из 72 пациентов таких было 52 человека (72,2%), у остальных 20 человек процент Т-лимфоцитов несущих рецептор CD45⁺ был равен или несколько ниже, чем при гейтировании CD46⁺ (см. табл. 1). По этому критерию пациенты были разбиты на 2 группы, как это было написано выше.

Как показали наши исследования, снижение экспрессии CD46⁺ на Т-лимфоцитах (CD3⁺) со-

проводится, таким же уменьшением его экспрессии на цитотоксических Т-лимфоцитах (CD3⁺, CD8⁺), TNK (CD3⁺, CD56⁺), а также Т-хелперах, несущих маркеры ранней активации (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺). При этом наиболее выраженное снижение отмечалось как среди общих Т-лимфоцитов, так и цитотоксических. У этих больных несколько повышался уровень экспрессии CD46⁺ на В-лимфоцитах. Последние данные говорят об отсутствии вовлечения в нарушении рецептора CD46 на В-лимфоцитах (см. табл. 1).

Как показали наши исследования, более чем у 70% обследованных пациентов с постковидным синдромом выявляется значительное снижение экспрессии CD46⁺ на Т-лимфоцитах. При этом наиболее страдают как общее количество

этих клеток, так и клетки, отвечающие за противовирусный иммунитет (Т-цитотоксические и TNK-клетки) и раннюю активацию Т-хелперов. Выявлено, что В-лимфоциты в этой ситуации не страдают, а даже несколько усиливают экспрессию CD46⁺ на мембране клеток. Полученные нами данные говорят о том, что вирус SARS-CoV-2 может воздействовать на рецептор CD46.

Более того, наблюдаемые изменения вполне могут быть вызваны взаимодействием вируса и CD46. Так, согласно литературным данным, CD46 вовлечен в контроль по меньшей мере трех ключевых метаболических событий: обработанный γ -секретазой внутриклеточный домен СУТ-1 CD46 перемещается в ядро, где он индуцирует экспрессию белков-переносчиков (GLUT1, LAT1

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ГЕЙТИРОВАНИИ ПАНЛЕЙКОЦИТАРНЫМИ МАРКЕРАМИ CD45⁺ И CD46⁺, M \pm m

TABLE 1. COMPARISON OF INDICES OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN POST-COVID PATIENTS WHEN GATED WITH CD45⁺ AND CD46⁺ PANLEUKOCYTE MARKERS, M \pm m

Показатели субпопуляций лимфоцитов Indicators of subpopulations of lymphocytes	Группа 1. Постковидные пациенты с уровнем CD45 ⁺ больше уровня CD46 ⁺ Group 1. Post-COVID patients with CD45 ⁺ level greater than CD46 ⁺ level, n = 52	Группа 2. Постковидные пациенты с CD45 ⁺ , равным или меньшим, чем уровень CD46 ⁺ Group 2. Post-COVID patients with CD45 ⁺ equal to or less than CD46 ⁺ , n = 20
Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁻) отн. (%) T lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁻) rel. (%)	68,35 \pm 0,69*	74,40 \pm 1,01
Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁻) абс. (10 ⁹ кл/л) T lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁻) abs. (10 ⁹ cell/L)	1427,46 \pm 57,93*	1753,30 \pm 112,49
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺) отн. (%) T cytotoxic (CD3 ⁺ CD8 ⁺) rel. (%)	23,32 \pm 0,95*	26,31 \pm 1,06
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺) абс. (10 ⁹ кл/л) T cytotoxic (CD3 ⁺ CD8 ⁺) abs. (10 ⁹ cell/L)	465,96 \pm 21,16*	611,90 \pm 45,91
TNK-клетки (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) отн. (%) TNK cells (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) rel. (%)	6,080 \pm 0,385	7,28 \pm 0,88
TNK-клетки (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) абс. (10 ⁹ кл/л) TNK cells (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) abs. (10 ⁹ cell/L)	114,62 \pm 6,55*	185,30 \pm 32,06
В-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁺) отн. (%) B lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁺) rel. (%)	10,50 \pm 0,36*	9,04 \pm 0,68
В-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁺) абс. (10 ⁹ кл/л) B-lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁺) abs. (10 ⁹ cell/L)	218,00 \pm 11,55	194,40 \pm 8,76
Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺) (ранняя активация) отн. (%) T lymphocytes (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺) (early activation) rel. (%)	6,58 \pm 0,38	6,700 \pm 0,448
Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺) (ранняя активация) абс. (10 ⁹ кл/л) T lymphocytes (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺) (early activation) abs. (10 ⁹ cell/L)	56,27 \pm 4,04*	72,10 \pm 5,91

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

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

и SAT1) и сборку mTORC1. Активация CD46 индуцирует повышенную экспрессию метаболических ферментов, включая синтазы жирных кислот, GAPD; также CD46 увеличивает активацию внутриклеточных пулов C5 с внутриклеточно генерируемым C5a, стимулирующим митохондриальный C5aR1, который управляет продукцией ROS и активацией NLRP3 инфламмасом в CD4⁺Т-клетках. Все это лежит в основе повышения гликолиза и увеличения продукции OXPHOS и ROS, необходимых для индукции продукции IFN γ и экспрессии гранзима В, и, как следствие, реализации защитных эффекторных ответов Th1 Т-киллеров [5].

Особо стоит отметить, что выявленный комплекс изменений сохраняется у значительного числа переболевших пациентов на протяжении длительного времени, что подчеркивается нарушениями экспрессии этого маркера на различ-

ных субпопуляциях Т-лимфоцитов. В целом же, полученные данные подтверждают гипотезу участия рецептора CD46 в патогенезе COVID-19. Более того, такое воздействие приводит к усилению симптомов лонг-ковида (постковидного синдрома) у таких пациентов и требует формирования новых подходов к коррекции этих нарушений.

Выводы

1. У 72,2% постковидных пациентов выявляется значительное снижение экспрессии CD46⁺ на Т-лимфоцитах.

2. Снижение уровня CD46⁺ у постковидных пациентов наблюдается также на Т-цитотоксических и TNK-клетках и Т-хелперах, несущих маркеры «Ранней активации».

3. Снижение экспрессии CD46⁺ на Т-лимфоцитах не сопровождается падением уровня этого маркера на В-лимфоцитах.

Список литературы / References

1. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshevnev V.A. Flow cytometry in biomedical research]. Ekaterinburg: RIO Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018. 720 p.
2. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал, 2014, Т. 8 (17), № 4. С. 974-992. [Khaidukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. Standardized technology "Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytometer-analyzers". *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 974-992. (In Russ.)]
3. Gusev E., Sarapultsev A., Solomatina L., Chereshevnev V. SARS-CoV-2-Specific immune response and the pathogenesis of COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 3, 1716. doi: 10.3390/ijms23031716.
4. Jouan Y., Guillon A., Gonzalez L., Perez Y., Boisseau C., Ehrmann S., Ferreira M., Daix T., Jeannot R., François B., Dequin P.F., Si-Tahar M., Baranek T., Paget C. Phenotypical and functional alteration of unconventional T cells in severe COVID-19 patients. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 12, e20200872. doi: 10.1084/jem.20200872.
5. Kunz N., Kemper C. Complement has brains-do intracellular complement and immunometabolism cooperate in tissue homeostasis and behavior. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 629986. doi: 10.3389/fimmu.2021.629986.
6. Le Fric G., Sheppard D., Whiteman P., Karsten C.M., Shamoun S.A., Laing A. The CD46-Jagged1 interaction is critical for human TH1 immunity. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 12, pp. 1213-1221.
7. Li M., Guo W., Dong Y., Wang X., Dai D., Liu X., Wu Y., Li M., Zhang W., Zhou H., Zhang Z., Lin L., Kang Z., Yu T., Tian C., Qin R., Gui Y., Jiang F., Fan H., Heissmeyer V., Sarapultsev A., Wang L., Luo S., Hu D. Elevated exhaustion levels of NK and CD8⁺ T cells as indicators for progression and prognosis of COVID-19 disease. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 580237. doi: 10.3389/fimmu.2020.580237.
8. Liszewski M.K., Atkinson J.P. Membrane cofactor protein (MCP; CD46): deficiency states and pathogen connections. *Curr. Opin. Immunol.*, 2021, Vol. 72, pp. 126-134.
9. Masselli E., Vaccarezza M., Carubbi C., Pozzi G., Presta V., Mirandola P., Vitale M. NK cells: A double edge sword against SARS-CoV-2. *Adv. Biol. Regul.*, 2020, Vol. 77, 100737. doi: 10.1016/j.jbior.2020.100737.
10. Mitsuyama Y., Yamakawa K., Kayano K., Maruyama M., Wada T., Fujimi S. Prolonged enhancement of cytotoxic T lymphocytes in the post-recovery state of severe COVID-19. *J. Intensive Care*, 2021, Vol. 9, 76. doi: 10.1186/s40560-021-00591-3.
11. Persson B.D., John L., Rafie K., Strebl M., Frängsmyr L., Ballmann M.Z., Mindler K., Havenga M., Lemckert A., Stehle T., Carlson L.A., Arnberg N. Human species D adenovirus hexon capsid protein mediates cell entry through a direct interaction with CD46. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2021, Vol. 118, no. 3, e2020732118. doi: 10.1073/pnas.2020732118.
12. Stein K.R., Gardner T.J., Hernandez R.E., Kraus T.A., Duty J.A., Ubarretxena-Belandia I., Moran T.M., Tortorella D. CD46 facilitates entry and dissemination of human cytomegalovirus. *Nat. Commun.*, 2019, Vol. 10, no. 1, 2699. doi: 10.1038/s41467-019-10587-1.
13. Verdecchia P., Cavallini C., Spanevello A., Angelini F. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-cov-2 infection. *Eur. J. Intern. Med.*, 2020, Vol. 76, pp. 14-20.

14. Wu Y., Huang X., Sun J., Xie T., Lei Y., Muhammad J., Li X., Zeng X., Zhou F., Qin H., Shao L., Zhang Q. Clinical characteristics and immune injury mechanisms in 71 patients with COVID-19. *mSphere*, 2020, Vol. 5, no. 4, e00362-20. doi: 10.1128/mSphere.00362-20.

Авторы:

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

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

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

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

Зурочка В.А. — д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург; старший научный сотрудник НИИ иммунобиотехнологии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Ху Дэшэн — профессор кафедры интегрированной традиционной китайской и западной медицины, госпиталь Юнион, медицинский колледж Тунци, Хуачжунский университет науки и технологий, Ухань, Китай

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

Сарапульцев А.П. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург; директор научно-образовательного Российско-китайского центра системной патологии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Authors:

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

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

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

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

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

Hu Desheng, Professor, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

Ryabova L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Life Security, Emergency Medicine, First Aid and Urgent Care, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Sarapultsev A.P., PhD, MD (Biology) Leading Research Associate, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg; Director, Russian-Chinese Educational Center at the South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМОСВЯЗИ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА И РЕЗУЛЬТАТОВ ОЦЕНКИ НЕЙРОКОГНИТИВНОЙ ФУНКЦИИ У ЛЮДЕЙ, ЖИВУЩИХ С ВИЧ: ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Кныш С.В.¹, Скляр Л.Ф.², Черкасова Ю.С.³, Черникова А.А.^{3,4},
Кныш А.А.¹, Невежкина Т.А.¹, Чагина Е.А.¹**

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

² ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

³ ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», г. Владивосток, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Резюме. ВИЧ-инфекция тесно связана с поражением нервной системы и даже не смотря на применение антиретровирусной терапии, остается высокий риск развития неврологических осложнений. Учитывая ограниченную проницаемость гематоэнцефалического барьера, возможность его поражения как напрямую белками ВИЧ-инфицированных клеток, так и опосредованно иммунной системой, путем индукции выработки медиаторов воспаления, вовлечение центральной нервной системы в патогенез ВИЧ-инфекции остается лишь вопросом времени. ВИЧ-ассоциированные нейрокогнитивные расстройства (ВАНР) — это полиэтиологичное патологическое состояние, связанное с прямым и опосредованным поражением нейронов при ВИЧ-инфекции. Роль взаимодействия врожденной иммунной системы и медиаторов нервной системы при вирусных инфекциях позволяет предположить, что у людей, склонных к развитию ВАНР при ВИЧ-инфекции, могут быть выявлены специфические изменения в содержании, а также соотношении про- и противовоспалительных цитокинов, — одних из наиболее полипотентных медиаторов иммунной регуляции. Цель исследования — охарактеризовать особенности сывороточного содержания и взаимосвязи показателей факторов врожденного иммунитета с результатами нейрокогнитивного тестирования у людей, живущих с ВИЧ.

В исследование было включено 123 человека, из которых 93 человека — люди, живущие с ВИЧ-инфекцией, разделенные на 3 группы по стадиям ВИЧ-инфекции, согласно Российской классификации ВИЧ-инфекции; 30 человек — группа условно здоровых добровольцев, сопоставимых по возрасту и полу с представителями основных групп и представляющая группу контроля. Определение содержания IL-1 β , IL-10 в сыворотке венозной крови осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа. Уровень CD4⁺T-лимфоцитов определялся методом проточной цитометрии.

Адрес для переписки:

Кныш Сергей Васильевич
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.
Тел.: 8 (914) 662-65-23.
E-mail: immunolog.vl@gmail.com

Address for correspondence:

Knysh Sergey V.
Pacific State Medical University
690002, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakov ave., 2.
Phone: 7 (914) 662-65-23.
E-mail: immunolog.vl@gmail.com

Образец цитирования:

С.В. Кныш, Л.Ф. Скляр, Ю.С. Черкасова, А.А. Черникова, А.А. Кныш, Т.А. Невежкина, Е.А. Чагина «Характеристика взаимосвязи факторов врожденного иммунитета и результатов оценки нейрокогнитивной функции у людей, живущих с ВИЧ: промежуточные результаты исследования» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 437-444. doi: 10.46235/1028-7221-1176-RBT
© Кныш С.В. и соавт., 2022

For citation:

S.V. Knysh, L.F. Sklyar, Yu.S. Cherkasova, A.A. Chernikova, A.A. Knysh, T.A. Nevezhkina, E.A. Chagina "Relationships between the factors of innate immune system and results of neurocognitive function parameters in the persons living with HIV infection: interim results of the study", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 437-444. doi: 10.46235/1028-7221-1176-RBT
DOI: 10.46235/1028-7221-1176-RBT

Нейрокогнитивное тестирование с использованием таблиц Шульте, теста Мюнстерберга проводилось медицинским психологом, согласно общепринятым методикам.

Выявлено достоверное повышение содержания IL-10 в сыворотке крови представителей основных групп в сравнении с группой контроля, а также в группе III в сравнении со значениями из групп I и II. Уровни IL-1 β , CD4⁺T-лимфоцитов были достоверно ниже в группе III, в сравнении со всеми остальными группами. Показатель эффективности работы, определяемый в тесте с таблицами Шульте, был снижен во всех группах, относительно группы контроля, с достоверным преобладанием результатов, полученных в группах I и II над результатами участников из группы III. Результат теста Мюнстерберга был в равной степени снижен во всех основных группах относительно значений, полученных в группе контроля. При оценке коэффициента Спирмена было установлено наличие различных профилей корреляционных связей в зависимости от стадии заболевания.

Ключевые слова: нейрокогнитивная дисфункция, врожденный иммунитет, ВИЧ, цитокины, ВАHP, тест Мюнстерберга

RELATIONSHIPS BETWEEN THE FACTORS OF INNATE IMMUNE SYSTEM AND RESULTS OF NEUROCOGNITIVE FUNCTION PARAMETERS IN THE PERSONS LIVING WITH HIV INFECTION: INTERIM RESULTS OF THE STUDY

Knysh S.V.^a, Sklyar L.F.^b, Cherkasova Yu.S.^c, Chernikova A.A.^{c, d},
Knysh A.A.^a, Nevezhkina T.A.^a, Chagina E.A.^a

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b M. Vladimirsky Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

^c Regional Clinical Hospital No. 2, Vladivostok, Russian Federation

^d Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. HIV infection is closely associated with damage to the nervous system, even despite usage of antiretroviral therapy. Thus, the patients are at a high risk for neurological complications. Due to limited permeability of the blood-brain barrier, the opportunity of its damage, both directly by the proteins of HIV-infected cells and indirectly, by immune system, e.g., inducing the production of inflammatory mediators, the involvement of the central nervous system in pathogenesis of HIV infection seems to be only a matter of time. HIV-associated neurocognitive disorders (HAND) comprise a poly-etiological pathological condition associated with direct and indirect damage to neurons in HIV infection. The role of interaction between the innate immune system and nervous system mediators in viral infections suggests that the specific changes in content and ratios of pro- and anti-inflammatory cytokines that are among the most polypotent mediators of immune regulation can be detectable in the persons prone to the development of HAND in HIV infection. The purpose of the present study was to characterize the features of serum content and the relationship between the indexes of innate immunity factors with the results of neurocognitive testing in the persons living with HIV.

123 persons were included in the study, of which 93 subjects live with HIV infection. They were divided into 3 groups according to the stages of HIV infection, according to the Russian Classification of HIV infection. 30 persons represented a group of healthy volunteers, comparable in age and gender with the members of main groups, and served as a control group. Determination of IL-1 β and IL-10 contents in blood serum was carried out by solid-phase enzyme immunoassay. The level of CD4⁺T lymphocytes was determined by flow cytometry. Neurocognitive testing using Schulte tables, the Munsterberg test was conducted by a medical psychologist, according to generally accepted methods.

A significant increase in the serum IL-10 content in subjects from the main groups was revealed as compared with the control group, as well as in group III compared with the values groups I and II. The levels of IL-1 β , CD4⁺T lymphocytes were significantly lower in group III, compared with all other groups. The personal performance index determined by testing with Schulte tables was reduced in all groups, relative to the controls, with a significant predominance of the results in groups I and II over the results of the participants from group

III. The scores in Munsterberg test were equally diminished in all the main groups compared to the control values. When assessing the Spearman coefficient, the presence of various correlation profiles was established, depending on the stage of the disease.

Keywords: neurocognitive dysfunction, innate immunity, HIV, cytokines, HAND, Munsterberg test

Введение

С момента обнаружения первого случая ВИЧ-инфекции в России в 1987 году, показатели немаломо росли и на конец 2021 года составляло более 1,5 млн случаев. Более 400 тысяч человек умерло за весь период наблюдения, при этом лишь 68% людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), состояло на диспансерном учете в 2021 году, а получало антиретровирусную терапию (АРТ) – 82% [2]. Несмотря на активно реализуемую политику профилактики и просвещения о проблеме ВИЧ-инфекции, эпидемиологическая картина остается тревожной. А учитывая длительный период субклинического течения инфекции и низкие охваты тестирования среди уязвимых групп населения, можно полагать, что реальная заболеваемость ВИЧ инфекцией значительно превышает задокументированные значения. В тоже время даже среди получающих терапию ЛЖВ, остается высоким процент случаев прогрессирования заболевания, связанный как с низкой приверженностью к терапии, так и с иными факторами [8].

ВИЧ-инфекция тесно связана с поражением нервной системы, и, даже несмотря на применение антиретровирусной терапии, остается высокий риск развития неврологических осложнений. ВИЧ поражает преимущественно CD4⁺T-лимфоциты и клетки моноцитарно/макрофагального происхождения, что приводит к активной диссеминации возбудителя по всему организму, с последующим развитием хронического мультисистемного воспаления – процесса, реализуемого через несколько различных механизмов, включающих в себя как неадекватный ответ иммунной системы на кишечную микробиоту, так и активацию иммунной системы на фоне АРТ с последующим формированием синдрома восстановления иммунитета [1, 14]. Учитывая ограниченную проницаемость гематоэнцефалического барьера, возможность его поражения как напрямую белками ВИЧ-инфицированных клеток, так и опосредованно иммунной системой, путем индукции выработки медиаторов воспаления, вовлечение центральной нервной системы в патогенез ВИЧ-инфекции остается лишь вопросом времени. Применение АРТ по мнению большинства авторов может благоприятно сказаться на целостности гематоэнцефалического барьера, однако, существуют и противоположные мнения, базирующиеся на церебро- и вазотоксич-

ности препаратов, что делает вопрос адекватной терапии ВИЧ-ассоциированных поражений центральной нервной системы трудноразрешимым в настоящее время [6, 7, 10].

ВИЧ-ассоциированные нейрокогнитивные расстройства (ВАНР) – это полиэтиологическое патологическое состояние, связанное с прямым и опосредованным поражением нейронов при ВИЧ-инфекции и основанное на трех основных диагностических категориях: бессимптомные нейropsychологические расстройства (БНР); легкие нейрокогнитивные расстройства (ЛНР) и ВИЧ-ассоциированная деменция [5]. Особо важное место занимают первые две категории, по причине того, что при БНР или ЛНР качество жизни ЛЖВ остается достаточно сохранным и чаще всего не выявляется в быту или на рабочем месте. Это обуславливает высокую важность нейрокогнитивных тестов для данной категории пациентов, однако, в определенной степени, является и «ловушкой», для специалиста, проводящего диагностику. Результаты подобных исследований, особенно при маловыраженных изменениях, сильно подвержены факторам образованности пациента, возраста, этнического происхождения, воспитания, поэтому однократное тестирование без оценки динамики может быть недостаточно точным и не продемонстрировать адекватную чувствительность, что обуславливает отсутствие единого мнения о том, какой набор тестов и шкал следует использовать в случае ВАНР [12].

Роль взаимодействия врожденной иммунной системы и медиаторов нервной системы при вирусных инфекциях позволяет предположить, что у людей, склонных к развитию БНР или ЛНР при ВИЧ-инфекции могут быть выявлены специфические изменения в содержании, а также соотношении про- и противовоспалительных цитокинов, – одних из наиболее полипотентных медиаторов иммунной регуляции [3, 4].

Цель исследования – охарактеризовать особенности сывороточного содержания и взаимосвязи показателей факторов врожденного иммунитета с результатами нейрокогнитивного тестирования у людей, живущих с ВИЧ.

Материалы и методы

В исследование было включено 123 человека, из которых 93 человека – люди, живущие с ВИЧ-инфекцией, разделенные на 3 группы по стадиям ВИЧ-инфекции, согласно Российской

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА УЧАСТНИКОВ ИССЛЕДОВАНИЯ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF SURVEY PARTICIPANTS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Parameter	Группа контроля (Г-0) Control group (G-0)	Группа I 3-я стадия (Г-1) Group I Stage 3 (G-1)	Группа II 4А стадия, ремиссия (Г-2) Group II Stage 4A, remission (G-2)	Группа III 4А стадия, прогрессия (Г-3) Group II Stage 4A, progression (G-3)
Количество, человек Amount, peoples	30	20	58	15
Половой состав группы, мужчин / женщин Gender composition of the group, male / female	15/15	10/10	29/29	10/5
Возраст, лет Age, years	35,5 (29,0-47,5)	37,5 (29,5-45,5)	43,5 (35,75-49,00)	38,0 (36,0-46,0)
Срок болезни, лет Duration of illness, years	–	2,0 (1,0-4,5)	8,0 (4,00-15,25)	4,0 (0,5-6,0)

классификации ВИЧ-инфекции; 30 человек – группа условно здоровых добровольцев, сопоставимых по возрасту и полу с представителями основных групп и представляющая группу контроля. Основные группы представлены пациентами, находящимися на амбулаторном лечении в Центре профилактики и борьбы со СПИД ГБУЗ ККБ № 2 г. Владивостока: группа I – пациенты с ВИЧ-инфекцией, стадия 3; группа II – пациенты с ВИЧ-инфекцией, стадия 4А, фаза ремиссии; группа III – пациенты с ВИЧ-инфекцией, стадия 4А, фаза прогрессии. Характеристика участников исследования представлена в таблице 1. У всех участников исследования было исключено наличие острых заболеваний, обострения иных хронических заболеваний. Определение содержания IL-1β, IL-10 в сыворотке венозной крови осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), с использованием анализатора Multiscan, наборов реактивов R&D Systems (каталожные номера DY217B, DY201). Уровень CD4⁺T-лимфоцитов определялся методом проточной цитометрии. Нейрокогнитивное тестирование с использованием таблиц Шульте, теста Мюнстерберга проводилось медицинским психологом, согласно общепринятым методикам. Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием программы IBM SPSS Statistics 26 методами непараметрической статистики. Нормальность распределения оценивалась методом Колмо-

рова–Смирнова, достоверность различий между сравниваемыми группами с использованием медианного критерия, U-критерия Манна–Уитни. Оценка корреляционных связей оценивалась с использованием корреляционного критерия Спирмена.

Результаты и обсуждение

Значения исследуемых показателей у участников групп представлено в таблице 2. Выявлено достоверное повышение содержания IL-10 в сыворотке крови представителей основных групп в сравнении с группой контроля, а также в группе III в сравнении со значениями из групп I и II. Уровни IL-1β, CD4⁺T-лимфоцитов были достоверно ниже в группе III, в сравнении со всеми остальными группами. Показатель эффективности работы, определяемый в тесте с таблицами Шульте, был снижен во всех группах, относительно группы контроля, с достоверным преобладанием результатов, полученных в группах I и II над результатами участников из группы III. Результат теста Мюнстерберга был в равной степени снижен во всех основных группах относительно значений, полученных в группе контроля. При оценке коэффициента Спирмена было установлено наличие различных профилей корреляционных связей в зависимости от стадии заболевания, данные представлены в таблице 3.

ТАБЛИЦА 2. ЗНАЧЕНИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ОСНОВНЫХ ГРУПП, УЧАСТВУЮЩИХ В ИССЛЕДОВАНИИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. VALUES OF STUDIED PARAMETERS IN MAIN GROUPS, PARTICIPATING IN THE SURVEY, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Parameter	Группа контроля (Г-0) Control group (G-0)	Группа I 3-я стадия (Г-1) Group I Stage 3 (G-1)	Группа II 4А стадия, ремиссия (Г-2) Group II Stage 4A, remission (G-2)	Группа III 4А стадия, прогрессия (Г-3) Group II Stage 4A, progression (G-3)	р-значение p-value
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	8,17 (3,32-15,37)	17,86* (12,34-17,86)	14,13* (6,79-26,52)	40,28* (14,26-55,89)	p ₁ -p ₂ > 0,05 p ₁ -p ₃ < 0,01 p ₂ -p ₃ < 0,01
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	1,23 (0,79-2,26)	1,73 (1,25-2,09)	1,47 (1,07-2,18)	1,19* (0,89-1,28)	p ₁ -p ₂ > 0,05 p ₁ -p ₃ < 0,01 p ₂ -p ₃ < 0,05
CD4, клеток/мкл CD4, cells/μL	1020 (910-1300)	625,5* (500,50-857,75)	637,5* (354,75-885,00)	252,0* (90,0-309,0)	p ₁ -p ₂ > 0,05 p ₁ -p ₃ < 0,01 p ₂ -p ₃ < 0,01
Эффективность работы, с Effectiveness of work, sec	36,4 (31,5-39,8)	41,5* (37,90-46,95)	44,9* (38,2-54,4)	45,2* (38,8-59,2)	p ₁ -p ₂ < 0,05 p ₁ -p ₃ < 0,05 p ₂ -p ₃ > 0,05
Тест Мюнстерберга, слов Munsterberg Test, words	21 (19,0-24,0)	15* (13,0-17,0)	15* (12,0-18,0)	15* (11,0-17,0)	p ₁ -p ₂ > 0,05 p ₁ -p ₃ > 0,05 p ₂ -p ₃ > 0,05

Примечание. * – статистическая достоверность различий с группой контроля: p < 0,05.

Note. *, statistical significance of differences with the control group: p < 0.05.

Дискуссия об уровне IL-1β продолжает проблему дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов, вызванного ВИЧ. Классический взгляд сфокусирован на негативной роли IL-1β в патогенезе как ВАНР, так и самой ВИЧ-инфекции и, в большинстве исследований, отмечается преобладание уровня данного цитокина в сыворотке ЛЖВ, его снижение на фоне АРТ, однако без достижения контрольных цифр [11]. На данном этапе исследования нами было выявлено снижение уровня IL-1β только в группе III, на фоне прогрессирования заболевания. Учитывая отрицательную корреляцию показателя IL-1β с сроком болезни, а также его сильную положительную связь с результатом теста Мюнстерберга, мы можем предполагать, что данный цитокин играет различную роль в зависимости от стадии ВИЧ-инфекции и нельзя исключать его нейропротективную функцию на поздних этапах болезни.

Мнения о роли IL-10 при хронических вирусных инфекциях в целом, и ВИЧ-инфекции в частности, разнятся. В широком круге исследо-

ваний обсуждается протективная роль данного цитокина, направленная на сохранение уровня CD4⁺T-лимфоцитов и влияющая на благоприятный прогноз АРТ [13]. Однако в течение последних трех лет, на фоне активного применения высокоактивной АРТ, появились исследования, демонстрирующие иную картину. По мнению ряда авторов, высокий уровень IL-10 ассоциирован с индукцией персистенции ВИЧ в лимфатических узлах и иных резервуарах в человеческом организме [9]. Данные представленные в нашем исследовании позволяют признать вероятность существования негативного влияния IL-10 на патогенез ВИЧ-инфекции и ВАНР, что следует как из общего значимого повышения уровня IL-10 в группе III, так и наличия отрицательной корреляционной связи в этой группе между данным цитокином и показателем Теста Мюнстерберга, который позволяет судить о нарушении в одном из основных когнитивных доменов. Неоднозначная картина отрицательной корреляционной связи между уровнем IL-10 и давностью заболевания зафиксирована в группе II, в которой

ТАБЛИЦА 3. ЗНАЧЕНИЯ КОЭФФИЦИЕНТА КОРРЕЛЯЦИИ СПИРМЕНА МЕЖДУ ИССЛЕДУЕМЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ В ОСНОВНЫХ ГРУППАХ, УЧАСТВУЮЩИХ В ИССЛЕДОВАНИИ

TABLE 3. VALUES OF SPEARMEN CORRELATION COEFFICIENT BETWEEN STUDIED PARAMETER IN MAIN GROUPS

Группа Group		IL-1 β	IL-10	CD4	Срок болезни Duration of illness	Тест Мюнстерберга, слов Munsterberg Test, words
Группа I 3-я стадия (Г-1) Group I Stage 3 (G-1)	IL-1 β	1,000	-0,314	-0,036	0,805*	-0,195
	IL-10	-0,314	1,000	-0,200	-0,265	-0,138
	CD4	-0,036	-0,200	1,000	-0,449*	0,022
	Срок болезни Duration of illness	0,805*	-0,265	-0,449*	1,000	0,029
	Тест Мюнстер- берга, слов Munsterberg Test, words	-0,195	-0,138	0,022	0,029	1,000
Группа II 4А стадия, ремиссия (Г-2) Group II Stage 4A, remission (G-2)	IL-1 β	1,000	0,100	-0,300	-0,616	-0,092
	IL-10	0,100	1,000	-0,900*	-0,667*	-0,155
	CD4	-0,300	-0,900*	1,000	0,014	0,194*
	Срок болезни Duration of illness	-0,616	-0,667*	0,014	1,000	0,094
	Тест Мюнстер- берга, слов Munsterberg Test, words	-0,092	-0,155	0,194*	0,094	1,000
Группа III 4А стадия, прогрессия (Г-3) Group II Stage 4A, progression (G-3)	IL-1 β	1,000	0,300	-0,346	-0,443*	0,975*
	IL-10	0,300	1,000	-0,196	-0,201	-0,051*
	CD4	-0,346	-0,196	1,000	0,205	0,376
	Срок болезни Duration of illness	-0,443*	-0,201	0,205	1,000	-0,112
	Тест Мюнстер- берга, слов Munsterberg Test, words	0,975*	-0,051*	0,376	-0,112	1,000

Примечание. * – корреляция значима на уровне $p < 0,05$.

Note. *, correlation is significant at the level of $p < 0,05$.

на фоне АРТ достигнута ремиссия, что вероятно может быть свидетельством эффективности терапии и благоприятным признаком, в долгосрочной перспективе. В пользу данного суждения свидетельствует и наличие сильной отрицательной связи между уровнем IL-10 и количеством CD4⁺T-лимфоцитов в данной группе, что, учитывая достоверное преобладание последних в этой группе над значениями, зафиксированными

у пациентов из группы III, также может служить демонстрацией подавления продукции IL-10 на фоне ремиссии ВИЧ-инфекции.

Заключение

На текущем этапе исследования зафиксировано наличие ряда особенностей в состоянии врожденной иммунной системы, уровня CD4⁺T-лимфоцитов и нейрокогнитивного статуса ЛЖВ.

Зарегистрированные корреляционные связи, различающиеся в зависимости от стадии ВИЧ-инфекции подчеркивают сложность и многокомпонентность патогенеза данного заболевания и связанных с ним нарушений в нервной системе — ВАНР. Важным является также то, что у всех обследованных пациентов, не зависимо от стадии болезни, отмечалось ухудшение результатов нейрокогнитивных тестов, что подчеркивает влияние ВИЧ инфекции на состояние высшей нервной деятельности и требует дальнейшего, углубленного исследования. В рамках данного исследования планируется увеличить численность групп и расширить перечень исследуемых показателей врожденной иммунной системы и

их ассоциации со состоянием нейрокогнитивных функций ЛЖВ.

Благодарности

Авторы выражают признательность ректору ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России Шуматову Валентину Борисовичу, первому проректору ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России Гранковской Лидии Викторовне, проректору ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России Елисейевой Екатерине Валерьевне, а также заведующему кафедрой, д-ру мед. наук, профессору Маркеловой Елене Владимировне, за поддержку исследования в рамках внутривузовского научного гранта и программы кадрового резерва.

Список литературы / References

1. Боева Е.В., Беляков Н.А. Синдром восстановления иммунитета при ВИЧ-инфекции // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 2. С. 139-149. [Boeva E.V., Belyakov N.A. Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 2, pp. 139-149. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-139-149.
2. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2021 г. [Электронный ресурс] // Специализированный научно-исследовательский отдел по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2022. Режим доступа: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2022/03/Spravka-VICH-v-Rossii-na-31.12.2021-g..pdf>. [HIV infection in the Russian Federation on December 31, 2021 [Electronic resource] // Specialized Research Department for the Prevention and Control of AIDS of the Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор. 2022]. Access mode: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2022/03/Spravka-VICH-v-Rossii-na-31.12.2021-g..pdf>.
3. Кныш С.В., Маркелова Е.В., Зенина А.А., Костюшко А.В., Федянина Л.Н. Роль белка S100b и BDNF в иммунопатогенезе нейровоспаления у лиц с индуцированной иммунокомпрометацией // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 237-242. [Knysh S.V., Markelova E.V., Zenina A.A., Kostushko A.V., Fedyanina L.N. Role of S100b protein and BDNF in immunopathogenesis of neuroinflammation in the patients with induced immunocompromised state. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 237-242. (In Russ.)]
4. Кныш С.В., Маркелова Е.В., Симакова А.И., Караулов А.В. Показатели системы нейропептидов в острый период опоясывающего герпеса // Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 2. С. 329-337. [Knysh S.V., Markelova E.V., Simakova A.I., Karaulov A.V. Neuropeptide system parameters in acute herpes zoster. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, Vol. 10, no. 2, pp. 329-337. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-TFO-1256.
5. Трофимова Т.Н., Катаева Г.В., Громова Е.А., Рассохин В.В., Боева Е.В., Симакина О.Е., Беляков Н.А. ВИЧ-ассоциированные нейрокогнитивные нарушения: диагностика, выявление причин и эффективность терапии // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии, 2018. Т. 10, № 4. С. 7-24. [Trofimova T.N., Katayeva G.V., Gromova E.A., Rassokhin V.V., Boeva E.V., Simakina O.E., Belyakov N.A. HIV-associated neurocognitive disorders: diagnosis, detection of causes and therapy efficiency. *VICH-infektsiya i immunosuppressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2018, Vol. 10, no. 4, pp. 7-24. (In Russ.)]
6. Bertrand L., Nair M., Toborek M. Solving the blood-brain barrier challenge for the effective treatment of HIV replication in the central nervous system. *Curr. Pharm. Des.*, 2016, Vol. 22, no. 35, pp. 5477-5486.
7. Bertrand L., Velichkovska M., Toborek, M. Cerebral Vascular Toxicity of Antiretroviral Therapy. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 2021, Vol. 16, pp. 74-89.
8. Chen L., Yang J., Zhang R., Xu Y., Zheng J., Jiang J., Jiang J., He L., Wang N., Yeung P.C., Oan X. Rates and risk factors associated with the progression of HIV to AIDS among HIV patients from Zhejiang, China between 2008 and 2012. *AIDS Res. Ther.*, 2015, Vol. 12, 32. doi: 10.1186/s12981-015-0074-7.
9. Harper J., Ribeiro S.P., Chan C.N., Aid M., Deleage C., Micci L., Pino M., Cervasi B., Raghunathan G., Rimmer E., Ayanoglu G., Wu G., Shenvi N., Barnard R.J., Del Prete G.Q., Busman-Sahay K., Silvestri G., Kulpa D.A., Bosinger S.E., Easley K.A., Howell B.J., Gorman D., Hazuda D.J., Estes J.D., Sekaly R.P., Paiardini M. Interleukin-10 contributes to reservoir establishment and persistence in SIV-infected macaques treated with antiretroviral therapy. *J. Clin. Invest.*, 2022, Vol. 132, no. 8, e155251. doi: 10.1172/JCI155251.
10. McRae M. HIV and viral protein effects on the blood brain barrier. *Tissue Barriers*, 2016, Vol. 4, no. 1, e1143543. doi: 10.1080/21688370.2016.1143543.

11. Osuji F.N., Onyenekwe C.C., Ahaneku J.E., Nkiruka R.U. The effects of highly active antiretroviral therapy on the serum levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in HIV infected subjects. *J. Biomed. Sci.*, 2018, Vol. 25, 88. doi: 10.1186/s12929-018-0490-9.
12. Vastag Z., Fira-Mladinescu O., Rosca E.C. HIV-Associated Neurocognitive Disorder (HAND): Obstacles to Early Neuropsychological Diagnosis. *Int. J. Gen. Med.*, 2022, Vol. 15, pp. 4079-4090.
13. Villacres M.C., Kono N., Mack W.J., Nowicki M.J., Anastos K., Augenbraun M., Liu C., Landay A., Greenblatt R.M., Gange S.J., Levine A.M. Interleukin 10 responses are associated with sustained CD4 T-cell counts in treated HIV infection. *J. Infect. Dis.*, 2012, Vol. 206, no. 5, pp. 780-789. doi: 10.1093/infdis/jis380.
14. Xie Y., Sun J., Wei L., Jiang H., Hu C., Yang J., Huang Y., Ruan B., Zhu B. Altered gut microbiota correlate with different immune responses to HAART in HIV-infected individuals. *BMC Microbiol.*, 2021, Vol. 21, 11. doi: 10.1186/s12866-020-02074-1.

Авторы:

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

Скляр Л.Ф. — д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Черкасова Ю.С. — медицинский психолог ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», г. Владивосток, Россия

Черникова А.А. — к.м.н., и. о. заместителя главного врача по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2»; доцент Школы Медицины ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Кныш А.А. — студентка факультета общественного здоровья ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Невежкина Т.А. — ассистент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

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

Authors:

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

Sklyar L.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Infectious Diseases, M. Vladimirovsky Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Cherkasova Yu.S., Medical Psychologist, Regional Clinical Hospital No. 2, Vladivostok, Russian Federation

Chernikova A.A., PhD (Medicine), Deputy Head for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Regional Clinical Hospital No. 2; Associate Professor, School of Medicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Knysh A.A., Student, Clinical Psychology, Faculty of Public Health, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Nevezhkina T.A., Assistant Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

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

Поступила 13.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 13.07.2022
Accepted 28.07.2022

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ *IN VITRO* ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ФЕНОТИПА СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКОЙ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА

Ковалева С.В.¹, Пиктурно С.Н.¹, Чудилова Г.А.¹, Ломтатидзе Л.В.¹,
Крутова В.А.¹, Малиновская В.В.², Нестерова И.В.^{1,3}

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Краснодар, Россия

² ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика
Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Резюме. Хронические воспалительные заболевания органов малого таза у женщин представляют собой одну из основных и недостаточно изученных проблем в гинекологии во всем мире с неблагоприятными медицинскими и социально-экономическими последствиями, такими как хроническое течение воспалительного процесса, синдром хронической тазовой боли, внематочная беременность, бесплодие. В связи с тенденцией к росту хронизации и рецидивирования инфекционно-воспалительных заболеваний генитального тракта является необходимым дальнейшее изучение эффекторных и регуляторных механизмов иммунной системы. Особенно актуальным является изучение трансформации рецепторного аппарата нейтрофильных гранулоцитов (НГ), как основных клеток противомикробной защиты, с дальнейшим обоснованием применения таргетной иммуномодулирующей терапии. Цель исследования – оценить эффект влияния рекомбинантного IFN α 2b в системе *in vitro* на негативно трансформированный фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ и CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ у иммунокомпрометированных женщин в период обострения хронических воспалительных заболеваний органов малого таза. Проведено тестирование НГ периферической крови 10 условно здоровых женщин от 20–40 лет (группа сравнения), 17 женщин 20–40 лет в период обострения хронических воспалительных заболеваний органов малого таза (группа 1) соответствующего возраста. Влияние рекомбинантного IFN α 2b на НГ перифериче-

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123, кв. 1.
Тел.: 8 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Address for correspondence:

Nesterova Irina V.
Peoples' Friendship University of Russia
117513, Russian Federation, Moscow,
Leninsky ave., 123, apt 1.
Phone: 7 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Образец цитирования:

С.В. Ковалева, С.Н. Пиктурно, Г.А. Чудилова,
Л.В. Ломтатидзе, В.А. Крутова, В.В. Малиновская,
И.В. Нестерова «Экспериментальное
перепрограммирование *in vitro* трансформированного
фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов
женщин с хронической рецидивирующей инфекционно-
воспалительной патологией генитального тракта»
// Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 4. С. 445-452. doi: 10.46235/1028-7221-1205-EIV
© Ковалева С.В. и соавт., 2022

For citation:

S.V. Kovaleva, S.N. Pikturno, G.A. Chudilova,
L.V. Lomtadidze, V.A. Krutova, V.V. Malinovskaya,
I.V. Nesterova "Experimental *in vitro* reprogramming
of transformed phenotype of neutrophil granulocyte
subpopulations in women with chronic recurrent infectious and
inflammatory conditions of genital tract", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,
Vol. 25, no. 4, pp. 445-452.
doi: 10.46235/1028-7221-1205-EIV
DOI: 10.46235/1028-7221-1205-EIV

ской крови 17 женщин с ХВЗОМТ оценивали в системе *in vitro* (группа 2). Методом проточной цитометрии (CYTOMICS FC500, США) определяли количество НГ и уровень экспрессии рецепторов субпопуляций

CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ и CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ НГ. У женщин в период обострения хронических воспалительных заболеваний органов малого таза выявлено увеличение плотности экспрессии поверхностных мембранных молекул: в субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ – CD16 на 91,7%, а в субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ НГ – CD16 на 116% и CD32 на 81% относительно группы сравнения. В системе *in vitro* при инкубации периферической крови с рекомбинантным IFN α 2b (группа 2) было выявлено увеличение количества НГ субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ относительно группы сравнения и группы 1 и значительное увеличение плотности экспрессии CD16 на 212%, CD11b на 56% и CD32 на 83% относительно группы сравнения и плотности экспрессии CD16 на 163%, CD11b на 223% относительно группы 1. Изменение плотности экспрессии мембранных молекул выявлено и в активационной субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ НГ: увеличение CD16 на 232% относительно группы сравнения и снижение плотности экспрессии CD64 на 150% на фоне увеличения плотности экспрессии CD16 на 54% и CD11b на 103% относительно группы 1, что свидетельствует о перепрограммировании негативно трансформированного фенотипа НГ и может расцениваться как позитивный иммуномодулирующий эффект, а также служит основанием для дальнейших исследований с целью разработки новых комплексных подходов к лечению ХВЗОМТ различной этиологии.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, фенотип, хронические воспалительные заболевания, органы малого таза, рекомбинантный IFN α 2b

EXPERIMENTAL *IN VITRO* REPROGRAMMING OF TRANSFORMED PHENOTYPE OF NEUTROPHIL GRANULOCYTE SUBPOPULATIONS IN WOMEN WITH CHRONIC RECURRENT INFECTIOUS AND INFLAMMATORY CONDITIONS OF GENITAL TRACT

Kovaleva S.V.^a, Pikturno S.N.^a, Chudilova G.A.^a, Lomtadze L.V.^a, Krutova V.A.^a, Malinovskaya V.V.^b, Nesterova I.V.^{a, c}

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Chronic inflammatory diseases of the pelvic organs (CIDPO) in women represent one of the urgent and insufficiently studied problems in gynecology across the world. These disorders are followed by adverse medical and socio-economic consequences, i.e., chronic local inflammatory process, chronic pelvic pain syndrome, ectopic pregnancy, infertility. Due to increasing chronicity and recurrence rates of genital infections and inflammatory diseases, there is a need for further studying the effector and regulatory mechanisms of immune system. Of special relevance are the studies of the receptor transformation in neutrophilic granulocytes (NG), the basic population of antimicrobial defense, with further substantiation of targeted immunomodulatory therapy. Purpose of the present study was to assess transformation of neutrophilic granulocytes from

CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ to that CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ phenotype in immunocompromised women with CIDPO exacerbation, as well as to evaluate the possibility of *in vitro* reprogramming the neutrophilic phenotype under the action of recombinant interferon (recIFN α 2b). Peripheral blood neutrophils were tested in the comparison group of 10 conditionally healthy women 20 to 40 years old, and in 17 women (20-40 years old) with the CIDPO exacerbation (group 1). The *in vitro* effect of recIFN α 2b on the blood neutrophils was evaluated for 17 women with CIDPO (group 2). Flow cytometric technique (FCT, CYTOMICS FC500, Beckman Coulter, USA) was used to determine the number of NGs and cell receptor expression levels of

neutrophilic CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺NG and CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ subpopulations. In peripheral blood of women with CIDPO exacerbation, an increased expression density of surface membrane molecules was revealed by means of FCT: in the subpopulation CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺NG, CD16 proved to be 91.7% higher; in CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺NG subpopulation, CD16 was increased by 116%, and CD32 being higher by 81% against the comparison group. In the *in vitro* system, during the incubation of PB with recIFN α 2b (group 2), we have revealed an increased number of CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ subpopulation relative to the comparison group and group 1, and significantly increased expression density of CD16 (by 212%); CD11b (by 56%), and CD32 (by 83%) than in comparison group, as well as higher density of CD16 expression by 163%; CD11b (by 223%) compared to group 1. The changes in expression density of membrane molecules was also detected by FCT for the activated subpopulation CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺NG, i.e., an increase in CD16 by 232% against control group, and decreased expression density of CD64 by 150% against the background, along with increased density of CD16 expression (by 54%), and CD11b (by 103%), relative to group 1, thus suggesting a reprogramming of negatively transformed NC phenotype. These findings may be considered a positive immunomodulatory effect providing a basis for further research in order to develop new integrated approaches to treatment of CIDPO of various etiologies.

Keywords: neutrophil granulocytes, phenotype, chronic inflammatory diseases, pelvic organs, recombinant IFN α 2b

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 19-415-230001 p_a.

Введение

К хроническим воспалительным заболеваниям органов малого таза (ХВЗОМТ) относят все воспалительные процессы верхнего отдела генитального тракта у женщин (метрит, сальпингит, эндометрит, оофорит). Они могут проявляться в виде отдельных нозологических форм или в различных сочетаниях. Согласно исследованиям последних лет эти заболевания носят полимикробный характер, нередко ассоциированы с условно-патогенными микроорганизмами и вирусами [6]. Принципиальное значение в патогенезе ХВЗОМТ отводится иммунной системе (ИС), от адекватного или дефектного функционирования которой зависят особенности течения и исход заболевания [4]. Обращает на себя внимание тот факт, что, несмотря на оптимизацию методов диагностики и лечения, современные научные исследования свидетельствуют об увеличении количества женщин с хроническими вялотекущими формами воспалительных процессов генитального тракта в амбулаторной практике до 60–65% и в стационарах до 30% [5]. Отмечается увеличение заболеваний с тяжелым и осложненным течением, упорным рецидивированием воспалительного процесса и отсутствием позитивного эффекта на проводимую адекватную этиотропную и патогенетическую терапию, что свидетельствует о присутствии клинических признаков иммунокомпрометированности, совокупность которых подтверждает наличие приобретенной дисрегуляции ИС. Следует подчеркнуть, что именно

нарушения функционирования ИС системного и локального характера таких женщин предрасполагают к возникновению нетипично протекающих острых или хронических инфекционно-воспалительных заболеваний репродуктивного тракта, становятся причиной хронизации инфекционно-воспалительных процессов генитальной и экстрагенитальной локализации различной этиологии, которые отличаются резистентностью к общепринятой терапии – противовирусной, антибактериальной, противогрибковой и противовоспалительной [3]. В первую очередь это может быть связано с нарушением функционирования нейтрофильных гранулоцитов (НГ). Известно, что НГ первыми реагируют на вторжение патогенных и преобладание в микробиоме условно-патогенных микроорганизмов, а представители нормальной микрофлоры (лакто- и бифидобактерии) оказывают регулирующее действие на состояние микробиоценоза органов малого таза, стимулируя образование NET [7]. Согласно современным научным данным существует целый ряд субпопуляций НГ с различным фенотипом и, как следствие, различными функциями, как иммуностимулирующими, так и иммуносупрессивными [1].

Противомикробная активность НГ ассоциирована с ведущими поверхностными мембранными рецепторами. CD16 (Fc γ RIII) – рецептор, отвечающий за цитотоксическое действие, дегрануляцию, кислородный взрыв и пролиферацию [2]. Повышение уровня экспрессии CD16 подтверждает функциональную активность НГ, а его низкий уровень на мембранной поверхности НГ характерен для незрелых НГ [10]. «CD32 (Fc γ RII) – цитоплазматический иммунорецептор активации тирозина, экспрессия которого при-

водит в действие NADPH-оксидазный комплекс, опосредует эндоцитоз, стимулирует секреторную активность, цитотоксическое действие и иммуномодулирующую функцию НГ» [11]. «CD11b (Mac-1 или рецептор к компоненту комплемента CR3a) – сигнальный партнер для других рецепторов, регулирует хемотаксис НГ в очаг воспаления, адгезию, фагоцитоз, респираторный взрыв и дегрануляцию. Следствием блокировки CD11b является дефект в активации Fcγ-рецепторов и нарушение фагоцитарной функции НГ» [8]. «CD64 (FcγRI) – рецептор практически, не экспрессируется на мембране НГ периферической крови здоровых лиц, а только на активированных НГ. Повышение экспрессии CD64 на мембране НГ происходит при бактериальной инфекции. Рецепторы CD64 и CD11b являются диагностическими маркерами бактериальной инфекции, тяжести заболевания, продолжительности и исхода воспалительного процесса» [9, 12]. Значимость экспрессии всех этих рецепторов в диагностике различных заболеваний неоднозначна, что требует дополнительных экспериментальных и клинических исследований.

Исходя из вышеизложенного, повышенный интерес представляют субпопуляции НГ с поверхностными мембранными маркерами CD11b, CD64, CD32, CD16, а также возможности их переоснащения под действием иммунотропных субстанций при рецидивирующих ХВЗОМТ у женщин.

Цель исследования – оценить эффект влияния рекомбинантного интерферона IFNα2b (рекIFNα2b) в системе *in vitro* на негативно трансформированный фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺, CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ у иммунокомпрометированных женщин в период обострения ХВЗОМТ.

Материалы и методы

Исследование проводилось в три этапа.

Первый этап – исследовали НГ в образцах периферической крови (ПК) 17 женщин от 20 до 40 лет в период обострения ХВЗОМТ различной этиологии (бактериальной, вирусной, грибковой или их ассоциаций) с клиническими признаками иммунокомпрометированности – длительность анамнеза заболевания более 5 лет, частые обострения (3 и более раз в год) или вялотекущее затяжное течение обострений, отсутствие выраженного клинического эффекта на фоне системной и местной противовоспалительной терапии. Из них 7 женщин наблюдались с диагнозом первичное бесплодие с применением в анамнезе в комплексном лечении программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), завершив-

шихся неоднократными неудачами экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) (группа 1).

На втором этапе исследованы образцы ПК 10 условно здоровых женщин репродуктивного возраста от 20–40 лет (группа сравнения), обратившихся в клинику с целью выбора метода контрацепции.

Третий этап – в системе *in vitro* оценивали влияние рекIFNα2b на НГ ПК женщин в период обострения ХВЗОМТ (группа 2) – инкубировали НГ ПК с рекIFNα2b в конечной концентрации 50 МЕ/мкл при температуре 37 °С в течение 60 минут.

Во всех 3 группах определяли процентное содержание субпопуляций НГ (%НГ), одновременно несущих CD11b, CD64, CD16, CD32 рецепторы, и плотность экспрессии данных рецепторов по MFI методом проточной цитометрии (CYTOMICS FC500, США) с применением соответствующих моноклональных антител. Для статистической обработки полученных данных использовались пакеты программ Microsoft Excel 2016, StatPlus 2010 и непараметрические тесты – критерии Вилкоксона и Манна–Уитни. Результаты выражали в виде медианы (верхний и нижний квартиль) – Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Статистически значимыми различия принимали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке результатов исследования показано, что в образцах ПК группы сравнения (условно здоровые женщины) субпопуляция CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ представлена в 96,60 (94,85–97,51) %, а субпопуляция CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ в 0,30 (0,12–0,95) % и при этом плотность экспрессии мембранных молекул была вариабельной.

При сравнении относительного содержания субпопуляций НГ CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ и CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ не выявлено значимых изменений в группе 1 и группе сравнения. Однако, выявлены статистически значимые различия в фенотипе данных субпопуляций, в частности увеличение плотности экспрессии поверхностных мембранных молекул по MFI: CD16 на 91,7% в «сторожевой» субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ, CD16 на 116% и CD32 на 81% в активированной субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ ($p_{1-3} < 0,05$) (табл. 1).

При анализе результатов влияния рекIFNα2b в ПК в системе *in vitro* на содержание и мембранную экспрессию рецепторов субпопуляций НГ CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ и CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ также наблюдается увеличение ряда показателей. Статистически значимое увеличение ко-

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И ПЛОТНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ CD64, CD16, CD32, CD11b У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН, ЖЕНЩИН В ПЕРИОД ОБОСТРЕНИЯ ХВЗОМТ И ПОД ВЛИЯНИЕМ $\text{reclFN}\alpha 2\text{b}$ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO* В ПЕРИОД ОБОСТРЕНИЯ ХВЗОМТ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. CHANGES IN NEUTROPHIL GRANULOCYTE SUBPOPULATIONS AND THE EXPRESSION DENSITY OF CD64, CD16, CD32, CD11b SURFACE RECEPTORS IN CONDITIONALLY HEALTHY WOMEN, WOMEN DURING THE PERIOD OF EXACERBATION OF CIDPO AND UNDER THE INFLUENCE OF $\text{reclFN}\alpha 2\text{b}$ IN AN *IN VITRO* EXPERIMENT DURING THE PERIOD OF EXACERBATION OF CIDPO, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Indicator	Группа сравнения – ПК условно здоровых женщин Comparison group – PBs of conditionally healthy women	Группа 1 – ПК женщин в период обострения ХВЗОМТ Group 1 – PB of women in the period of exacerbation of CIDPO	Группа 2 – ПК женщин в период обострения ХВЗОМТ + $\text{reclFN}\alpha 2\text{b}$ Group 2 – PB of women in the period of exacerbation of CIDPO + $\text{reclFN}\alpha 2\text{b}$
CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺			
%НГ %NG	96,60 (94,85-97,51)	94,8 (92,39-95,86)	99,10 (98,00-99,43)* ^
MFI CD16	47,00 (35,60-58,10)	90,1 (77,82-116,75)*	147,00 (139,00-162,00)* ^
MFI CD32	3,44 (2,59-4,29)	4,68 (4,13-6,12)	6,31 (5,05-9,48)*
MFI CD11b	48,60 (33,42-56,02)	23,4 (19,52-28,97)	75,70 (57,15-80,20)* ^
CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺			
%НГ %NG	0,30 (0,12-0,95)	0,95 (0,75-2,06)	0,87 (0,50-1,93)
MFI CD64	6,47 (3,80-10,60)	8,9 (6,60-17,62)	3,48 (3,24-5,90)^
MFI CD16	46,30 (40,30-69,00)	99,7 (88,47-127,00)*	154,00 (137,00-176,00)* ^
MFI CD32	8,71 (4,65-11,45)	15,8 (12,60-21,17)*	13,90 (11,25-17,70)
MFI CD11b	33,70 (27,50-56,70)	34,15 (20,95-48,52)	69,60 (55,95-90,27)^

Примечание. * – достоверность различий показателей от значений группы сравнения, $p < 0,05$; ^ – достоверность различий показателей по отношению к группе 1 $p < 0,05$.

Note. *, the reliability of differences in indicators from the values of the comparison group, $p < 0.05$; ^, the reliability of differences in indicators in relation to group 1 $p < 0.05$.

личества НГ «сторожевой» субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ на 2% и 4% соответственно по сравнению с их уровнем в группе сравнения и в группе 1 ($p_{1,2} < 0,05$). Также установлено изменение фенотипических характеристик субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ: увеличилась плотность экспрессии CD16 на 212%, CD11b на 56% и CD32 на 83% относительно группы сравнения и увеличилась плотность экспрессии CD16 на 163%, CD11b на 223% относительно группы 1 ($p_{1,5} < 0,05$). В активационной субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ также прослеживается изменение плотности экспрессии мембранных молекул по MFI: ста-

тистически значимое увеличение CD16 на 232% относительно группы сравнения и снижение плотности экспрессии CD64 на 150% на фоне увеличения плотности экспрессии CD16 на 54% и CD11b на 103% относительно группы 1.

Заключение

На основании вышеизложенного у иммунокомпromетированных женщин с период обострения ХВЗОМТ выявлены варианты негативной перестройки фенотипа субпопуляций НГ как сторожевой и преобладающей CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺ НГ, так и минорной CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ.

Фенотипический профиль субпопуляции CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺НГ характеризуется усилением экспрессии CD16, что говорит о ее активации. Увеличение плотности экспрессии CD16, CD32 прослеживается и в субпопуляции CD11b⁺CD64⁺CD32⁺CD16⁺НГ, что также свидетельствует о ее активации. При этом уровень CD64 в минорной субпопуляции статистически значимо не увеличивался, что не способствует полноценному осуществлению эффекторных функций НГ и может быть причиной поддержания хронического воспалительного процесса и отсутствия позитивного эффекта от проведенной этиопатогенетической терапии.

Перепрограммирование трансформированного фенотипа субпопуляций НГ под влиянием рекIFN α 2b в эксперименте *in vitro* связано с изменением субпопуляционного состава НГ и приростом «сторожевой» субпопуляции CD11b⁺CD64⁻CD32⁺CD16⁺ НГ, значительным изменением плотности экспрессии рецепторов, ответственных за эффекторные функции НГ, — CD16, CD32, CD11b, в сторону их увеличения, а также снижением плотности экспрессии CD64 — маркера остроты и тяжести бактериального процесса [10], что указывает на позитивный иммуномодулирующий эффект и является основой для создания новых комплексных подходов к лечению ХВЗОМТ у женщин.

Список литературы / References

1. Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Долгова Д.Р., Антонеева И.И., Песков А.Б., Генинг С.О. Фенотип циркулирующих нейтрофилов на разных стадиях неоплазии шейки матки // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1127-1138. [Abakumova T.V., Gening T.P., Dolgova D.R., Antoneeva I.I., Peskov A.B., Gening S.O. Phenotype of circulating neutrophils at different stages of cervical neoplasia. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1127-1138. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1127-1138.
2. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм (Часть 2) // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 1. С. 7-18. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18.
3. Нестерова И.В. Таргетная иммунотерапия при вторичных иммунодефицитах с инфекционным синдромом // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13, № 4 (22). С. 1512-1516. [Nesterova I.V. Targeted immunotherapy for secondary immunodeficiency with infectious syndrome. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 4 (22), pp. 1512-1516. (In Russ.)]
4. Обухова О.О., Трунов А.Н., Горбенко О.М., Шваюк А.П. Цитокины и местное хроническое воспаление в формировании бесплодия у женщин фертильного возраста // Сибирский научный медицинский журнал, 2019. Т. 39, № 6. С. 77-83. [Obukhova O.O., Trunov A.N., Gorbenko O.M., Shvayuk A.P. Cytokines and local chronic inflammation in the formation of infertility in women of fertile age. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*, 2019, Vol. 39, no. 6, pp. 77-83. (In Russ.)]
5. Сандакова Е.А., Осипович О.А., Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Эффективность вспомогательных репродуктивных технологий у женщин с гинекологическими и экстрагенитальными воспалительными заболеваниями в анамнезе // Медицинский альманах, 2017. № 6 (51). С. 69-72. [Sandakova E.A., Osipovich O.A., Godovalov A.P., Karpunina T.I. The effectiveness of assisted reproductive technologies in women with gynecological and extragenital inflammatory diseases in anamnesis. *Meditinskiy almanakh = Medical Almanac*, 2017, no. 6 (51), pp. 69-72. (In Russ.)]
6. Скворцов В.В., Луньков М.В., Скворцова Е.М. Диагностика и фармакотерапия воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева, 2018. Т. 5, № 4. С. 177-181. [Skvortsov V.V., Lunkov M.V., Skvortsova E.M. Diagnostics and pharmacotherapy of pelvic inflammatory diseases in women. *Arkhiv akusherstva i ginekologii im. V.F. Snegiriova = V. Snegirev Archive of Obstetrics and Gynecology*, 2018, Vol. 5, no. 4, pp. 177-181. (In Russ.)]
7. Шишкова Ю.С., Долгушина В.Ф., Графова Е.Д., Завьялова С.А., Курносенко И.В., Евстигнеева Н.П., Громакова К.Г., Колесников О.Л., Чукичев А.В., Долгушин И.И. Взаимосвязь функционального статуса нейтрофилов цервикального секрета у беременных женщин с видовым составом лактофлоры // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2018. № 4. С. 51-56. [Shishkova Yu.S., Dolgushina V.F., Grafova E.D., Zavyalova S.A., Kurnosenko I.V., Evstigneeva N.P., Gromakova K.G., Kolesnikov O.L., Chukichev A.V., Dolgushin I.I. Interrelation of the functional status of cervical secretion neutrophils in pregnant women with the specific composition of lactoflora. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2018, no. 4, pp. 51-56. (In Russ.)]
8. de Jong E., de Lange D.W., Beishuizen A., van de Ven P.M., Girbes A.R.J., Huisman A. Neutrophil CD64 expression as a longitudinal biomarker for severe disease and acute infection in critically ill patients. *Int. Jnl. Lab. Hem.*, 2016, Vol. 38, pp. 576-584.

9. El-Madbouly A.A., El Sehemawy A.A., Eldesoky N.A., Abd Elgalil H.M., Ahmed A.M. Utility of presepsin, soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1, and neutrophil CD64 for early detection of neonatal sepsis. *Infect. Drug Resist.*, 2019, Vol. 12, pp. 311-319.
10. Hong C.W. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune Netw.*, 2017, Vol. 17, no. 5, pp. 298-306.
11. Skilbeck C.A., Lu X., Sheikh S., Savage C.O., Nash G.B. Capture of flowing human neutrophils by immobilised immunoglobulin: Roles of Fc-receptors CD16 and CD32. *Cell. Immunol.*, 2006, Vol. 241, no. 1, pp. 26-31.
12. Yin W.P., Li J.B., Zheng X.F., An L., Shao H., Li C.S. Effect of neutrophil CD64 for diagnosing sepsis in emergency department. *World J. Emerg. Med.*, 2020, Vol. 11, no. 2, pp. 79-86.

Авторы:

Ковалева С.В. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Пиктурно С.Н. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чудилова Г.А. — д.б.н., доцент, заведующая отделом клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Ломтатидзе Л.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Kovaleva S.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Pikturno S.N., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chudilova G.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Lomtadze L.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Крутова В.А. — д.м.н., профессор кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии, главный врач клиники ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Малиновская В.В. — д.б.н., профессор, руководитель лаборатории онтогенеза и коррекции системы интерферона ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; профессор кафедры аллергологии и иммунологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Krutova V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Chief Physician of University Clinic, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Malinovskaya V.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Ontogenesis and Correction of Interferon System, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Nesterova I.V., MD, PhD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Allergology and Immunology, Faculty of Continuing Medical Education, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Поступила 15.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022
Accepted 28.07.2022

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА У ДЕТЕЙ С БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЬСОНА–КОНОВАЛОВА ПРИ РАЗНЫХ СТАДИЯХ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

Курбатова О.В.¹, Купцова Д.Г.¹, Безрукавникова Л.М.²,
Радыгина Т.В.¹, Мовсисян Г.Б.¹, Анушенко А.О.¹, Комарова А.Д.¹,
Потапов А.С.^{1,3}, Петричук С.В.¹, Фисенко А.П.¹

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

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицины труда имени академика Н.Ф. Измерова», Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. В основе патогенеза болезни Вильсона–Коновалова (БВ) лежит нарушение экскреции меди, которое приводит к его избыточному накоплению в тканях. При БВ характерна гиперкупренилурия. Токсическое действие меди на ткань печени может проявляться в форме жировой дистрофии гепатоцитов, гепатита, фиброза и цирроза печени. Цель работы – оценить иммунный статус у детей с БВ в зависимости от стадии фиброза печени. Обследовано 53 пациента с БВ в возрасте от 6 до 18 лет. Стадию фиброза печени оценивали методом транзитной эластографии печени на аппарате FibroScan F502 (EchoSence, Франция). Исследование иммунного статуса лимфоцитов периферической крови выполнено на проточном цитофлуориметре CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter, США). В лимфоидном регионе оценивали относительное количество В-лимфоцитов (В1 и В2-популяции), НК-клеток, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Th17-лимфоцитов, регуляторных Т-клеток, активированных Т-хелперов. Все показатели иммунного статуса пациентов были пересчитаны в процентах отклонения от возрастной нормы. Массовую концентрацию меди в суточной моче определяли атомно-абсорбционным методом с помощью спектрометра AAnalyst 800. Статистическая обработка выполнена программой Statistica10.0. Для пациентов с БВ характерно увеличение Т-хелперов, регуляторных Т-клеток, Th17-лимфоцитов и активированных Т-хелперов на фоне снижения цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток по сравнению с нормой. Количество В-клеток не зависит от стадии фиброза печени и находится на нижней границе нормы или снижено. С увеличением стадии фиброза

Адрес для переписки:

Курбатова Ольга Владимировна
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: putintseva@mail.ru

Address for correspondence:

Kurbatova Olga V.
National Medical Research Center for Children's Health
119296, Russian Federation, Moscow,
Lomonosovsky ave., 2, bldg 1.
Phone: 7 (499) 134-13-98.
Fax: 7 (499) 134-70-01.
E-mail: putintseva@mail.ru

Образец цитирования:

О.В. Курбатова, Д.Г. Купцова, Л.М. Безрукавникова, Т.В. Радыгина, Г.Б. Мовсисян, А.О. Анушенко, А.Д. Комарова, А.С. Потапов, С.В. Петричук, А.П. Фисенко «Особенности иммунного статуса у детей с болезнью Вильсона–Коновалова при разных стадиях фиброза печени» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 453-460.
doi: 10.46235/1028-7221-1193-FOI

© Курбатова О.В. и соавт., 2022

For citation:

O.V. Kurbatova, D.G. Kuptsova, L.M. Bezrukavnikova, T.V. Radygina, G.B. Movsisyan, A.O. Anushenko, A.D. Komarova, A.S. Potapov, S.V. Petrichuk, A.P. Fisenko "Features of immune status in children with Wilson–Kononov disease at different stages of liver fibrosis", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 453-460.
doi: 10.46235/1028-7221-1193-FOI

DOI: 10.46235/1028-7221-1193-FOI

печени увеличивается количество В1- и уменьшается В2-лимфоцитов. Содержание меди в моче у обследованных пациентов изменялось от 19 до 835 мкг/сут, было выше нормативных значений у 88% детей и составляло $Me = 175$ мкг/сут (71-330). Получены корреляционные зависимости концентрации меди в моче и степени отклонения иммунного статуса ($R = 0,63$): увеличивается концентрация меди в моче при увеличении количества Th17-лимфоцитов, В1-лимфоцитов и регуляторных Т-клеток и при снижении количества В2-лимфоцитов. У детей с БВ при наличии кольца Кайзера–Флейшера получено достоверное снижение популяции цитотоксических Т-лимфоцитов ($p = 0,034$). Показатели клеточного иммунитета у детей с БВ являются информативным инструментом для оценки степени тяжести поражения печени.

Ключевые слова: дети, болезнь Вильсона–Коновалова, фиброз печени, лимфоциты, проточная цитометрия

FEATURES OF IMMUNE STATUS IN CHILDREN WITH WILSON–KONOVALOV DISEASE AT DIFFERENT STAGES OF LIVER FIBROSIS

Kurbatova O.V.^a, Kuptsova D.G.^a, Bezrukavnikova L.M.^b,
Radygina T.V.^a, Movsisyan G.B.^a, Anushenko A.O.^a, Komarova A.D.^a,
Potapov A.S.^{a,c}, Petrichuk S.V.^a, Fisenko A.P.^a

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

^b N. Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, Russian Federation

^c I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. The pathology in Wilson–Conovalov disease (WCD) results from impaired excretion of copper, thus leading to its excessive accumulation in tissues. Hypercupreniluria is characteristic to the WCD. Toxic effects of copper on liver tissue can manifest as fatty degeneration of hepatocytes, hepatitis, fibrosis and cirrhosis. Purpose of the present work was as follows: estimation of immune status in children with WD depending on the stage of liver fibrosis. Fifty-three patients with WCD aged 6 to 18 years, were examined. The stage of liver fibrosis was assessed by transient liver elastography using FibroScan F502 (EchoSence, France). The immune status of peripheral blood lymphocytes was examined using CYTOMICS FC500 flow cytofluorimeter (Beckman Coulter, USA). The relative numbers of B lymphocytes (B1 and B2 populations), NK cells, T helper cells, cytotoxic T lymphocytes, Th17 lymphocytes, regulatory T cells, activated T helper cells were assessed in the lymphoid area. All indices of the patients' immune status were recalculated for percentage of deviation from the age-dependent reference values. Mass concentration of copper in daily urine was determined by atomic absorption method using "AAnalyst 800" spectrometer. Statistical processing was performed by Statistica10.0 program. The WCD patients are characterized by an increase of T helpers, regulatory T cells, Th17 lymphocytes and activated T helpers, along with decrease of cytotoxic T lymphocytes and NK cells against normal levels. The number of B cells did not depend on the stage of liver fibrosis and was at the lower limit of normal range, or decreased. Upon increase of the liver fibrosis stage, the number of B1 lymphocytes increases and B2 lymphocytes become decreased. The urinary copper content in the examined patients varied from 19 to 835 $\mu\text{g/day}$, being higher than the reference values in 88% of children, with median value of 175 $\mu\text{g/day}$ (71-330). A correlation between urinary copper concentration and degree of immune status deviation was revealed ($R = 0.63$): urinary copper concentration was increased when the number of Th17 lymphocytes, B1 lymphocytes and regulatory T cells became higher, and when the number of B2 lymphocytes decreased. A significant decrease in the population of cytotoxic T lymphocytes ($p = 0.034$) was observed in children with WCD in the presence of Kaiser–Fleischer ring. Indexes of cellular immunity in children with WCD are an informative tool to assess the severity of liver damage.

Keywords: children, Wilson–Konovalov disease, liver fibrosis, lymphocytes, flow cytometry

Введение

Болезнь Вильсона–Коновалова (БВ) – тяжелое прогрессирующее наследственное заболевание, передающееся по аутосомно-рецессивному типу [3, 14]. Патогенез заболевания обусловлен нарушением экскреции меди из организма, приводящим к избыточному накоплению этого микроэлемента в тканях и сочетанному поражению паренхиматозных органов (прежде всего печени) и головного мозга (преимущественно подкорковых ядер). Описано почти 300 мутаций гена, кодирующего белок АТР7В, которые могут привести к нарушению метаболизма меди [8].

Для болезни Вильсона–Коновалова характерны: лейкопения, нормохромная анемия, тромбоцитопения, снижение церулоплазмينا и общей меди, гипоальбуминемия, увеличение уровней аминотрансфераз (в 1,5–50 раз), билирубина, щелочной фосфатазы, гаммаглобулинотранспептидазы [3, 13]. Особое внимание отводится определению меди в моче: гиперкупруриурия у пациентов с болезнью Вильсона–Коновалова может достигать более 1500 мкг/сут (норма < 50 мкг/сут) [9, 13]. Токсическое действие меди на ткань печени может проявляться в форме жировой дистрофии гепатоцитов, гепатита, фиброза и цирроза печени [7, 14]. Жировая инфильтрация может быть связана с перекисным окислением липидов и повреждением митохондрий. Можно видеть инфильтрацию межклеточного пространства лимфоцитами и волокнами коллагена [7, 14].

Получены данные о нарушениях врожденного и адаптивного иммунитета у пациентов с различными болезнями накопления. Показано, что пациенты с болезнью Гоше, мукополисахаридозом VII типа и альфа-маннозидозом предрасположены к подавлению иммунитета, более восприимчивы к инфекциям и имеют более высокий риск развития аутоиммунных заболеваний и злокачественных новообразований [6, 15].

Нарушения в иммунной системе при болезнях накопления зависят от ферментного дефекта и имеют разнонаправленный характер. Так, у детей с болезнью Гоше (накопление глюкоцереброзида) описано повышенное абсолютное количество В- и Т-лимфоцитов, активированных Т-хелперов (Thact) и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с контролем [15]. У пациентов с болезнью Ниманна–Пика типа С (накопление липидов) выявлены значительные нарушения регуляции врожденного иммунитета, при этом снижается количество НК-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов в циркуля-

ции, нарушаются процессы дегрануляции [10]. Исследование мышинной модели мукополисахаридоза I типа выявило снижение В-клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперов по сравнению с контрольной группой животных [5]. Несмотря на явные клинические признаки нарушений у пациентов с БВ, данные о состоянии иммунного статуса у этих пациентов отсутствуют.

Цель работы – оценить иммунный статус у детей с болезнью Вильсона–Коновалова в зависимости от стадии фиброза печени.

Материалы и методы

Обследовано 53 пациента с болезнью Вильсона–Коновалова, в возрасте от 6 до 18 лет Ме 14,1 (11,0–16,6). Все дети находились на стационарном лечении в гастроэнтерологическом отделении с гепатологической группой ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Оценку стадии фиброза печени проводили методом транзистентной эластографии печени на аппарате FibroScan F502 (EchoSense, Франция). Для диагностики степени фиброза печени использовали шкалу METAVIR: стадия F1 – плотность в интервале 5,9–7,2 кПа; стадия F2 – 7,3–9,5 кПа; стадия F3 – 9,6–12,5 кПа, стадия F4 (цирроз печени) – плотность 12,6 кПа и более [1, 11]. В зависимости от стадии фиброза дети были разделены на 4 группы: группа 1 – отсутствие фиброза печени (F0, n = 11); группа 2 – минимальные фибротические изменения печени (F1, n = 17); группа 3 – выраженный фиброз печени (F2–3, n = 14) и группа 4 – цирроз печени (F4, n = 11).

Исследование иммунного статуса лимфоцитов периферической крови, выполнено на проточном цитофлуориметре CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter, США). Использовали моноклональные антитела производства Beckman Coulter и Becton Dickinson (США): CD4-FITC, CD3-FITC, CD8-PE, CD19-PE, CD(16/56)-PE, CD127-PE, CD161-PE, CD3-PerCP, CD45-PerCP, CD45-PC7, CD25-PC7, CD5-PC7. Пробоподготовку образцов периферической крови проводили в соответствии со стандартизованной технологией [4]. В лимфоидном регионе CD45⁺ оценивали следующие популяции лимфоцитов: В-лимфоциты (CD19⁺CD3⁻), включая В1-популяцию (CD3⁻CD19⁺CD5⁺) и В2-популяцию (CD3⁻CD19⁺CD5⁻) лимфоцитов, НК-клетки (CD3⁻CD16⁺CD56⁺), Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺), цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺), Th17-лимфоциты (CD3⁺CD4⁺CD161⁺), регуляторные

Т-клетки (CD25⁺CD4⁺CD127^{low}), активированные Т-хелперы (CD25⁺CD4⁺CD127^{high}). Учитывая возрастные особенности клеточного иммунитета у детей, все показатели иммунного статуса пациентов были пересчитаны в процентах отклонения от возрастной нормы.

Массовую концентрацию меди в суточной моче определяли в лаборатории медико-биологических исследований ФГБНУ «НИИ медицины труда имени академика Н.Ф. Измерова» атомно-абсорбционным методом с помощью атомно-абсорбционного спектрометра АAnalyst 800 с электротермической атомизацией пробы в графитовой печи с пиропокрытием, импульсным нагревом атомизатора и Зееман-корректором фона при длине волны 324,8 нм.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью Statistica 10.0. Для оценки значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Выявлены отличия показателей иммунного статуса пациентов с болезнью Вильсона–Коноvalова в зависимости от стадии фиброза печени (табл. 1). У всех пациентов с БВ отмечается уве-

личение количества Т-хелперов по сравнению с нормативными показателями, вне зависимости от стадии фиброза печени. Относительное количество цитотоксических Т-лимфоцитов снижается при увеличении стадии фиброза печени, в большей степени при стадии F4. Отмечается снижение количества НК-клеток при F0-, F1- и F4-стадиях фиброза, на стадии F2-3 НК-клетки находятся в пределах возрастной нормы (табл. 1). Количество В-клеток не зависит от стадии фиброза печени и находится на нижней границе нормы или снижено, при этом наблюдается изменение соотношения В1- и В2-субпопуляций: увеличение количества В1 и снижение количества В2 с увеличением стадии фиброза печени.

Анализ количества малых популяций лимфоцитов у детей с БВ показал достоверное увеличение регуляторных Т-клеток с увеличением стадии фиброза и достигает максимальных значений при циррозе печени ($p_{F0-F4} = 0,003$; рис. 1А). Получено достоверное увеличение количества Th17-лимфоцитов при увеличении стадии фиброза печени с Me -17 (-46–36) при стадии F0 до Me 177 (72–261) при стадии F4 ($p_{F0-F4} = 0,004$; рис. 1Б). У 72% пациентов при циррозе печени количество Th17-лимфоцитов превышает воз-

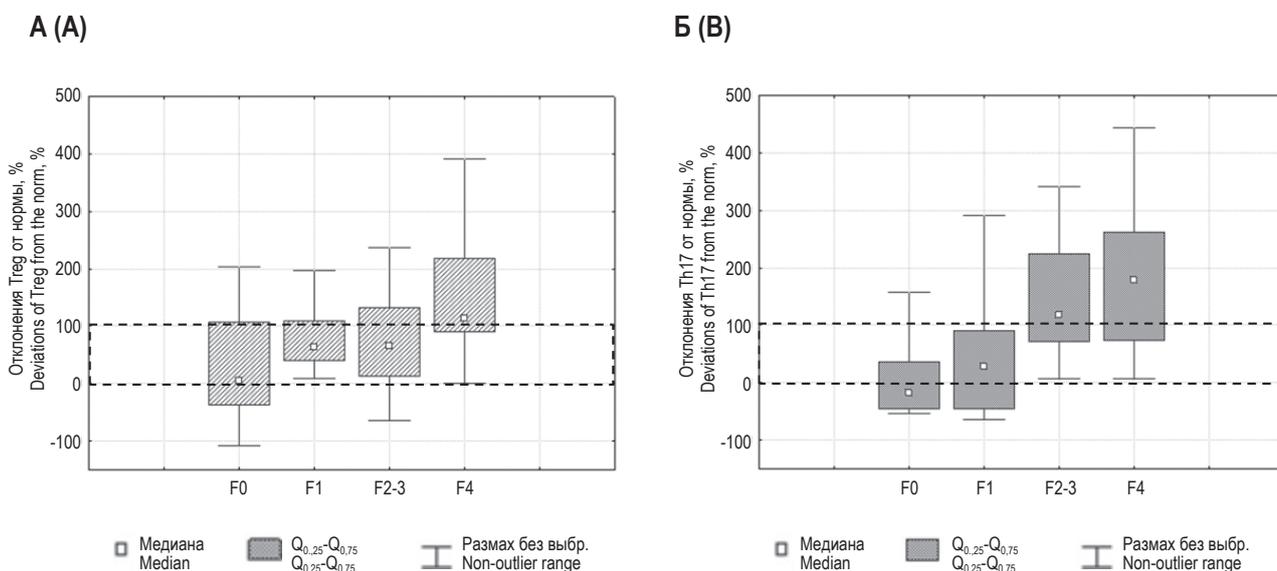


Рисунок 1. Отклонения показателей Th17 и Treg от возрастной нормы у детей с болезнью Вильсона–Коноvalова в зависимости от стадии фиброза печени

Примечание. Пунктиром выделен диапазон нормы для количества клеток Th17 и Treg.

Figure 1. Deviations of Th17 and Treg values from the age norm in children with Wilson–Konovalov disease, depending on the stage of liver fibrosis

Note. The dotted line highlights the norm range for the number of Th17 и Treg cells.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ОСНОВНЫХ И МАЛЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С БВ (% ОТКЛОНЕНИЙ ОТ ВОЗРАСТНОЙ НОРМЫ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}))

TABLE 1. INDICATORS OF MAJOR AND SMALL POPULATIONS OF LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH WD (% OF DEVIATIONS FROM THE AGE NORM, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}))

Показатель Parameter	Группа 1 Group 1 F0 (n = 11)	Группа 2 Group 2 F1 (n = 17)	Группа 3 Group 3 F2-3 (n = 14)	Группа 4 Group 4 F4 (n = 11)
CD4 (% CD45)	151 (85–174)	179 (163–239)	135 (24–205)	153 (31–260)
CD8 (% CD45)	15 (-73 – -66)	-11 (-46–41)	-10 (-63–45)	-56 (-70–75)
NK (% CD45)	-18 (-42 – -8)	-31 (-51–16)	19 (-31–59)	-22 (-35–5)
CD19 (% CD45)	6 (-24–77)	1 (-33–22)	-5 (-16–35)	16 (-12–73)
B1 (% CD19)	7 (-25–114)	0 (-37–90)	77 (37–98)	97 (-47–126)
B2 (% CD19)	95 (-15–125)	102 (10–140)	24 (2–65)	3 (-28–150)

растную норму, при этом количество активированных Т-хелперов повышено у 82% пациентов с БВ ($p_{F0-F4} = 0,017$).

Полученные данные изменений иммунного статуса с зависимости от стадии фиброза печени при БВ у детей согласуются с результатами исследований при других метаболических заболеваниях с поражением печени [2, 5, 6, 10, 15].

Содержание меди в моче у обследованных пациентов изменялось от 19 до 835 мкг/сут, было выше нормативных значений у 88% детей и составляло $Me = 175 (71–330)$ мкг/сут. Достоверных отличий от стадии фиброза не выявлено, наибольший разброс отмечался при циррозе печени.

Получены корреляционные зависимости концентрации меди в моче и степени отклонения иммунного статуса ($R = 0,63$). Полученное уравнение регрессии показало увеличение концентрации меди в моче при увеличении количества Th17-лимфоцитов, B1-лимфоцитов и регуляторных Т-клеток и при снижении количества B2-лимфоцитов (рис. 2).

Одним из диагностических показателей БВ является накопление меди в десцеметовой мембране роговой оболочки глаза в виде колец Кайзера–Флейшера [3, 12]. Нами проанализи-



Рисунок 2. Множественная корреляционная зависимость содержания меди в моче от показателей иммунного статуса у детей с БВ

Figure 2. Multiple correlation dependence of copper content in urine on indicators of immune status in children with Wilson-Konovalov diseases

рованы показатели клеточного иммунитета в зависимости от наличия или отсутствия кольца Кайзера–Флейшера. У детей с БВ при наличии кольца получено достоверное снижение популяции CD8-лимфоцитов ниже возрастной нормы ($p = 0,034$). При наличии кольца отклонения от нормы составило Me: -54 (-70–-11), при отсутствии Me: 17 (-26–67). Выявлена тенденция к увеличению количества малых популяций CD4-клеток (Th17, Thact, Treg) у детей с БВ при наличии кольца Кайзера–Флейшера.

Заключение

Показатели клеточного иммунитета у детей с болезнью Вильсона–Коновалова являются информативным инструментом для оценки степени тяжести поражения печени. Увеличение степени повреждения печени сопровождается увеличением количества Th17-лимфоцитов, активированных Т-хелперов и регуляторных Т-клеток на фоне снижения содержания цитотоксических Т-лимфоцитов.

Список литературы / References

1. Кулебина Е.А., Сурков А.Н., Куликов К.А., Потапов А.С., Бессонов Е.Е. Валидация показателей транзиентной эластографии для оценки стадии фиброза печени у детей // Лечащий врач, 2020. № 8. С. 57-60. [Kulebina E.A., Surkov A.N., Kulikov K.A., Potapov A.S., Bessonov E.E. Validation of transient elastography cut-points for assessing the stage of liver fibrosis in children. *Lechashchiy vrach = Attending Physician*, 2020, no. 8, pp. 57-60. (In Russ.)]
2. Курбатова О.В., Мирошкина Л.В., Сурков А.Н., Полякова С.И., Измайлова Т.Д., Семенова Г.Ф., Самохина И.В., Капустина Е.Ю., Духова З.Н., Потапов А.С., Петричук С.В. Особенности т-клеточного звена иммунитета у детей с гликогеновой болезнью // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 3. С. 331-334. [Kurbatova O.V., Miroshkina L.V., Surkov A.N., Polyakova S.I., Izmailova T.D., Semenova G.F., Samokhina I.V., Kapustina E.Yu., Dukhova Z.N., Potapov A.S., Petrichuk S.V. Characteristics of the T-cell immunity in children with glycogen storage disease. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 3, pp. 331-334. (In Russ.)]
3. Фисенко А.П., Сурков А.Н., Потапов А.С. Болезнь Вильсона у детей. М.: НМИЦ здоровья детей, 2019. 84 с. [Fisenko A.P., Surkov A.N., Potapov A.S. Wilson's disease in children]. Moscow: National Medical Research Center of Children's Health, 2019. 84 p.
4. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине // Медицинская иммунология, 2007. Т. 9, № 4-5. С. 373-378. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V. Flow cytometry as a modern analytical tool in biology and medicine. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, Vol. 9, no. 4-5, pp. 373-378. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2007-4-5-.
5. Archer L.D., Langford-Smith K.J., Critchley W.R., Bigger B.W., Fildes J.E. Characterisation of the T cell and dendritic cell repertoire in a murine model of mucopolysaccharidosis I (MPS I). *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2013, Vol. 36, no. 2, pp. 257-262.
6. Castaneda J.A., Lim M.J., Cooper J.D., Pearce D.A. Immune system irregularities in lysosomal storage disorders. *Acta Neuropathol.*, 2008, Vol. 115, no. 2, pp. 159-174.
7. Gerosa C., Fanni D., Congiu T., Piras M., Cau F., Moi M., Faa G. Liver pathology in Wilson's disease: From copper overload to cirrhosis. *J. Inorg. Biochem.*, 2019, Vol. 193, pp. 106-111.
8. Lu Z.K., Cheng J., Li S.M., Lin Y.T., Zhang W., Li X.Z., Sheng H.Y., Mao X.J., Mei H.F., Zheng R.D., Liang C.L., Jiang M.Y., Huang Y.L., Liu L., Zeng C.H. Phenotypes and ATP7B gene variants in 316 children with Wilson disease. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2022, Vol. 60, no. 4, pp. 317-322. (In Chinese)
9. Ngwanou D.H., Couchonnal E., Parant F., Belmalih A., Guillaud O., Dumortier J., Bost M., Lachaux A. Long-Term Urinary Copper Excretion and Exchangeable copper in children with Wilson Disease under chelation therapy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2022. doi: 10.1097/MPG.0000000000003531.
10. Platt N., Speak A.O., Colaco A., Gray J., Smith D.A., Williams I.M., Wallom K.L., Platt F.M. Immune dysfunction in Niemann-Pick disease type C. *J. Neurochem.*, 2016, Vol. 136, no. 1, pp. 74-80.
11. Przybyłkowski A., Szeligowska J., Januszewicz M., Raszeja-Wyszomirska J., Szczepankiewicz B., Nehring P., Górnicka B., Litwin T., Członkowska A. Evaluation of liver fibrosis in patients with Wilson's disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2021, Vol. 33, no. 4, pp. 535-540.
12. Ryan A., Nevitt S.J., Tuohy O., Cook P. Biomarkers for diagnosis of Wilson's disease. *Cochrane Database System. Rev.*, 2019, Vol. 11, CD012267. doi: 10.1002/14651858.CD012267.pub2.

13. Salman H.M., Amin M., Syed J., Sarfraz Z., Sarfraz A., Sarfraz M., Farfán Bajaña M.J., Felix M., Cherrez-Ojeda I. Biochemical testing for the diagnosis of Wilson's disease: A systematic review. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2022, Vol. 36, e24191. doi: 10.1002/jcla.24191.
14. Shribman S., Poujois A., Bandmann O., Czlonkowska A., Warner T.T. Wilson's disease: update on pathogenesis, biomarkers and treatments. *J. Neurol., Neurosurg. Psychiatry*, 2021, Vol. 92, no. 10, pp. 1053-1061.
15. Zahran A.M., Eltayeb A.A., Elsayh K.I., Saad K., Ahmad F.A., Ibrahim A. Activated and memory T lymphocytes in children with gaucher disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2017, Vol. 65, no. 3, pp. 263-269.

Авторы:

Курбатова О.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, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Безрукавникова Л.М. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицины труда имени академика Н.Ф. Измерова», Москва, Россия

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

Мовсисян Г.Б. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории редких наследственных болезней, врач-гастроэнтеролог гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Kurbatova O.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

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

Bezrukavnikova L.M., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Medicobiological Research, N. Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, Russian Federation

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

Movsisyan G.B., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Rare Hereditary Diseases, Clinical Gastroenterologist, Gastroenterology Department with Hepatological Group, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Анушенко А.О. — врач-гастроэнтеролог гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Комарова А.Д. — врач-педиатр гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Потапов А.С. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории научных основ детской гастроэнтерологии и гепатологии, заведующий гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой 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

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

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

Anushenko A.O., Clinical Gastroenterologist, Gastroenterology Department with the Hepatological Group, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Komarova A.D., Paediatrician, Gastroenterology Department with the Hepatological Group, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Potapov A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Scientific Foundations of Pediatric Gastroenterology and Hepatology, Head, Gastroenterology Department with Hepatology Group, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

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

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

Поступила 15.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022
Accepted 28.07.2022

СЛОЖНЫЙ ПУТЬ К ДИАГНОЗУ «ОБЩАЯ ВАРИАБЕЛЬНАЯ ИММУННАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ» (КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ)

Москалец О.В.

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Резюме. Общая вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН) представляет собой одну из самых распространенных форм первичных иммунодефицитов с преимущественной недостаточностью антител. В отличие от большинства других первичных иммунодефицитов, этот вариант достаточно часто дебютирует у взрослых, что создает определенные сложности в его выявлении. Проявления общей вариабельной иммунной недостаточности весьма многообразны: инфекционный синдром (инфекции респираторного тракта, септические артриты), диарейный синдром (как инфекционного, так и неинфекционного генеза), аутоиммунный синдром (аутоиммунные цитопении, системные ревматические заболевания), лимфопролиферативный синдром (доброкачественная лимфоидная пролиферация, лимфомы), достаточно часто встречается интерстициальная болезнь легких и гранулематозные изменения по типу саркоидоза. Из-за отсутствия характерной клинической картины диагноз «общая вариабельная иммунная недостаточность» часто устанавливается с большим опозданием, такие больные долго наблюдаются у разных специалистов, и отсутствие патогенетической терапии (внутривенные иммуноглобулины) приводит к неуклонному прогрессированию заболевания а, нередко, и к летальным исходам. В статье представлено клиническое наблюдение, иллюстрирующее сложности в постановке этого диагноза. У женщины, госпитализированной по поводу пневмонии, было выявлено объемное образование в подслизистой толстой кишке. После исключения туберкулеза и лимфомы на основании гистологического исследования был поставлен диагноз «липома толстой кишки». Через несколько лет у пациентки стали периодически увеличиваться подчелюстные лимфоузлы, при повторном гистологическом исследовании установлен диагноз «гранулематозный некротизирующий лимфаденит», пациентка была направлена к ревматологу для исключения системного васкулита. Данный диагноз не подтвердился, но при лабораторном обследовании было выявлено резкое снижение гамма-фракции белков, на этом основании рекомендована консультация иммунолога для исключения иммунодефицита. При дальнейшем обследовании в сыворотке крови выявлено крайне низкое содержание иммуноглобулинов G и M, отсутствие иммуноглобулина A, на основании чего был впервые поставлен диагноз «общая вариабельная иммунная недостаточность». Рекомендована заместительная терапия внутривенными иммуноглобулинами в больших дозах с контролем претрансфузионного уровня, с дальнейшим переходом на поддерживающую схему. Таким образом, можно констатировать, что практикующие врачи до сих пор еще слабо осведомлены о первичных иммунодефицитах, особенно если в клинической картине доминируют неинфекционные проявления.

Адрес для переписки:

Москалец Оксана Владимировна
ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского»
115054, Россия, Москва, ул. Щепкина, 61/2.
Тел.: 8 (495) 681-60-00.
E-mail: 6816000@mail.ru

Address for correspondence:

Moskalets Oksana V.
M. Vladimirskiy Regional Research Clinical Institute
115054, Russian Federation, Moscow, Shchepkin str., 61/2.
Phone: 7 (495) 681-60-00.
E-mail: 6816000@mail.ru

Образец цитирования:

О.В. Москалец «Сложный путь к диагнозу «общая вариабельная иммунная недостаточность» (клиническое наблюдение)» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 461-464.
doi: 10.46235/1028-7221-1173-CWO

© Москалец О.В., 2022

For citation:

O.V. Moskalets "Complicated ways of diagnosing common variable immune deficiency (case report)", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 461-464.
doi: 10.46235/1028-7221-1173-CWO

DOI: 10.46235/1028-7221-1173-CWO

Рутинный анализ содержания общего белка и белковых фракций может дать информацию, позволяющую заподозрить дефицит антител и на этом основании исследовать содержание сывороточных иммуноглобулинов для подтверждения диагноза.

Ключевые слова: ОВИН, клиническое наблюдение, лимфопролиферация, гранулематозный некротизирующий лимфаденит, гамма-фракция белков, иммуноглобулины

COMPLICATED WAYS OF DIAGNOSING COMMON VARIABLE IMMUNE DEFICIENCY (CASE REPORT)

Moskalets O.V.

M. Vladimirskiy Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract. Common variable immunodeficiency (CVID) is one of the most frequent forms of primary immunodeficiencies with predominant antibody deficiency. Unlike most other primary immunodeficiencies, this variant often manifests in adults thus creating certain difficulties in its detection. Manifestations of common variable immune deficiency are very diverse: infectious syndrome (respiratory tract infections, septic arthritis), diarrheal clinical pattern of both infectious and non-infectious genesis, autoimmune syndrome (autoimmune cytopenias, systemic rheumatic diseases), lymphoproliferative syndrome (benign lymphoid proliferation, lymphomas), interstitial lung disease and sarcoidosis-like granulomatous changes are quite common. Due to the lack of a distinct clinical pattern, the common variable immunodeficiency is often diagnosed too late. Such patients are observed for a long time by various specialists, and the absence of pathogenetic therapy (intravenous immunoglobulins) leads to steady progression of the disease and, often, to lethal outcome. The article presents a clinical observation illustrating the difficulties in making this diagnosis. A woman hospitalized with pneumonia presented with a mass in colonic submucosa. After excluding tuberculosis and lymphoma, a diagnosis of colon lipoma was made on the basis of histological examination. A few years later, the patient's submandibular lymph nodes were periodically enlarged. Upon repeated histological examination, the diagnosis of granulomatous necrotizing lymphadenitis was established, the patient was referred to a rheumatologist to rule out systemic vasculitis. This diagnosis was not confirmed, but further examination revealed a sharp decrease in the gamma fraction of serum proteins. Therefore, an immunologist's counseling was recommended to rule out immunodeficiency. The following blood serum analysis revealed an extremely low IgG and IgM content, with absence of detectable immunoglobulin A. On the basis of these findings, the diagnosis of common variable immune deficiency was made for the first time. Replacement therapy with high-dose intravenous immunoglobulins with control of pre-transfusion Ig levels was recommended, with further transition to a supporting treatment schedule. Hence, one may state that general practitioners are still poorly aware of primary immunodeficiencies, especially if non-infectious manifestations dominating in the clinical pattern. Routine analysis of total protein content and protein fractions can provide information that allows to suspect deficiency of antibodies and, therefore, to assess contents of distinct serum immunoglobulins in order to confirm CVID diagnosis.

Keywords: CVID, case report, lymphoproliferation, granulomatous necrotizing lymphadenitis, protein gamma fraction, immunoglobulins

Введение

Общая варибельная иммунная недостаточность (ОВИН) является одним из вариантов первичных иммунодефицитов (ПИД) с преимущественной недостаточностью антител. В отличие от большинства других форм ПИД, ОВИН часто дебютирует у взрослых (18-25 лет), а иногда и позже. Клинические проявления очень разнообразны. В большинстве случаев встречается

хроническая инфекционная патология бронхолегочной системы и ЛОР-органов (70-80%) [1, 2]. У 20-30% больных – аутоиммунные расстройства (аутоиммунные цитопении, системные ревматические заболевания [3, 6] Кроме того, основными клиническими проявлениями могут быть длительная диарея, как инфекционного генеза (энтеровирусы, лямблии, кампилобактер), так и неинфекционного (воспалительные заболевания кишечника, синдром мальабсорбции), а

также онкологические заболевания (чаще всего лимфомы и рак желудка), или патологическая лимфопрлиферация (лимфаденопатия различных групп лимфоузлов, спленомегалия, реже — гепатомегалия) [1, 6]. В ряде случаев у больного ОВИН может присутствовать одновременно несколько клинических синдромов [4]. Учитывая отсутствие типичной клинической картины, такие пациенты, особенно взрослые, сначала наблюдаются у других специалистов. Согласно данным литературы, задержка с постановкой диагноза в среднем составляет 10,5–14,5 лет, и лишь у 10,5% больных диагноз устанавливается в течение года после начала заболевания [1]. Для подтверждения этого, рассмотрим следующее клиническое наблюдение.

Материалы и методы

Больная Т. 1984 г. р. обратилась к аллергологу-иммунологу с жалобами на увеличение подчелюстных лимфоузлов, слабость, снижение веса. Анамнез. В течение многих лет неоднократно отмечала эпизоды жидкого стула без патологических примесей, но по этому поводу к врачу не обращалась. 5 лет назад перенесла левостороннюю нижнедолевую пневмонию, по поводу чего была госпитализирована по месту жительства, при МСКТ брюшной полости выявлено объемное образование толстой кишки 14 × 16 мм в области печеночного угла, спленомегалия 138 × 82 мм. Далее обследовалась у гематолога, колопроктолога, онколога, фтизиатра. Данных за туберкулез и гемобластоз на тот момент получено не было. При колоноскопии в печеночном углу обнаружено подслизистое образование до 1,5 см в диаметре, при гистологическом исследовании биоматериала — фрагменты слизистой толстой кишки с лимфогистиоцитарной инфильтрацией. Был установлен диагноз «липома печеночного угла ободочной кишки», рекомендовано динамическое наблюдение (колоноскопия 1 раз в 1–2 года). Данную рекомендацию пациентка не выполняла, чувствовала себя удовлетворительно. Через 2 года отметила увеличение подчелюстных лимфоузлов, по поводу чего вновь была направлена к гематологу. Проведена трепанбиопсия, выявлены вторичные изменения гемопоэза, признаков поражения, характерных для лимфомы, не обнаружено. Биопсия лимфоузла: в пределах исследованного материала элементов злокачественного роста не выявлено, данных за лимфому не получено. Повторно консультирована фтизиатром — туберкулез исключен. Состояние расценили как реактивную лимфаденопатию, назначен амоксицилин, лимфомиазол, постепенно лимфоузлы уменьшились в размерах. Повторно данная группа лимфоузлов увеличилась че-

рез 1,5 года на фоне ОРВИ, проведена биопсия лимфоузла, при гистологическом исследовании обнаружены множественные мелкие очаги абсцедирования с перифокальными скоплениями эпителиодных клеток, лимфоцитов, гистиоцитов, что было расценено как гранулематозный некротизирующий лимфаденит, рекомендована консультация ревматолога. В течение нескольких месяцев лимфоузлы без лечения постепенно уменьшились в размерах, но в процессе обследования у ревматолога при электрофорезе белков сыворотки крови выявлено снижение содержания общего белка (58 г/л) и крайне низкое содержание гамма-фракции (1,8 г/л), в связи с чем пациентку направили к аллергологу-иммунологу для исключения иммунодефицита. На момент обращения у пациентки вновь без видимых причин увеличилась данная группа лимфоузлов.

При осмотре

Состояние удовлетворительное. Рост 165 см, вес 46 кг. Кожные покровы и видимые слизистые обычной окраски, умеренно влажные. Пальпируются подчелюстные лимфоузлы плотной консистенции диаметром 2 см, подвижные, безболезненные, не спаянные с кожей и окружающими тканями. Суставы визуально не изменены, движения в полном объеме. В легких дыхание везикулярное, хрипы не выслушиваются. Тоны сердца приглушены, ритм правильный, ЧСС 76 в мин, АД 130/80 мм рт. ст. Язык влажный, обложен белым налетом. Живот мягкий, безболезненный. Нижняя граница печени — по краю реберной дуги. Селезенка не пальпируется. Физиологические отправления в норме.

Рентгенограмма органов грудной клетки: Постпневмонический фиброз левого легкого.

Лабораторные исследования

Общий анализ крови и мочи — в пределах нормы. ANA — отрицательные, анти-ДНК-17,2 ЕД/мл (0–30 ЕД/мл), анти-Scl-70 1,1 ЕД/мл (0–15 ЕД/мл), ANCA — отрицательные, РФ — отрицательный, СРБ — 2,5 мг/мл (< 5 мг/мл).

Результаты иммунологического исследования: CD3⁺ 80,1% (55–80%), CD3⁺ абс. 2120 (800–2200), CD3⁺CD4⁺ 49,8% (31–49%), CD3⁺CD4⁺ абс. 1055 (600–1600), CD3⁺CD8⁺ 38,1% (19–37%), CD3⁺CD8⁺ абс. 807 (300–800), CD4⁺/CD8⁺ 1,3 (1,09–2,5), CD3⁺CD16⁺CD56⁺ 13,7% (6–20%), CD3⁺CD16⁺CD56⁺ абс. 290 (150–600), CD19⁺ 6,0% (5–19%), CD19⁺ абс. 127 (100–500), IgG 0,01 г/л (7,7–18), IgA — 0 г/л (0,7–4,0), IgM 0,08 г/л (0,05–2,5).

Результаты и обсуждение

Таким образом, данное клиническое наблюдение иллюстрирует сложности со своевременным подтверждением диагноза «ОВИН». У пациентки

одновременно отмечалось несколько синдромов: диарейный (о котором пациентка сообщила только при конкретном расспросе), инфекционный (пневмония) и лимфопролиферативный, который и доминировал в клинической картине. Образование в подслизистой толстой кишки, расцененное как липома, скорее всего тоже связано с патологической лимфоцитарной пролиферацией. Уже в этот период отмечалась спленомегалия, но на это никто внимания не обратил. В дальнейшем у пациентки периодически увеличивались подчелюстные лимфоузлы, что не совсем типично для ОВИН, обычно лимфаденопатия стойкая. При гистологическом исследовании сначала отмечались неспецифические изменения, а через несколько лет выявлен некротизирующий гранулематозный лимфаденит. Следует отметить, что гранулематозные изменения (особенно саркоидоподобные изменения в легких) тоже характерны для ОВИН [4, 7]. В итоге окончательный диагноз был установлен как минимум с 5-летней задержкой, хотя диарейный синдром отмечался значительно раньше, на момент постановки диагноза у пациентки отмечались крайне низкое содержание

IgG и IgM, отсутствовал IgA. Возможно, если бы не назначили исследование белковых фракций, она так бы и продолжала обследоваться у разных специалистов. Пациентке была рекомендована колоноскопия, от которой она отказалась, и заместительная терапия иммуноглобулином человека для внутривенного введения в насыщающем режиме (40 г) с контролем претрансфузионного уровня, после достижения уровня 5–6 г/л коррекция дозы из расчета 400 мг/кг ежемесячно. В настоящее время пациентка по месту жительства наблюдается у гематолога.

Заключение

Данный клинический пример подтверждает, что практикующие врачи, особенно лечащие взрослый контингент, до сих пор при проведении дифференциального диагноза не рассматривают ПИД, особенно если речь идет о неинфекционных проявлениях. Хотя, если говорить об ОВИН, элементарный лабораторный анализ с оценкой фракции белков может стать отправной точкой для дальнейшего диагностического поиска.

Список литературы / References

1. Abbot K.J., Gelfand E.W. Common variable immunodeficiency: diagnosis, management and treatment. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 2015, Vol. 35, no. 4, pp. 637-658.
2. Ameratunga R., Allan C., Woon S.T. Defining common variable immunodeficiency disorders in 2020. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 2020, Vol. 40, no. 3, pp. 403-420.
3. Azizi G., Adolhassani H., Asgardoost M.H., Alinia T., Yazdani R., Mohammadi J., Resaei N., Ochs H.D., Aghamohammadi A. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: epidemiology, pathophysiology and management. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 13, no. 2, pp. 101-115.
4. Dimitrova A., Jensen M.D., Bock K., Hilberg O. CVID is a multifaceted disease. *Ugeskr. Laeger*, 2018, Vol. 180, no. 47, V02180105. (In Danish)
5. Kokron C.M., Errante P.R., Barros M.T., Baracho G.V., Camargo M.M., Kalil J., Rizzo L.V. Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2004, Vol. 76, no. 4, pp. 707-726.
6. Maglione P.J. Autoimmune and lymphoproliferative complications of common variable immunodeficiency. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2016, Vol. 16, no. 3, 19. doi: 10.1007/s11882-016-0597-6.
7. Park J.H., Levinson A.I. Granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) in common variable immunodeficiency (CVID). *Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 134, no. 2, pp. 97-103.

Автор:

Москалец О.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биомедицинских методов исследований ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Author:

Moskalets O.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Biomedical Studies, M. Vladimirsky Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Поступила 11.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 11.07.2022
Accepted 28.07.2022

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ IN VITRO ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ФЕНОТИПА 2 СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ ДЕСТРУКТИВНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕКСАПЕПТИДА

Нестерова И.В.^{1, 2}, Чапурина В.Н.¹, Чудилова Г.А.¹, Тараканов В.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Резюме. Эффекторные дисфункции нейтрофильных гранулоцитов часто ассоциированы с возникновением дисрегуляторных процессов в антибактериальной иммунной защите. Острая деструктивная пневмония — тяжелое гнойно-воспалительное заболевание, сопряженное с дискордантной работой эффекторных механизмов нейтрофильных гранулоцитов и появлением негативно трансформированных субпопуляций. В связи с чем поиск новых экспериментальных подходов, направленных на переориентирование негативно измененного фенотипа различных субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов детей с острой деструктивной пневмонией с использованием различных иммунотропных субстанций, является весьма актуальным. Цель исследования: в «закрытой экспериментальной системе *in vitro*» оценить модулирующие эффекты влияния синтетического Гексапептида (Arginyl-alpha-Aspartyl-Lysyl-Valyl-Tyrosyl-Arginine) на содержание и фенотип 2 функционально-значимых субпопуляций мажорной — CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺ и минорной — CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов детей с нетипично протекающей острой деструктивной пневмонией. Исследовано 20 образцов периферической крови 10 детей с острой деструктивной пневмонией и 40 образцов периферической крови 20 условно здоровых детей 2-4 лет. Проведено иммунофенотипирование 2 субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов с учетом плотности экспрессии мембранных рецепторов по MFI. Фенотипические особенности субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов оценивались в системе *in vitro* до и после инкубации периферической крови с Гексапептидом (10⁻⁶ г/л; t — 37 °C, 60 мин). У детей с острой деструктивной пневмонией, по сравнению с условно здоровыми детьми, установлены варианты негативной трансформации изучаемых субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов: выявлено значительное уменьшение доли мажорной субпопуляции с 98,0 (96,9-98,7) % до 55,8 (35,3-74,8) % со снижением плотности экспрессии CD16 и CD11b по MFI и достоверное увеличение доли минорной субпопуляции с 1,3 (0,4-1,6) % до 52,6 (41,8-54,9) % с усилением экспрессии активационного рецептора CD11b и снижением экспрессии CD64. В «закрытой системе

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123, кв. 1.
Тел.: 8 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Address for correspondence:

Nesterova Irina V.
Peoples' Friendship University of Russia
117513, Russian Federation, Moscow,
Leninsky ave., 123, apt 1.
Phone: 7 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Нестерова, В.Н. Чапурина, Г.А. Чудилова, В.А. Тараканов «Экспериментальное перепрограммирование *in vitro* трансформированного фенотипа 2 субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов детей с острой деструктивной пневмонией с использованием синтетического гексапептида» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 465-470.
doi: 10.46235/1028-7221-1175-EIV

© Нестерова И.В. и соавт., 2022

For citation:

I.V. Nesterova, V.N. Chapurina, G.A. Chudilova, V.A. Tarakanov "Experimental *in vitro* phenotype reprogramming of two subsets of neutrophilic granulocytes in children with acute destructive pneumonia by means of a synthetic hexapeptide", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 465-470.
doi: 10.46235/1028-7221-1175-EIV

DOI: 10.46235/1028-7221-1175-EIV

in vitro» продемонстрированы иммуномодулирующие эффекты влияния Гексапептида на нейтрофильные гранулоциты детей с острой деструктивной пневмонией: позитивное ремодулирование измененного фенотипа обеих субпопуляций при отсутствии достоверных количественных изменений. Так, под влиянием гексапептида установлено достоверное повышение экспрессии активационных рецепторов CD16, CD11b в мажорной субпопуляции и достоверное снижение их экспрессии в минорной субпопуляции до уровня таковых у условно здоровых детей. В то же время Гексапептид не повлиял на изучаемые субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов условно здоровых детей. Исключение составило увеличение экспрессии CD64 в минорной субпопуляции. Полученные данные могут быть использованы в дальнейшем для разработки новых методов таргетной иммунотерапии, направленной на коррекцию фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов при острой деструктивной пневмонии у детей.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, фенотип субпопуляций, острая деструктивная пневмония, гексапептид, ремодулирование

EXPERIMENTAL *IN VITRO* PHENOTYPE REPROGRAMMING OF TWO SUBSETS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN CHILDREN WITH ACUTE DESTRUCTIVE PNEUMONIA BY MEANS OF A SYNTHETIC HEXAPEPTIDE

Nesterova I.V.^{a, b}, Chapurina V.N.^a, Chudilova G.A.^a, Tarakanov V.A.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

Abstract. Effector dysfunctions of neutrophil granulocytes are often associated with the occurrence of dysregulatory processes in the antibacterial immune defense. Acute destructive pneumonia is a severe purulent-inflammatory disease associated with discordant functions of effector mechanisms of neutrophil granulocytes and emergence of negatively transformed cell subsets. Therefore, the search for new experimental approaches aimed at re-orientation of negatively altered phenotype of distinct subsets of neutrophilic granulocytes in the children with acute destructive pneumonia by means of various immunotropic substances is quite relevant. The aim of the study was to evaluate the modulating effects of synthetic hexapeptide (Arginyl- α -Aspartyl-Lysyl-Valyl-Tyrosyl-Arginine) on the contents and phenotype of 2 functionally significant subsets of major (CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺) and minor (CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁻) subpopulations of neutrophils in a «closed *in vitro* experimental system» sampled in the children with atypical acute destructive pneumonia. We have examined twenty peripheral blood samples from 10 children with acute destructive pneumonia, and 40 blood samples of 20 healthy children 2–4 years old. Immunophenotyping of neutrophil granulocytes classified in 2 subsets was performed on the basis of expression density of membrane receptors, according to MFI criteria. Phenotypic features of neutrophil granulocyte subsets were evaluated in the *in vitro* system before and after incubation of peripheral blood with Hexapeptide (10⁻⁶ g/L; 37 °C, 60 min). In children with acute destructive pneumonia, compared with conditionally healthy children, the following variants of negative transformation of the neutrophil subsets were established: a significant decrease in the ratios of the major subset, i.e., from 98.0 (96.9–98.7) % to 55.8 (35.3–74.8) %, with a decreased CD16 and CD11b density expression according to MFI, and a significantly increased ratio of the minor neutrophil subset: from 1.3 (0.4–1.6) % to 52.6 (41.8–54.9) %, with increased expression of CD11b receptor, and a decrease in CD64 expression. Immunomodulatory effects of Hexapeptide upon neutrophil granulocytes of children with acute destructive pneumonia have been demonstrated in the “closed *in vitro* system” showing positive phenotype remodeling of both cell subsets in the absence of significant quantitative changes. Thus, upon treatment with the hexapeptide, we have found a significantly increased expression of activation receptors CD16, CD11b in the major subset, and a significant decrease in their expression for the minor subset to the levels typical to healthy children. At the same time, hexapeptide did not affect the studied subsets of neutrophils from healthy children, except of increased CD64 expression in the minor subset. The obtained data can be used in future to develop new approaches to

the targeted immunotherapy aimed at correcting the phenotype of neutrophil granulocyte subsets in acute destructive pneumonia in children.

Keywords: neutrophil granulocytes, phenotype of subsets, acute destructive pneumonia, hexapeptide, remodeling

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-315-90069.

Введение

В настоящее время актуальной проблемой здравоохранения является поиск новых терапевтических стратегий в лечении тяжелых гнойно-воспалительных заболеваний (ГВЗ), таких как острая деструктивная пневмония (ОДП), ассоциированных с эффекторными дисфункциями нейтрофильных гранулоцитов (НГ), лежащих в основе дисрегуляторных процессов противоинфекционного иммунитета [3, 6].

НГ — главенствующие клетки противобактериальной защиты, наделенные возможностями активации и регуляции иммунного ответа. Механизмы функционирования НГ зависят от рецепторного аппарата клетки, молниеносно реагирующего на сдвиги в иммунном гомеостазе [1, 8]. Существуют многообразные субпопуляции НГ с различной функциональной активностью, в основе которой лежат количественные и качественные характеристики мембранных рецепторов, таких как CD16 (FcγRIII), CD32 (FcγRII), CD11b (Mac-1/CR3A), CD64 (FcγRI), отвечающих за эффекторные механизмы клетки [5, 7]. При дисфункциях рецепторного аппарата НГ наблюдается срыв противомикробной защиты, приводящий к развитию тяжело протекающих ГВЗ, резистентных к антибактериальным препаратам [4]. С нашей точки зрения, векторное влияние на субпопуляции НГ может стать «ключом» в лечении нетипично протекающих ГВЗ, что позволит таргетно корректировать дисфункции НГ.

В плане исследования особый интерес представляет изучение эффектов Гексапептида (Arginyl-alpha-Aspartyl-Lysyl-Valyl-Tyrosyl-Arginine, ГП) — синтетической субстанции активного центра гормона тимуса — тимопоэтина, обладающей биологическими свойствами нативного гормона, с оценкой ее влияния на субпопуляции НГ [2].

Цель исследования — в «закрытой экспериментальной системе *in vitro*» оценить модулирующие эффекты влияния синтетического Гексапептида (Arginyl-alpha-Aspartyl-Lysyl-Valyl-Tyrosyl-Arginine) на содержание и фенотип 2 функционально-значимых субпопуляций мажорной — CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺ и минорной — CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺ нейтрофильных

гранулоцитов детей с нетипично протекающей острой деструктивной пневмонией.

Материалы и методы

Для изучения влияния ГП на субпопуляции НГ исследовано 60 образцов периферической крови (ПК). Обследовано 20 условно здоровых детей (10 мальчиков и 10 девочек) 2-4 лет: образцы ПК до инкубации вошли в группу сравнения 1, после инкубации с ГП — в группу исследования 1. Также под наблюдением находилось 10 детей (6 мальчиков и 4 девочек) 2-4 лет с ОДП, образцы ПК которых до инкубации составили группу сравнения 2, после инкубации с ГП — группу исследования 2.

Инкубацию с синтетическим ГП проводили в течение 1 часа при T 37 °C в концентрации 10⁻⁶ г/л. Методом проточной цитометрии (FC 500 Beckman Coulter, США) определяли содержание субпопуляций НГ (%НГ), одновременно экспрессирующих рецепторы CD16, CD64, CD32, CD11b, с оценкой плотности экспрессии по интенсивности флуоресценции (MFI).

Перед включением детей в исследование у родителей было получено информированное согласие на участие в исследовании, забор ПК, обработку данных и публикацию результатов в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации.

Для статистической обработки использовались Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2017. В сравнении групп применялись непараметрические критерии: U-критерий Манна–Уитни и критерий Шапиро–Уилка. Результаты выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Различие групп полагали статистически значимым при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных продемонстрировал, что в ПК условно здоровых детей регистрируется мажорная субпопуляция НГ — CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺, доля которой составляет 98,0 (96,5-98,7)%, характеризующаяся высоким уровнем плотности экспрессии по MFI CD16, средним MFI CD11b и CD32, что соответствует фенотипу субпопуляции CD16^{bright}CD64^{mid}CD32^{mid}CD11b^{mid}. При этом в ПК группы сравнения 1 присутствует также минорная субпопуляция — CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺ НГ, количество которой составляет 1,3 (0,4-1,6)%, имеющая одинаковое с мажорной субпопуляцией

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ГЕКСАПЕПТИДА НА ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИЙ CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺ И CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ И ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ ДЕСТРУКТИВНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ *IN VITRO*, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. EFFECT OF HEXAPEPTIDE ON PHENOTYPE OF CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺ AND CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺ NEUTROPHIL GRANULOCYTES OF CONDITIONALLY HEALTHY CHILDREN AND CHILDREN WITH ACUTE DESTRUCTIVE PNEUMONIA *IN VITRO*, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Субпопуляция CD16 ⁺ CD64 ⁺ CD32 ⁺ CD11b ⁺ НГ Subset CD16 ⁺ CD64 ⁺ CD32 ⁺ CD11b ⁺ NG					
Группы Groups	%НГ %NG	MFI CD16	MFI CD32	MFI CD11b	
	фенотип phenotype	CD16 ^{bright} CD64 ⁺ CD32 ^{mid} CD11b ^{mid}			
НГ условно здоровых детей до инкубации NG of Healthy children before incubation	98,0 (96,9-98,7)	132,5 (120,5-144,5)	5,7 (4,4-6,2)	22,4 (20,9-25,7)	
НГ условно здоровых детей после инкубации с ГП NG of Healthy children after incubation with HP	фенотип phenotype	CD16 ^{bright} CD64 ⁺ CD32 ^{mid} CD11b ^{mid}			
	98,7 (97,8-99,2)	131,8 (125,4-133,5)	5,9 (4,8-7,6)	19,7 (16,9-20,7)	
НГ детей с ОДП до инкубации NG of Children with ADP before incubation	фенотип phenotype	CD16 ^{mid} CD64 ⁺ CD32 ^{mid} CD11b ^{dim}			
	55,8* (35,3-74,8)	112,2* (86,1-115,7)	4,9 (3,7-6,2)	15,2* (14,7-15,5)	
НГ детей с ОДП после инкубации с ГП NG of Children with ADP after incubation with HP	фенотип phenotype	CD16 ^{bright} CD64 ⁺ CD32 ^{mid} CD11b ^{mid}			
	49,6* (24,1-73,4)	123,5 [^] (118,5-134,7)	6,11 (4,5-8,3)	23,75 [^] (21,1-28,0)	
Субпопуляция CD16 ⁺ CD64 ⁺ CD32 ⁺ CD11b ⁺ НГ Subset CD16 ⁺ CD64 ⁺ CD32 ⁺ CD11b ⁺ NG					
	%НГ %NG	MFI CD16	MFI CD64	MFI CD32	MFI CD11b
НГ условно здоровых детей до инкубации NG of Healthy children before incubation	фенотип phenotype	CD16 ^{mid} CD64 ^{bright} CD32 ^{mid} CD11b ^{mid}			
	1,3 (0,4-1,6)	91,5 (82,2-106,5)	9,3 (9,2-9,6)	6,5 (5,0-8,9)	19,8 (16,4-26,9)
НГ условно здоровых детей после инкубации с ГП NG of Healthy children after incubation with HP	фенотип phenotype	CD16 ^{mid} CD64 ^{bright} CD32 ^{mid} CD11b ^{mid}			
	1,2 (0,9-1,3)	89,6 (80,8-91,7)	23,3* (14,98-30,20)	7,6 (4,96-10,00)	16,8 (16,0-19,2)
НГ детей с ОДП до инкубации NG of Children with ADP before incubation	фенотип phenotype	CD16 ^{mid} CD64 ^{dim} CD32 ^{mid} CD11b ^{bright}			
	52,6* (41,8-54,9)	129 (83,5-131,0)	3,1* (2,9-3,4)	7,2 (5,6-7,9)	31,2* (27,3-35,2)
НГ детей с ОДП после инкубации с ГП NG of Children with ADP after incubation with HP	фенотип phenotype	CD16 ^{mid} CD64 ^{dim} CD32 ^{mid} CD11b ^{mid}			
	47,9* (23,9-51,3)	91,7 (57,8-117,0)	3,3* (3,0-3,9)	5,2 (2,8-8,6)	17,3 [^] (15,8-17,9)

Примечание. * – значимые различия относительно группы условно здоровых детей, p < 0,05; ^ – значимые различия относительно группы детей с ОДП, p < 0,05.

Note. *, significant differences relative to the group of healthy children, p < 0.05; ^, significant differences relative to the group of children with ADP, p < 0.05.

оснащение по MFI CD11b и CD32, более низкий MFI CD16 и отличающаяся экспрессией CD64, с фенотипом CD16^{mid}CD64^{bright}CD32^{mid}CD11b^{mid} (табл. 1).

При оценке эффектов влияния ГП на НГ группы условно здоровых детей установлено сохранение содержания мажорной и минорной субпопуляций ($p_{1,2} > 0,05$), MFI CD16, CD32 и CD11b в обеих субпопуляциях НГ оставались на уровне показателей группы сравнения 1 ($p_{1,2,3} > 0,05$) на фоне повышения в 3 раза MFI CD64 в субпопуляции CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺НГ относительно показателей до инкубации ($p < 0,05$) (табл. 1).

Исследование ПК детей с ОДП позволило установить достоверное снижение в 1,7 раз доли мажорной субпопуляции ($p < 0,05$) относительно показателей условно здоровых детей, с появлением трансформированного фенотипа CD16^{mid}CD64^{dim}CD32^{mid}CD11b^{dim}НГ, имеющего сниженный MFI CD16 и CD11b ($p_{1,2} < 0,05$) и неизменный MFI CD32 ($p > 0,05$). Количество НГ минорной субпопуляции в группе сравнения 2 увеличилось в 30 раз относительно группы сравнения 1 ($p < 0,05$), на фоне снижения в 3 раза MFI CD64, увеличения в 1,6 раз MFI CD11b ($p_{1,2} < 0,05$) и тенденций к увеличению MFI CD16 и CD32 ($p_{1,2} > 0,05$), что характеризует фенотип субпопуляции как CD16^{bright}CD64^{dim}CD32^{mid}CD11b^{bright} (табл. 1).

В образцах ПК детей с ОДП после инкубации с ГП содержание субпопуляций CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺НГ и CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺НГ не изменялось и оставалось на уровне показателей группы сравнения 2. При этом отмечалась реорганизация фенотипических профилей до показателей условно здоровых детей: усиление MFI CD16 и MFI CD11b в мажорной субпопуляции ($p_{1,2} > 0,05$), с восстановлением фенотипа

CD16^{bright}CD64⁺CD32^{mid}CD11b^{mid}, и снижение их экспрессии в минорной субпопуляции ($p_{1,2} < 0,05$), с приобретением фенотипа CD16^{mid}CD64^{dim}CD32^{mid}CD11b^{mid} (табл. 1).

Таким образом, в «закрытой экспериментальной системе *in vitro*» выявлены иммуномодулирующие эффекты ГП, выражающиеся в отсутствии влияния на не измененный фенотип субпопуляций НГ условно здоровых детей и позитивным ремодулированием негативно трансформированного фенотипа мажорной и минорной субпопуляций НГ детей с нетипично протекающей ОДП.

Заключение

Проведенное в «закрытой экспериментальной системе *in vitro*» исследование продемонстрировало модулирующее влияние ГП на субпопуляции CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺ и CD16⁺CD64⁺CD32⁺CD11b⁺НГ. Так под действием ГП в ПК условно здоровых детей не изменялось содержание и фенотип изучаемых субпопуляций НГ, исключение составило достоверное увеличение в 3 раза экспрессии CD64 в минорной субпопуляции. Эффекты ГП на НГ детей с ОДП проявлялись позитивным ремодулированием фенотипа изучаемых субпопуляций при отсутствии количественных изменений. В обеих субпопуляциях отмечалось восстановление MFI активационных рецепторов CD16 и CD11b до показателей условно здоровых детей. Полученные данные оцениваются как положительный иммуномодулирующий эффект ГП и в дальнейшем могут быть использованы для разработки новых методов таргетной иммунотерапии с использованием лекарственной формы данной субстанции, направленной на коррекцию фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов при ОДП у детей.

Список литературы / References

1. Долгушин И.И. Нейтрофильные гранулоциты: новые лица старых знакомых // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 30-37. [Dolgushin I.I. Neutrophil granulocytes: new faces of old acquaintances. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 30-37. (In Russ.)]
2. Маркова Т.П., Чувилов Д.Г. Имунофан в комплексном лечении детей с повторными респираторными заболеваниями и микоплазменной инфекцией // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 12. С. 12-18. [Markova T.P., Chuvirov D.G. Immunotherapy with imunofan to the treatment of children with recurrent respiratory disease and mycoplasma pneumoniae infection. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 12, pp. 12-18. (In Russ.)]
3. Мехридинов М.К. Роль иммунологических факторов в патогенезе развития деструктивных форм пневмоний у детей // Central Asian Journal of Medical and Natural Sciences, 2022. Т. 3, № 2. С. 234-238. [Mehridinov M.K. The role of immunological factors in the pathogenesis of the development of destructive forms of pneumonia in children. *Central Asian Journal of Medical and Natural Sciences*, 2022, Vol. 3, no. 2, pp. 234-238.
4. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Малиновская В.В. Интерфероно- и иммунотерапия в реабилитации иммунокомпрометированных детей с возвратными респираторными инфекциями // Иммунотерапия в практике ЛОР-врача и терапевта / Под ред. А.С. Симбирцев, Г.В. Лавренова. СПб.: Диалог, 2018. С. 167-189. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Malinovskaya V.V. Interferon and immunotherapy in rehabilitation of immunocompromised children with recurrent respiratory infections // *Immunotherapy in the practice of an ENT doctor and a therapist* / Ed. by A.S. Simbircev, G.V. Lavrenova. SPb.: Dialog, 2018. P. 167-189.

in the rehabilitation of immunocompromised children with recurrent respiratory infections. Immunotherapy in the practice of ENT doctor and therapist / Ed. Simbirtsev A.S., Lavrenova G.V.] St. Petersburg: Dialog, 2018, pp. 167-189.

5. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2 // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 1. С. 7-18. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 1. pp. 7-18. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18.

6. Оптимизация диагностики и лечения гнойно-воспалительных заболеваний (Инновационные технологии): Практическое руководство / Под ред. Ревিশвили А.Ш., Земскова В.М., Земскова А.М. СПб.: СпецЛит, 2020. 319 с. [Optimization of diagnostics and treatment of purulent-inflammatory diseases (innovative technologies) / Ed. Revishvili A.Sh., Zemskov V.M., Zemskov A.M.]. St. Petersburg: SpetsLit, 2020. 319 p.

7. Hong C.W. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune Netw.*, 2017, Vol. 17, no. 5, pp. 298-306.

8. Neutrophils. Ed. Khajah M. London: Intechopen limited, 2019. 85 p.

Авторы:

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; профессор кафедры аллергологии и иммунологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Чапурина В.Н. — ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чудилова Г.А. — д.б.н., доцент, заведующая отделом клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Тараканов В.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Nesterova I.V., MD, PhD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Allergology and Immunology, Faculty of Continuing Medical Education, Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Chapurina V.N., Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chudilova G.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory; Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Tarakanov V.A., MD, PhD (Medicine), Professor, Head, Department of Surgical Diseases in Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С УШИБОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЛЕГКОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Норка А.О.^{1,2}, Воробьев С.В.³, Кузнецова Р.Н.^{1,2}, Серебрякова М.К.⁴,
Кудрявцев И.В.^{1,4}, Коваленко С.Н.⁵, Монашенко Д.Н.⁶, Коробова З.Р.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

⁶ СПб ГБУЗ «Городская больница № 26», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из важнейших проблем в системе здравоохранения. В патогенезе первичной травмы важную роль играет воздействие механической энергии на ткани покровов головы и мозга за счет ударной волны, которая распространяется от места приложения травмирующего агента, а также перемещение и ротация полушарий мозга относительно более фиксированного ствола головного мозга. В результате этих механизмов инициируется каскад метаболических, биохимических и воспалительных изменений, приводящих к вторичному повреждению. ЧМТ в зависимости от ее механизма, тяжести и вида приводит к различным по степени и распространенности первичным структурно-функциональным повреждениям мозга на молекулярном, клеточном, тканевом и органном уровнях с расстройством центральной регуляции всех систем организма. Большинство данных свидетельствует о том, что травма головного мозга повышает риск развития эпилепсии и нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ), при этом наблюдается ущерб психическому здоровью. ЧМТ – это процесс, а длительно существующие симптомы у пациентов представляют собой функциональные и структурные повреждения. В ответ на травматическое воздействие происходит высвобождение молекулярных паттернов, связанных с повреждением (DAMP), что приводит к активации резидентных клеток мозговой ткани и последующей секреции этими клетками

Адрес для переписки:

Норка Анна Олеговна
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения РФ
197022, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6-8.
Тел.: 8 (911) 218-85-00.
E-mail: norka-anna@mail.ru

Address for correspondence:

Norka Anna O.
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg,
L. Tolstoy str., 6-8.
Phone: 7 (911) 218-85-00.
E-mail: norka-anna@mail.ru

Образец цитирования:

А.О. Норка, С.В. Воробьев, Р.Н. Кузнецова,
М.К. Серебрякова, И.В. Кудрявцев, С.Н. Коваленко,
Д.Н. Монашенко, З.Р. Коробова «Особенности
гуморального иммунитета у пациентов с ушибом
головного мозга легкой степени тяжести» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 471-476.
doi: 10.46235/1028-7221-1182-FOH

© Норка А.О. и соавт., 2022

For citation:

A.O. Norka, S.V. Vorobyev, R.N. Kuznetsova,
M.K. Serebriakova, I.V. Kudryavtsev, S.N. Kovalenko,
D.N. Monashenko, Z.R. Korobova "Features of humoral
immunity in patients with mild traumatic brain injury",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 471-476.
doi: 10.46235/1028-7221-1182-FOH

DOI: 10.46235/1028-7221-1182-FOH

хемокинов и цитокинов. К очагу повреждения мигрируют нейтрофилы, которые способствуют удалению поврежденных клеток. Миграция Т- и В-клеток происходит через 3-7 дней после травмы. Таким образом после первичной травмы в результате каскада иммунных ответов возникает более обширное повреждение, называемое «вторичной травмой».

Целью нашего исследования является изучение роли иммунологических реакций в патогенезе ушиба легкой степени тяжести.

Было достоверно повышено количество Bm2-клеток, IgD^{dim}CD27^{low} «наивных» В-клеток и В-клеток с фенотипом IgD^{low}CD27^{hi} («плазмобласты») у больных с ушибом головного мозга легкой степени тяжести по сравнению с контрольной группой пациентов, а количество «наивных» зрелых В-клеток с фенотипом CD27^{low}CD38^{dim} достоверно снижено в сравнении с группой контроля.

Ключевые слова: ушиб головного мозга, черепно-мозговая травма, гуморальное звено системы иммунитета, воспаление, иммунофенотипирование, проточная цитофлуориметрия

FEATURES OF HUMORAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH MILD TRAUMATIC BRAIN INJURY

Norka A.O.^{a, b}, Vorobyev S.V.^c, Kuznetsova R.N.^{a, b}, Serebriakova M.K.^d,
Kudryavtsev I.V.^{a, d}, Kovalenko S.N.^e, Monashenko D.N.^f,
Korobova Z.R.^{a, b}

^a First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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

^c V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

^d Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^e S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

^f St. Petersburg City Hospital No. 26, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Traumatic brain injury (TBI) is an important problem of the healthcare system. A leading role in pathogenesis belongs to the action of shock wave upon skull and brain integuments, extending from the impacted site, as well as displacement and rotation of the cerebral hemispheres relative to the fixed brain stem. As a result, a cascade of metabolic, biochemical and inflammatory changes is initiated, leading to secondary damage. TBI, depending on its mechanism, severity and type, causes various primary structural and functional brain lesions at molecular, cellular, tissue and organ levels with dysregulation of all systems in the body, dependent on its degree and extent. In most cases, the brain injury increases the risk of developing epilepsy and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and chronic traumatic encephalopathy (CTE), with mental health disorders. TBI is a long-term symptomatic process in patients with functional and structural damage. In response to a traumatic event, The damage-associated molecular patterns (DAMPs) encountered upon tissue damage are expressed, which cause activation of the resident brain tissue cells, and secretion of multiple chemokine and cytokine by distinct cell populations. Neutrophils migrate to focal lesions, which remove damaged cells and debris. Migration of T and B cells is observed 3-7 days after the trauma. Hence, following primary injury, due to a cascade of immune reactions, a more extensive lesion, the so-called secondary trauma, is developed. The aim of our study was to evaluate the role of immune response in pathogenesis of mild traumatic brain injury.

An increased number of Bm2 cells, IgD^{dim}CD27^{low} "naive" B cells and B cells with the IgD^{low}CD27^{hi} ("plasmablasts") phenotype was found in patients with mild brain contusion, compared to comparison group. Moreover, the number of "naive" mature B cells with the CD27^{low}CD38^{dim} phenotype was significantly decreased compared with the controls.

Keywords: traumatic brain injury, mild, B cells, humoral immune status, inflammation, multicolor flow cytometry, immunophenotyping

Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из важнейших проблем в системе здравоохранения по ряду причин, среди которых выделяют: 1) масштабностью распространения среди лиц работоспособного возраста; 2) высокой летальностью, постоянная или временная инвалидизация [2, 3]. В патогенезе первичной травмы важную роль играет воздействие механической энергии на ткани покровов головы и мозга за счет ударной волны, которая распространяется от места приложения травмирующего агента, а также перемещение и ротация полушарий мозга относительно более фиксированного ствола головного мозга. В результате этих механизмов инициируется каскад метаболических, биохимических и воспалительных изменений, приводящих к вторичному повреждению [7, 8]. В зависимости от того, какой тип воздействия является доминирующим, выделяют различные виды повреждения.

ЧМТ в зависимости от ее механизма, тяжести и вида приводит к различным по степени и распространенности первичным структурно-функциональным повреждениям мозга на молекулярном, клеточном, тканевом и органном уровнях с расстройством центральной регуляции всех систем организма. Большинство данных свидетельствует о том, что травма головного мозга повышает риск развития эпилепсии и нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ), при этом наблюдается ущерб психическому здоровью [8].

ЧМТ – это процесс, а длительно существующие симптомы у пациентов представляют собой функциональные и структурные повреждения. В ответ на травматическое воздействие происходит высвобождение молекулярных паттернов, связанных с повреждением (DAMP), что приводит к активации резидентных клеток мозговой ткани и последующей секреции этими клетками хемокинов и цитокинов. К очагу повреждения мигрируют нейтрофилы, которые способствуют удалению поврежденных клеток. Миграция Т- и В-клеток происходит через 3-7 дней после травмы [5, 7]. Таким образом после первичной травмы в результате каскада иммунных ответов возникает более обширное повреждение, называемое «вторичной травмой».

Целью исследования является изучение роли иммунологических реакций в патогенезе ушиба легкой степени тяжести.

Материалы и методы

С целью изучения особенностей влияния клеток иммунной системы на формирование клини-

ческой картины ушиба легкой степени тяжести в рамках исследования обследовано 28 пациентов с ушибом головного мозга легкой степени тяжести в возрасте от 20 до 45 лет, находившихся на лечении в городской больнице № 26 города Санкт-Петербурга. Среди них было 15 женщин и 13 мужчин. Обследование включало сбор жалоб, анамнеза заболевания, оценку соматического и неврологического статуса в соответствии с стандартной методикой.

Объектом лабораторного исследования служила венозная кровь. Все исследования были проведены в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили согласно рекомендациям, изложенным Хайдковым С.В. и соавт. [4]. Для выявления популяции В-лимфоцитов периферической крови использовали антитела против CD45 и CD19. Для анализа распределения В-лимфоцитов по основным субпопуляциям применяли антитела против поверхностных IgD, CD38 и CD27 [8]. В работе использовали антитела производства Beckman Coulter (США). Окраска антителами была проведена в соответствии с рекомендациями производителя. Подбор оптимальных комбинаций антител и конъюгированных с ними флуорохромов производили в соответствии с принципами, которые опубликованы в литературе [1]. Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 6.00 (GraphPad Prism for MAC., США). Результаты были выражены, как процент (%) положительных клеток в целевой популяции с их средними значениями и стандартным отклонением ($M \pm SD$).

Результаты и обсуждение

Нейровоспаление, как результат травмы головного мозга, является одним из основных компонентов патофизиологии ЧМТ и вносит свой вклад как в формирование вторичных повреждений, так и в механизмы восстановления. Так, нами для оценки гуморального звена иммунной системы в ходе работы использовался подход, который основан на выявлении субпопуляций В-клеток,

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ В-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ (КЛЕТКИ/МКЛ) У БОЛЬНЫХ УШИБОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЛЕГКОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

TABLE 1. B CELL SUBPOPULATIONS OF THE MILD TBI PATIENTS' PERIPHERAL BLOOD (ABSOLUTE B CELL COUNT PER MICROLITER)

Субпопуляции В-клеток B cell subpopulations abs	Контроль Control group n = 52	Пациенты с ушибом головного мозга легкой степени тяжести Patients with mild brain contusion n = 22	
	M±SD	M±SD	Достоверность различий, p Significance of differences, p
	1	2	3
Вm1 (IgD^{dim}CD38^{low})	1,797±0,645	2,309±1,289	0,2366
Вm2 (IgD^{dim}CD38^{low})	6,4215±1,2400	9,212±2,550	0,026
Плазмобласты Plasmablasts (IgD^{low}CD27^{hi})	1,175±0,289	0,223±0,093	0,0122
«Наивные» "Naive" (IgD^{dim}CD27^{low})	1,421±0,528	2,548±1,391	0,0456
Клетки памяти Memory cells (IgD^{dim}D27^{dim})	0,476±0,180	0,466±0,244	0,934
«Наивные» зрелые "Naive" mature (CD27^{low}CD38^{dim})	8,237±3,210	5,628±2,101	0,0363
Плазмобласты Plasmablasts (CD27^{hi}CD38^{hi})	0,656±0,369	1,190±0,756	0,856

различающихся по экспрессии поверхностного IgD и CD38 (табл. 1), было выявлено, что количество Вm2-клеток достоверно выше у больных с ушибом головного мозга легкой степени тяжести по сравнению с контрольной группой пациентов ($p < 0,05$), что касается популяции Вm1-клеток достоверных изменений обнаружено не было ($p = 0,2366$).

Для более детального анализа В-клеток, т. е. клеток, которые прошли антигензависимую дифференцировку в периферических лимфоидных органах был использован подход, в основе которого использовался анализ уровня экспрессии поверхностного IgD и CD27 (табл. 1), при этом необходимо отметить, что CD27 используется в качестве маркера клеток памяти. Было обнаружено достоверное повышение количества IgD^{dim}CD27^{low} «наивных» В-клеток и В-клеток с фенотипом IgD^{low}CD27^{hi} («плазмобласты») было достоверно повышено у пациентов с ушибом

головного мозга легкой степени тяжести в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$).

При этом в ходе исследования для более детального анализа субпопуляционного состава В-клеток периферической крови оценивались уровни экспрессии CD27 и CD38. Было выявлено достоверное снижение «наивных» зрелых В-клеток с фенотипом CD27^{low}CD38^{dim} у пациентов с ушибом головного мозга легкой степени тяжести по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$).

Выявленные нами изменения в рамках популяций В-клеток указывают на их возможную роль в патогенезе ЧМТ легкой степени тяжести, а именно понимание динамики изменений субпопуляций В-клеток и их роли в патогенезе ушиба легкой степени тяжести поможет разработать более эффективные методы лечения в острый период для улучшения исходов течения заболевания.

Список литературы / References

1. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.
2. Лихтерман Л.Б. Черепно-мозговая травма. Диагностика и лечение. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 488 с. [Lichterman L.B. Traumatic brain injury. Diagnosis and treatment]. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 488 p.
3. Потапов А.А., Лихтерман Л.Б., Кравчук А.Д., Корниенко В.Н., Захарова Н.Е., Ошоров А.В., Филатов М.М. Современные подходы к изучению и лечению черепно-мозговой травмы // Анналы клинической и экспериментальной неврологии, 2010. Т. 4, № 1. С. 4-12. [Potapov A.A., Likhterman L.B., Kravchuk A.D., Kornienko V.N., Zakharova N.E., Oshorov A.V., Filatova M.M. Modern approaches to the management of traumatic brain injury. *Annaly klinicheskoy i eksperimentalnoy neurologii = Annals of Clinical and Experimental Neurology*, 2010, Vol. 4, no. 1, pp. 4-12. (In Russ.)]
4. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тоголян Арег А., Хайдуков С.В. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Khaydukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolyan Areg A. Standardized technology "Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytometer-analyzers" (project). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.
5. Dantzer R., O'Connor J.C., Freund G.G., Johnson R.W., Kelley K.W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2008, Vol. 9, no. 1, pp. 46-56.
6. McKee C.A., Lukens J.R. Emerging roles for the immune system in traumatic brain injury. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 556. doi: 10.3389/fimmu.2016.00556.
7. Nizamutdinov D., Shapiro L.A. Overview of traumatic brain injury: an immunological context. *Brain Sci.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 11. doi: 10.3390/brainsci7010011.
8. Prak E.T.L., Ross J., Sutter J., Sullivan K.E. Age-related trends in pediatric B-cell subsets. *Pediatr. Dev. Pathol.*, 2011, Vol. 14, no. 1, pp. 45-52.

Авторы:

Норка А.О. — старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»; врач-невролог медицинского центра ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Воробьев С.В. — д.м.н., главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории неврологии и нейрореабилитации ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Кузнецова Р.Н. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»; врач — аллерголог-иммунолог медицинского центра ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Norka A.O., Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Neurologist, Medical Centre, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Vorobyev S.V., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Research Laboratory of Neurology and Neurorehabilitation, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Kuznetsova R.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Allergist-Immunologist, Medical Centre, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Серебрякова М.К. — аспирант, научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Коваленко С.Н. — преподаватель кафедры нейрохирургии ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Монашенко Д.Н. — к.м.н., врач-нейрохирург, заведующий 1 НХО СПб ГБУЗ «Городская больница № 26», Санкт-Петербург, Россия

Коробова З.Р. — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Serebriakova M.K., Postgraduate Student, Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Kovalenko S.N., Lecturer, Department of Neurosurgery, S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Monashenko D.N., PhD (Medicine), Neurosurgeon, St. Petersburg City Hospital No. 26, St. Petersburg, Russian Federation

Korobova Z.R., Laboratory Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, PhD Student, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 15.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Поступила 15.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ – ПЕПТИДА ZP2 – НА АНТИЦИТОКИНОВУЮ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА ENTEROCOCCUS И ИХ СПОСОБНОСТЬ К ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ

Пашинина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Гриценко В.А.

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

Резюме. Синтетический аналог активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) – пептид ZP2 – обладает широким спектром иммунобиологических эффектов, в том числе антибактериальной активностью. Вместе с тем его влияние (в субингибиторных концентрациях) на биологические свойства *Enterococcus* spp. как возбудителей многих инфекционно-воспалительных заболеваний остается малоизученным. Цель – проанализировать характер влияния синтетического пептида ZP2 на антицитокиновую активность (АЦА) и способность к продукции цитокиноподобных веществ (ЦПВ) у *Enterococcus* spp.

Использовано 18 клинических изолятов *Enterococcus* spp. В эксперименте бактерии культивировали в бульоне Шедлера с пептидом ZP2 при 37 °С в течение 24 ч. В контроле пептид не добавляли. АЦА в отношении IL-8, TNF α и IL-17A и продукцию соответствующих ЦПВ определяли методом ИФА. Для оценки АЦА рассчитывали долю инактивации цитокинов в опыте относительно контроля и выражали в пг/мл; о продукции ЦПВ судили по уровню цитокинов в опыте и контроле, выражая в пг/мл. Данные подвергали статистической обработке.

Выявлено, что *Enterococcus* spp. способны секретировать соединения, инактивирующие цитокины IL-8, IL-17A и TNF α , и продуцировать в среду культивирования ЦПВ. Отмечена внутривидовая и внутривидовая вариабельность по наличию и частоте встречаемости и по выраженности указанных свойств. Установлено, что пептид ZP2 у *E. faecium* увеличивает АЦА в отношении всех изученных цитокинов, а у *E. faecalis* он либо не влиял на их АЦА в отношении TNF α и IL-8, либо полностью ингибировал АЦА в отношении IL-17A. В то же время ZP2 блокировал у *E. faecium* продукцию ЦПВ, подобных IL-17A и IL-8, но повышал продукцию ЦПВ, подобных TNF α , а у *E. faecalis* в 2 раза уве-

Адрес для переписки:

Пашинина Ольга Александровна
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза
Уральского отделения Российской академии наук
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11.
Тел.: 8 (922) 543-91-4.
E-mail: olga25mikro@mail.ru

Address for correspondence:

Pashinina Olga A.
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis
460000, Russian Federation, Orenburg, Pionerskaya str., 11.
Phone: 7 (922) 543-91-4.
E-mail: olga25mikro@mail.ru

Образец цитирования:

О.А. Пашинина, О.Л. Карташова, Т.М. Пашкова, В.А. Гриценко «Влияние синтетического аналога активного центра ГМ-КСФ – пептида ZP2 – на антицитокиновую активность бактерий рода *Enterococcus* и их способность к продукции цитокиноподобных веществ» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 477-484.
doi: 10.46235/1028-7221-1162-IOZ

© Пашинина О.А. и соавт., 2022

For citation:

O.A. Pashinina, O.L. Kartashova, T.M. Pashkova, V.A. Gritsenko “Influence of ZP2 peptide, a synthetic analogue of the GM-GSF active center on the anticytokine activity of bacteria from *Enterococcus* genus and their ability to produce cytokine-like substances”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 477-484.
doi: 10.46235/1028-7221-1162-IOZ

DOI: 10.46235/1028-7221-1162-IOZ

личивал число IL-17A-продуцирующих изолятов, хотя средний уровень продукции этого ЦПВ был ниже, чем в контроле.

Enterococcus spp. способны секретировать соединения, инактивирующие цитокины IL-8, TNF α и IL-17A и продуцировать вещества, подобные данным цитокинам. Синтетический пептид ZP2 оказывает модифицирующее действие на проявление энтерококками указанных свойств. Требуется дальнейшее изучение биологического и патогенетического значения не только выявленных у энтерококков характеристик, но и обнаруженных модифицирующих эффектов пептида ZP2.

Ключевые слова: *Enterococcus*, антицитокиновая активность, цитокиноподобные вещества, синтетический аналог ГМ-КСФ – пептид ZP2

INFLUENCE OF ZP2 PEPTIDE, A SYNTHETIC ANALOGUE OF THE GM-GSF ACTIVE CENTER ON THE ANTICYTOKINE ACTIVITY OF BACTERIA FROM *ENTEROCOCCUS* GENUS AND THEIR ABILITY TO PRODUCE CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES

Pashinina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M., Gritsenko V.A.

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

Abstract. Peptide ZP2, a synthetic analogue of the active center of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), exhibits a wide range of immunobiological effects, including antibacterial activity. At the same time, its effect (in sub-inhibitory concentrations) on the biological properties of *Enterococcus* spp., the causative agents of many infectious and inflammatory diseases remains poorly understood. The aim of our study was to analyze the nature of the effect of synthetic peptide ZP2 on anti-cytokine activity (ACA) and its ability to produce cytokine-like substances (CLS) in *Enterococcus* spp.

18 clinical isolates of *Enterococcus* spp. were used. Over the experiments, the bacterial strains were cultured in Schaedler's broth with ZP2 peptide at 37 °C for 24 hours. No specific peptide was added in the control. ACA for IL-8, TNF α and IL-17A and the production of the corresponding CLS were determined by the ELISA method. To assess ACA, the proportion of cytokine inactivation in the experiment relative to the control was calculated and expressed in pg/ml; CLS production was evaluated by the level of cytokines in the experiment and control, expressed as pg/ml. The data were subjected to statistical processing.

It was revealed that *Enterococcus* spp. strains are capable of secreting compounds that inactivate cytokines IL-8, IL-17A and TNF α , and produce CLS in the culture medium. Intragenital and intraspecific variability was noted in the presence and frequency of occurrence and in the severity of these properties. It was found that the ZP2 peptide in *E. faecium* increases ACA with respect to all studied cytokines. When tested with *E. faecalis*, it either did not affect their ACA against TNF α and IL-8, or completely inhibited ACA for IL-17A. At the same time, ZP2 blocked the production of CLS, e.g., IL-17A and IL-8 in *E. faecium*, but increased the production of CLS similar to TNF α , and, with *E. faecalis*, it increased the number of IL-17A-producing isolates twofold, although the average level of production of these CLS was lower than in the control.

Enterococcus spp strains are capable of secreting compounds that inactivate cytokines IL-8, TNF α and IL-17A, and may produce substances similar to these cytokines. The synthetic peptide ZP2 has a modifying effect on the manifestation of these properties by *Enterococci*. Further studies of biological and pathogenetic features of *Enterococci* and other bacterial species, as well as modifying effects of the ZP2 peptide are required.

Keywords: *Enterococcus*, anti-cytokine activity, cytokine-like substances, synthetic analogue of GM-CSF, peptide ZP2

Введение

Бактерии рода *Enterococcus* широко распространены в природе. Они являются как представителями нормальной микрофлоры пищеварительного тракта человека, млекопитающих, птиц, рептилий, насекомых, обеспечивая колонизационную резистентность кишечного биотопа, так и возбудителями многих инфекционно-воспалительных заболеваний человека и животных [1].

Развитию энтерококковых инфекций способствует наличие у изолятов факторов патогенности и персистенции [2, 13, 14], которые оказывают влияние на характер течения и длительность подобных инфекционно-воспалительных заболеваний. Нельзя исключить, что антицитокиновая активность (АЦА) энтерококков и их способность продуцировать цитокиноподобные вещества (ЦПВ) могут оказывать влияние на локальный цитокиновый баланс, поддерживающий воспалительный процесс [3, 15].

В этой связи актуален поиск препаратов с антиперсистентной активностью. Такими препаратами могут быть пептиды естественного и искусственного происхождения.

Пептид ZP2 – синтетический аналог активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) обладает широким спектром биологического действия [5, 7]. В том числе известно о модифицирующих эффектах синтетического пептида ZP2 на способность *S. aureus* формировать биопленки [4], а также показано его влияние на продукцию данными микроорганизмами цитокиноподобных веществ [6, 8].

Все вышеизложенное указывает на актуальность изучения влияния синтетического пептида ZP2 на биологические свойства бактерий рода *Enterococcus*, в частности на их антицитокиновую активность, т. е. способность инактивировать различные цитокины, а также на продукцию этими микроорганизмами цитокиноподобных веществ.

Цель исследования – проанализировать характер влияния синтетического аналога ГМ-КСФ – пептида ZP2 на антицитокиновую активность и способность к продукции цитокиноподобных веществ у бактерии рода *Enterococcus*, выделенных из секрета простаты у мужчин с симптомами уrogenитальной инфекции.

Материалы и методы

В эксперименте использовано 18 клинических штаммов бактерий рода *Enterococcus* (по 9 штаммов *E. faecalis* и *E. faecium*), выделенных из секрета предстательной железы у мужчин с сим-

птомами уrogenитальной инфекции. Выделение бактерий из исследуемого материала проводили общепринятыми бактериологическими методами. Видовую принадлежность микроорганизмов оценивали с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF серии Microflex (Bruker Daltonics, Германия), идентификацию микроорганизмов с расчетом коэффициента достоверности проводили с использованием программного обеспечения Maldi BioTyper 3,0.

Для изучения влияния ZP2 на АЦА изолятов *Enterococcus* и продукцию ими ЦПВ проводили культивирование 1 мл взвеси бактерий в физиологическом растворе с 1 мл раствора ZP2 с концентрацией 0,1 мкг/мл в 2 мл бульона Шедлера при 37 °С в течение 24 ч. Контролем служили пробы без добавления раствора ZP2. Затем контрольные и опытные пробы центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин, сливали надосадочную жидкость, добавляли к осадку 2 мл бульона Шедлера и ресуспендировали.

АЦА в отношении IL-8, TNF α и IL-17A и продукцию соответствующих ЦПВ определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) по известной методике [3] в оригинальной модификации с использованием наборов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Для этого в центрифужные пробирки вносили в соотношении 1:1 взвесь бактерий рода *Enterococcus* и растворы соответствующих цитокинов, пробы инкубировали в течение 2 часов при 37 °С. После инкубации бактерий с цитокинами реакцию останавливали на холоде, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин (+4 °С) и отбирали супернатанты. В качестве контроля использовали растворы цитокинов в физиологическом растворе. Конечная концентрация цитокинов в опытных и контрольных пробах составляла для IL-8 – 50 пг/мл, TNF α – 25 пг/мл, IL-17A – 75 пг/мл. Результаты учитывали на фотометре StatFax 2100 (США) при длине волны 450 нм. Для оценки АЦА уrogenитальных изолятов бактерий рода *Enterococcus* вычисляли долю инактивации цитокинов в опыте относительно контроля и выражали в пг/мл; о продукции бактериями рода *Enterococcus* ЦПВ судили по уровню цитокинов в опыте по сравнению с контролем и выражали в пг/мл. Данные были обработаны методами вариационной статистики [11].

Результаты и обсуждение

Полученные в ходе исследования данные свидетельствовали, во-первых, о том, что бактерий рода *Enterococcus* способны секретировать

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА ZP2 НА АНТИЦИТОКИНОВУЮ АКТИВНОСТЬ (АЦА) БАКТЕРИЙ РОДА ENTEROCOCCUS

TABLE 1. EFFECT OF PEPTIDE ZP2 ON THE ANTICYTOKINE ACTIVITY (ACA) OF ENTEROCOCCUS

АЦА против цитокинов ACA vs cytokines	<i>E. faecalis</i> (n = 9)		<i>E. faecium</i> (n = 9)		Всего Total (n = 18)	
	Распространенность, % Prevalence, %					
	Контроль Control	Опыт Experience	Контроль Control	Опыт Experience	Контроль Control	Опыт Experience
IL-17A	33,3±15,7	0	33,3±15,7	66,7±15,7	33,3±11,1	33,3±11,1
TNFα	100	100	33,3±15,7	33,3±15,7	66,7±11,1	66,7±11,1
IL-8	66,7±15,7	66,7±15,7	33,3±15,7	100**	50,0±11,8	83,3±8,8*
Выраженность, пг/мл Expression, pg/mL						
	Контроль Control	Опыт Experience	Контроль Control	Опыт Experience	Контроль Control	Опыт Experience
IL-17A	4,7±0,1	0	3,7±0,3	7,1±0,4**	4,2±0,3	7,1±0,4**
TNFα	2,5±0,3	2,8±0,2**	1,0±0,1	1,9±0,1**	2,1±0,3	2,6±0,2
IL-8	5,6±0,2	6,0±1,7	4,3±0,1	7,7±1,6*	5,2±0,3	7,0±1,2

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

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

соединения, инактивирующие цитокины IL-8, IL-17A и TNFα, т. е. проявлять в отношении них антицитокиновую активность – АЦА (табл. 1), а также могут продуцировать в среду культивирования цитокиноподобные вещества – ЦПВ (табл. 2). При этом наблюдалась внутривидовая, (межвидовая) и внутривидовая (межштаммовая) вариабельность бактерий рода *Enterococcus* как по наличию и частоте встречаемости, так и по выраженности указанных свойств.

У бактерий рода *Enterococcus* АЦА выявлялась в отношении всех изученных цитокинов. Наиболее часто энтерококки были способны инактивировать TNFα (66,7±11,1%) и IL-8 (50,0±11,8%), значительно реже – IL-17A (33,3±11,1%), экспрессия признака составила 2,1±0,3; 5,2±0,3 и 4,2±0,3 пг/мл соответственно (табл. 1). При этом распространенность АЦА в отношении IL-8 и TNFα была значительно выше у изолятов *E. faecalis*, чем у *E. faecium* с достоверно более высокой экспрессией признака (p < 0,01).

Кроме того у бактерий рода *Enterococcus* выявлена способность к продукции ЦПВ. Так, эн-

терококки продуцировали вещества, подобные интерлейкину IL-17A в 33,3±11,1% случаев, а вещества, подобные IL-8 и TNFα в 2 раза реже – в 16,7±8,8% случаев. При этом экспрессия продукции веществ подобных IL-17A так же была выше – 6,2±0,4 пг/мл, а уровень продукции IL-8 и TNFα составил 4,5±0,1 пг/мл и 1,4±0,1 пг/мл соответственно. ЦПВ, подобные интерлейкину IL-17A были способны продуцировать как *E. faecalis*, так и *E. faecium*, а подобные IL-8 и TNFα – только изоляты *E. faecium*.

В результате проведенных экспериментов *in vitro* по изучению влияния синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) – пептида ZP2 на антицитокиновую активность и способность к продукции цитокиноподобных веществ у бактерий рода *Enterococcus* было установлено, что пептид ZP2 достоверно увеличивал частоту выявления АЦА в отношении IL-8 с 50,0±11,8% до 83,3±8,8% (p < 0,05) и полностью ингибировал способность к продукции веществ подобных IL-8 (табл. 1).

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА ZP2 НА СПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *ENTEROCOCCUS* ПРОДУЦИРОВАТЬ ЦИТОКИНОПОДОБНЫЕ ВЕЩЕСТВА (ЦПВ)

TABLE 2. EFFECT OF PEPTIDE ZP-2 ON THE ABILITY OF *ENTEROCOCCUS* TO PRODUCE CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES (CLS)

ЦПВ CLS	<i>E. faecalis</i> (n = 9)		<i>E. faecium</i> (n = 9)		Всего Total (n = 18)	
	Распространенность, % Prevalence, %					
	Контроль Control	Опыт Experience	Контроль Control	Опыт Experience	Контроль Control	Опыт Experience
IL-17A	33,3±15,7	66,7±15,7	33,3±15,7	0	33,3±11,1	33,3±11,1
TNFα	0	0	33,3±15,7	33,3±15,7	16,7±8,8	16,7±8,8
IL-8	0	0	33,3±15,7	0	16,7±8,8	0
Выраженность, пг/мл Expression, pg/mL						
	Контроль Control	Опыт Experience	Контроль Control	Опыт Experience	Контроль Control	Опыт Experience
IL-17A	7,2±0,1	5,6±0,6*	5,3±0,1	0	6,2±0,4	5,6±0,6
TNFα	0	0	1,4±0,1	2,2±0,1**	1,4±0,1	2,2±0,1**
IL-8	0	0	4,5±0,1	0	4,5±0,1	0

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

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

При этом среди урогенитальных изолятов *E. faecium* пептид ZP2 увеличивал число штаммов, обладающих АЦА в отношении IL-8 в 3 раза (с 33,3±15,7 до 100%, $p < 0,01$), а в отношении IL-17A в 2 раза (с 33,3±15,7% до 66,7±15,7%), с увеличением у них выраженности признака в 1,7-1,9 раза (с 4,3±0,1 пг/мл до 7,7±1,6 пг/мл и с 3,7±0,3 пг/мл до 7,1±0,4 пг/мл соответственно). В то же время у изолятов *E. faecalis* пептид ZP2 полностью ингибировал АЦА только в отношении IL-17A, а в отношении других цитокинов достоверных изменений не выявлено.

С другой стороны, у изолятов *E. faecalis* после воздействия пептида ZP2 отмечено увеличение в 2 раза доли штаммов, способных продуцировать вещества подобные IL-17A (с 33,3±15,7% до 66,7±15,7%), при этом выраженность признака достоверно снижалась с 7,2±0,1 пг/мл до 5,6±0,6 пг/мл (табл. 2). В то же время у штаммов *E. faecium* пептид ZP2 блокировал способность к продукции веществ подобных IL-17A и IL-8, а в отношении продукции веществ, подобных

TNFα, изменения распространенности не наблюдалось, но регистрировалось увеличение выраженности признака в 1,6 раза (с 1,4±0,1 пг/мл до 2,2±0,1 пг/мл, $p < 0,01$).

Заключение

В настоящем исследовании изучена способность бактерий рода *Enterococcus* секретировать соединения, инактивирующие цитокины IL-8, TNFα и IL-17A, а также охарактеризована их способность продуцировать некоторые цитокиноподобные вещества. Кроме того, проанализировано влияние синтетического аналога активного центра ГМ-КСФ – пептида ZP2 – на антицитокиновую активность и способность к продукции цитокиноподобных веществ у бактерии рода *Enterococcus*, выделенных из секрета простаты у мужчин с симптомами урогенитальной инфекции, и показано его модифицирующее действие на проявление энтерококками указанных

свойств, в том числе, с учетом их видовой принадлежности.

Ранее была выявлена способность клинических изолятов *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* и *E. coli* экскретировать в культуральную среду цитокиноподобные вещества (ЦПВ) [5], а также был выявлен модифицирующий эффект синтетического пептида ZP2 на способность *S. aureus* формировать биопленки [4], и показано его влияние на продукцию стафилококками цитокиноподобных веществ (ЦПВ) [8].

В результате проведенных нами экспериментов установлено, что синтетический пептид ZP2 стимулирует АЦА *E. faecium* в отношении IL-8 и IL-17A и ингибирует активность у *E. faecalis* в отношении IL-17A, т. е. наблюдался видоспецифический модифицирующий эффект данного пептида. С другой стороны, воздействие пептида ZP2 на бактерии рода *Enterococcus* вызывало видоспецифические, разной направленности и степени выраженности эффекты в отношении продукции ими цитокиноподобных веществ. При этом пептид ZP2 вызывал увеличение доли урогенитальных штаммов *E. faecalis*, способных продуцировать вещества, подобные IL-17A, с одновременным уменьшением выраженности признака. У *E. faecium* пептид ZP2 полностью ингибировал способность к продукции веществ, подобных IL-8 и IL-17A, при этом отмечено увеличение в 1,6 раза экспрессии способности продуцировать вещества подобные TNF α . Наши результаты согласуются с ранее полученными данными [8], которые свидетельствуют о том, что при наличии в среде культивирования данного пептида у музейных штаммов *E. faecalis* регистрировалось снижение в супернатантах на 58,5-98,3% не толь-

ко IL-17A-ЦПВ, но и других цитокинов (G-CSF, IFN γ , IL-12p70).

Выявленные межвидовые особенности энтерококков как по антицитокиновой активности в отношении изученных иммуномедиаторов, так и по их способности продуцировать цитокиноподобные вещества могут отражаться на характере взаимодействия энтерококков с макроорганизмом. Так, ранее был выявлен более высокий уровень выраженности АЦА в отношении IL-4, IL-8, IL-10 у изолятов энтерококков, выделенных при инфекционно-воспалительных заболеваниях, по сравнению с кишечными изолятами [9, 10, 12, 15], что свидетельствует о возможном влиянии их экзометаболитов на локальный цитокиновый баланс и поддержание воспалительного процесса.

Необходимо учитывать обнаруженное в экспериментах *in vitro* разнонаправленное модифицирующее действие синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 – на способность энтерококков секретировать внеклеточные соединения, инактивирующие/нейтрализующие различные цитокины, и способность продуцировать в среду культивирования цитокиноподобные вещества. В этой связи требуется продолжить изучение биологического и патогенетического значения не только выявленных у бактерии рода *Enterococcus* характеристик, но и обнаруженных модифицирующих эффектов пептида ZP2.

Дальнейшие исследования антицитокиновой активности и способности к продукции цитокиноподобных веществ у бактерии рода *Enterococcus*, выделенных из секрета предстательной железы мужчин с симптомами урогенитальной инфекции, может выявить информативные параметры, пригодные для оценки степени тяжести и/или характера течения заболевания.

Список литературы / References

1. Бухарин О.В., Вальшев А.В. Биология и экология энтерококков. Екатеринбург: УрО РАН, 2012. 227 с. [Bukharin O.V., Valyshev A.V. Biology and ecology of enterococci. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2012. 227 p.]
2. Бухарин О.В., Вальшева И.В., Карташова О.Л., Сычева М.В. Характеристика вирулентного потенциала клинических изолятов энтерококков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2013. № 3. С. 13-18. [Bukharin O.V., Valysheva I.V., Kartashova O.L., Sycheva M.V. Characteristics of the virulence potential of clinical isolates of enterococci. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 3, pp. 13-18. (In Russ.)]
3. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Иванова Е.В., Смолягин А.И. Антицитокиновая активность микроорганизмов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2011. № 4. С. 56-61. [Bukharin O.V., Perunova N.B., Chaynikova I.N., Ivanova E.V., Smolyagin A.I. Anticytokine activity of microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, no. 4, pp. 56-61. (In Russ.)]
4. Гриценко В.А., Зурочка В.А., Зурочка А.В., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П., Курлаев П.П. Влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагаль-

ного колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на формирование биопленок клиническими изолятами стафилококков // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2015. № 4. С. 1-11 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/VAG-2015-4.pdf>. [Gritsenko V.A., Zurochka V.A., Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Tyapaeva Ya.V., Belozertseva Yu.P., Kurlaev P.P. The effect of a synthetic peptide of the active center of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) on the formation of biofilms by clinical isolates of staphylococci. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2015, no. 4, pp. 1-11. [Electronic resource]. Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/VAG-2015-4.pdf>.

5. Зурочка А.В., Гриценко В.А., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Черешнев В.А. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и его синтетические аналоги: иммунобиологические эффекты и клиническое применение. Екатеринбург: УрО РАН, 2021. 288 с. [Zurochka A.V., Gritsenko V.A., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Chereshev V.A. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and its synthetic analogues: immunobiological effects and clinical application. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2021. 288 p.

6. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. Стафилококки как продуценты цитокиноподобных веществ // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 2. С. 134-136. [Zurochka A.V., Dukardt V.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Tyapaeva Ya.V., Gritsenko V.A. Staphylococci as producers of cytokine-like substances. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 2, pp. 134-136. (In Russ.)]

7. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Гриценко В.А. Иммунобиологические свойства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и синтетических пептидов его активного центра // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1033-1056. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A. Immunobiological properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and synthetic peptides of its active center. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1033-1056. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2216.

8. Зурочка В.А., Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. Влияние синтетического пептида активного центра GM-CSF на продукцию бактериями цитокиноподобных веществ в бульонных культурах // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, Специальный выпуск. Экспериментальные модели. С. 33-34. [Zurochka V.A., Zurochka A.V., Ducardt V.V., Zueva E.B., Dobrynina M.A., Tyapaeva Ya.V., Gritsenko V.A. Effect of GM-CSF active site synthetic peptide for products with bacteria of cytokine-like substances in broth culture. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, Special Issue. Experimental Models, pp. 33-34. (In Russ.)]

9. Кочкина Е.Е., Сычева М.В., Пашкова Т.М., Карташова О.Л. Характеристика биофильей бактерий рода *Enterococcus*, выделенных от животных // Вестник Оренбургского государственного университета, 2017. № 9 (209). С.70-75. [Kochkina E.E., Sycheva M.V., Pashkova T.M., Kartashova O.L. Characterization of bioprofiles of *Enterococcus* isolated from animals. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of the Orenburg State University*, 2017, no. 9 (209), pp. 70-75. (In Russ.)]

10. Кочкина Е.Е., Сычева М.В., Пашкова Т.М., Карташова О.Л. Антицитокиновая активность бактерий рода *Enterococcus*, выделенных от животных // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова, 2019. № 4 (57) С. 25-31. [Kochkina E.E., Sycheva M.V., Pashkova T.M., Kartashova O.L. Anticytokine activity of *Enterococcus* bacteria isolated from animals. *Vestnik Buryatskoy gosudarstvennoy selskokhozyaystvennoy akademii im. V.R. Filippova = Bulletin of V. Filippov Buryat State Agricultural Academy*, 2019, no. 4 (57), pp. 25-31. (In Russ.)]

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

12. Пашкова Т.М. Характеристика антицитокиновой активности *Enterococcus* spp., выделенных от животных // Вестник Оренбургского государственного университета, 2017. № 9 (209). С. 82-84. [Pashkova T.M. Characterization of the anticytokine activity of *Enterococcus* spp isolated from animals. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of the Orenburg State University*, 2017, no. 9 (209), pp. 82-84. (In Russ.)]

13. Пошвина Д.В., Щепитова Н.Е., Сычева М.В. Видовая характеристика и факторы персистенции энтерококков, выделенных от животных в норме и при патологии // Ветеринария, 2015. № 6. С. 26-30. [Poshvina D.V., Shchepitova N.E., Sycheva M.V. Species characteristics and persistence factors of enterococci isolated from animals in normal and pathological conditions. *Veterinariya = Veterinary*, 2015, no. 6, pp. 26-30. (In Russ.)]

14. Сычева М.В., Карташова О.Л. Биологические свойства энтерококков различного происхождения // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2015. № 4. С. 17-21. [Sycheva M.V., Kartashova O.L. Biological properties of enterococci of various origins. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, no. 4, pp. 17-21. (In Russ.)]

15. Сычева М.В., Пашкова Т.М., Карташова О.Л., Пашина О.А., Попова Л.П. Характеристика антицитокиновой активности энтерококков // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2015. № 3.

С. 1-6. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-3/Articles/SMV-2015-3.pdf>. [Sycheva M.V., Pashkova T.M., Kartashova O.L., Pashinina O.A., Popova L.P. Characteristics of anti-cytokine activity of enterococci. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2015, no. 3, pp. 1-6. [Electronic resource]. Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-3/Articles/SMV-2015-3.pdf>.

Авторы:

Пашина О.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — структурного научного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Карташова О.Л. — д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — структурного научного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Пашкова Т.М. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — структурного научного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Гриценко В.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — структурного научного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Authors:

Pashinina O.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Microbial Persistence and Symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Kartashova O.L., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Microbial Persistence and Symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Pashkova T.M., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Microbial Persistence and Symbiosis, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

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

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА IL-1 β ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОМПЛЕКСОВ МИРНК, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОГРИППОЗНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Пашков Е.А.^{1,2}, Пак А.В.¹, Абрамова Н.Д.², Яковлева И.В.²,
Вартанова Н.О.², Богданова Е.А.¹, Пашков Е.П.¹, Свитич О.А.^{1,2},
Зверев В.В.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва,
Россия

Резюме. Грипп является одной из наиболее актуальных проблем мирового здравоохранения на сегодняшний день. Вирус гриппа обладает иммуносупрессивными свойствами, что способно приводить к развитию вторичных иммунодефицитов, препятствуя функционированию механизмов активации системы интерферонов, приводя к нарушению образования провоспалительных цитокинов. Наиболее важным участником формирования противовирусного иммунитета является IL-1 β . Данный цитокин играет важную роль в повышении экспрессии генов MCP-1 и MCP-3 и созревании макрофагов и дендритных клеток. Индукция выработки IL-1 β происходит в результате взаимодействия лиганда с Toll-подобными рецепторами. В настоящее время существует большое количество препаратов, направленных на профилактику и терапию гриппозной инфекции, однако их применение в ряде случаев является затруднительным ввиду высокой мутационной изменчивости вируса гриппа, что делает его устойчивым к данным препаратам. Следовательно, особо важным является вопрос разработки и создания эффективных методов борьбы с подобными инфекциями. Перспективным методом терапии и профилактики вирусных респираторных инфекций может являться процесс РНК-интерференции. РНК-интерференция – процесс деградации чужеродной мРНК посредством молекул малых интерферирующих РНК (миРНК). Целью настоящего исследования является оценка экспрессии гена IL-1 β при трансфекции комплексов миРНК, направленных к клеточным генам *FLT4*, *Nup98*, *Nup205*. Оценка изменения вирусной репродукции проводилась с помощью титрования по ЦПЭ вирусосодержащей жидкости. Уровень экспрессии гена IL-1 β определялся с помощью ОТ-ПЦР-РВ. По результатам оценки изменения вирусной репродукции получено, что использование всех комплексов миРНК, направленных к клеточным генам, приводит к достоверному снижению вирусной репродукции на первые сутки после заражения. Применение комплексов *Nup205* + *FLT4* и *FLT4* + *Nup205* + *Nup98* приводило к снижению вирусной репродукции также и на вторые сутки ($p < 0,05$) соответственно, по сравнению с неспецифическим и вирусным контролями. При анализе экспрессионного профиля гена IL-1 β наблюдался рост его экспрессии на 1-е сутки для всех комплексов миРНК и на 2-е и 3-и сутки для комплексов *Nup98* + *FLT4* и *Nup205* + *Nup98*. В ходе исследования было установлено, что подавление активности клеточных генов *FLT4*, *Nup98* и *Nup205*, необходи-

Адрес для переписки:

Пашков Евгений Алексеевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин
и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (916) 228-73-53.
E-mail: pashckov.j@yandex.ru

Address for correspondence:

Pashkov Evgeny A.
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a.
Phone: 7 (916) 228-73-53.
E-mail: pashckov.j@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.А. Пашков, А.В. Пак, Н.Д. Абрамова, И.В. Яковлева,
Н.О. Вартанова, Е.А. Богданова, Е.П. Пашков,
О.А. Свитич, В.В. Зверев «Изучение экспрессии гена
IL-1 β под действием комплексов миРНК, обладающих
противогриппозным действием» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 485-490.
doi: 10.46235/1028-7221-1202-SEO

© Пашков Е.А. и соавт., 2022

For citation:

E.A. Pashkov, A.V. Pak, N.D. Abramova, I.V. Yakovleva,
N.O. Vartanova, E.A. Bogdanova, E.P. Pashkov, O.A. Svitich,
V.V. Zverev “Studying expression of IL-1 β gene under the
action of siRNA complexes with anti-influenza effect”, Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 485-490.
doi: 10.46235/1028-7221-1202-SEO

DOI: 10.46235/1028-7221-1202-SEO

мых для вирусной репродукции, приводило к достоверному снижению вирусной активности и росту экспрессии IL-1 β .

Ключевые слова: РНК-интерференция, miРНК, респираторные вирусные инфекции, IL-1 β , экспрессия, вирус гриппа

STUDYING EXPRESSION OF IL-1 β GENE UNDER THE ACTION OF siRNA COMPLEXES WITH ANTI-INFLUENZA EFFECT

Pashkov E.A.^{a,b}, Pak A.V.^a, Abramova N.D.^b, Yakovleva I.V.^b,
Vartanova N.O.^b, Bogdanova E.A.^a, Pashkov E.P.^a, Svitich O.A.^{a,b},
Zverev V.V.^{a,b}

^a I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^b I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. Influenza is one of the most urgent global health problems today. The influenza virus has immunosuppressive properties, which can lead to the development of secondary immunodeficiencies, interfering with the functioning of the interferon system activation, thus leading to impaired production of pro-inflammatory cytokines. IL-1 β is the most important player in development of antiviral immunity. This cytokine plays an important role in boosting the expression of the MCP-1 and MCP-3 genes and maturation of macrophages and dendritic cells. Induction of IL-1 β production occurs due to interaction of the ligand with Toll-like receptors. Currently, there is a lot of drugs aimed at the prevention and treatment of influenza infection. However, their use in some cases is difficult due to high mutational variability of the influenza virus, thus making it resistant to these drugs. Therefore, the issue of developing and creating effective methods to combat such infections is of particular importance. A promising approach to the treatment and prevention of viral respiratory infections may be connected with RNA interference. This process consists of degradation of foreign mRNA by small interfering RNA (siRNA) molecules. The aim of the present study was to evaluate expression of the IL-1 β gene upon transfection of miRNA complexes directed to the cellular *FLT4*, *Nup98*, *Nup205* genes. Evaluation of changed viral reproduction was carried out using titration by CPE virus-containing fluid. Expression level of the IL-1 β gene was determined by means of real-time RT-PCR. Assessment of the changes in viral reproduction allowed us to reveal that the use of all the miRNA complexes directed to the cellular genes lead to a significant decrease in viral reproduction on the 1st day after infection. Usage of Nup205 + FLT4 and FLT4 + Nup205 + Nup98 complexes proved to cause a decrease in viral reproduction on the second day as well ($p < 0.05$), as compared with nonspecific and viral controls. When analyzing expression profile of the IL-1 β gene, an increase in its expression was observed on the 1st day for all miRNA complexes and on the 2nd and 3rd days for the Nup98 + FLT4 and Nup205 + Nup98 complexes. In the course of the study, it was found that suppression of the cellular genes *FLT4*, *Nup98* and *Nup205* activities, which are necessary for viral reproduction, led to a significant decrease in viral activity and an increase in IL-1 β expression.

Keywords: RNA interference, miRNA, respiratory viral infections, IL-1 β , expression, influenza virus

Введение

Среди респираторных вирусных заболеваний гриппозная инфекция на сегодняшний день не теряет своей актуальности. По оценке ВОЗ, ежегодно регистрируется около 1 миллиарда новых случаев гриппа, до 3-5 миллионов случаев осложнений и до 500 000 смертей во всем мире. Наряду с поражением дыхательной системы, грипп (ВГА, IAV) способен вызывать осложнения в работе ряда таких систем органов, как респираторная, сердечно-сосудистая либо иммунная [9].

Вирус гриппа обладает иммуносупрессивными свойствами, что способно приводить к развитию вторичных иммунодефицитов [8]. Вирусы гриппа имеют в своем составе белок NS-1 (nonstructural protein-1), чьей функцией является дисрегуляция

механизмов активации системы интерферонов, что приводит к нарушению образования провоспалительных цитокинов [8].

Наиболее важным участником формирования противовирусного иммунитета является IL-1 β [6]. Данный цитокин играет важную роль в повышении экспрессии генов MCP-1 и MCP-3 и созревании макрофагов и дендритных клеток. Индукция выработки IL-1 β происходит вследствие взаимодействия лиганда с Toll-подобными рецепторами 3-го типа [1, 2].

В настоящее время существует большое количество препаратов, направленных на профилактику и терапию гриппозной инфекции. Однако достижение эффективного результата от применения лекарственных средств в ряде случаев является затруднительным ввиду высокой мута-

ционной изменчивости вируса гриппа, что делает его резистентным к данным препаратам [5].

Исходя из этого, особо важным является вопрос разработки и создания эффективных методов борьбы с подобными инфекциями. Потенциально перспективным методом терапии и профилактики вирусных респираторных инфекций может являться подавление активности клеточных генов, участвующих в репродукции вируса, с помощью РНК-интерференции.

РНК-интерференция – это процесс подавления экспрессии гена-мишени под влиянием малых интерферирующих РНК (миРНК, *siRNA*). Также процесс РНК-интерференции часто используется для подавления вирусной репродукции [4]. Наш подход также предполагает использование клеточных генов *FLT4*, *Nup98*, *Nup205*, подавление экспрессии которых приводит к значительному снижению вирусной репродукции *in vitro* [7].

Целью настоящего исследования является оценка экспрессии гена *IL-1 β* при трансфекции комплексов миРНК, направленных к клеточным генам *FLT4*, *Nup98*, *Nup205*.

Материалы и методы

Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова» – при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Министерства образования и науки России, Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021. Дизайн миРНК осуществляли с помощью программы siDirect2.0. Все олигонуклеотиды синтезированы в «Синтол» (Россия). Подготовка миРНК к работе, а также их последовательности представлены в нашем более раннем исследовании [8]. В качестве неспецифического контроля использовалась миРНК *L2*, специфичная к гену светляковой люциферазы и не влияющая на жизненный цикл клеток A549. В работе использован вирус гриппа A/WSN/33 (H1N1) (Детский исследовательский госпиталь Святого Джуда, США). Культивирование и определение титра вируса проводилось на культуре клеток MDCK. Заражение культур клеток осуществлялось при множественности инфицирования 0,01. В работе использовались клетки почек кокерспаниеля MDCK (Институт Пастера, Франция) и клетки аденокарциномы человеческого легкого A549 (ATCC® CCL-185, США). Клетки MDCK выращивали в среде MEM («ПанЭко», Россия), содержащей 5% эмбриональной сыворотки коров (ЭСК) (Gibco, США), 40 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия), и 300 мкг/мл L-глутамин («ПанЭко», Россия) при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Клетки A549 выращивали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 5% ЭСК (Gibco,

США), 40 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия) и 300 мкг/мл L-глутамин («ПанЭко», Россия) при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Для оценки цитотоксичности трансфицируемых комплексов миРНК был использован МТТ-тест. На 1-е, 2-е, 3-е сутки после трансфекции в лунки с клетками 96-луночного планшета добавляли по 20 мкл раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл («ПанЭко», Россия) и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 ч. Далее культуральную жидкость отбирали и добавляли в лунки по 100 мкл изопропанола (Sigma-Aldrich, США) в каждую лунку. С помощью планшетного спектрофотометра (Varioscan, Thermo Fisher Scientific, США) определяли оптическую плотность каждой лунки при 530 нм с учетом фоновых значений при 620 нм. Для трансфекции комплексов миРНК, клетки A549 высевали на 24-луночные планшеты в посевной концентрации 1:3. После образования 80% клеточного монослоя, клетки промывались раствором Хенкса («ПанЭко», Россия). Далее смесь Lipofectamin 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) и Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США) добавляли к раствору миРНК в среде Opti-MEM и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Суммарная концентрация каждого из четырех комплексов миРНК, необходимая для нокдауна генов, составила 20 пмоль/мкл на лунку. Составы комплексов миРНК указаны в таблице 1. После инкубации комплексы добавляли к клеткам. миРНК *siL2* была использована в качестве неспецифического контроля. Затем клетки инкубировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Спустя 4 ч культуральную среду удаляли из всех лунок, кроме отрицательного контроля и добавляли по 0,5 мл вирусосодержащей жидкости с множественностью заражения (МОИ) 0,01, состоящей из среды DMEM, 0,001% тозил-фенилаланилхлорметилкетона (Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone, ТРСК) (Sigma-Aldrich, Германия), 40 мкг/мл гентамицина. После этого клетки вновь помещали в CO₂-инкубатор. В течение трех последующих суток отбирались образцы супернатанта для последующего титрования и клеточный лизат для оценки изменений экспрессии *IL-1 β* методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Комплексы миРНК, использованные в исследовании, представлены в таблице 1.

Общую РНК выделяли из клеточного лизата набором ExtractRNA («Евроген», Россия). Для постановки реакции обратной транскрипции применяли набор реагентов «ОТ-1» («Синтол», Россия). Для оценки экспрессии *IL-1 β* использовали ОТ-ПЦР-РВ, а также 2^{- $\Delta\Delta C_t$} метод. Вирусный титр определялся по крайней точке визуального проявления цитопатического эффекта в культуре клеток MDCK. Клетки MDCK сеяли в

96-луночные планшеты с посевной концентрацией $1 \times 10^4/\text{см}^2$. Через 2 суток питательная среда удалялась из лунок, вносились 10-кратные последовательные разведения вирусного материала в поддерживающей среде без трипсина и инкубировали на протяжении 4 суток в CO_2 -инкубаторе при 37°C . На четвертые сутки проводили визуальный учет результатов титрования под микроскопом на наличие специфического цитопатического эффекта для вируса гриппа (изменение, деформация, открепление мертвых клеток со дна лунки). Статистическую значимость полученных результатов определяли с помощью критерия Манна–Уитни. Разница считалась достоверной при $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,05$. Показатели достоверности рассчитывались с использованием ПО Minitab 2.0 (Minitab, США).

Результаты и обсуждение

С целью определения эффективности противовирусного действия миРНК и снижения вирусной репродукции, на культуре клеток MDCK выполнялось титрование вирусосодержащей жидкости на 1-е, 2-е и 3-и сутки с момента трансфекции. Было установлено, что при множественности заражения 0,01 использование всех комплексов миРНК, направленных к клеточным генам, приводит к достоверному снижению вирусной репродукции на первые сутки после заражения. Применение комплексов Nup205 + FLT4 и FLT4 + Nup205 + Nup98 приводило к снижению вирусной репродукции на 1,8 и 2 lg ТЦД₅₀/мл на первые и на 1,8 и 2,5 lg ТЦД₅₀/мл на вторые сутки ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с неспецифическим и вирусным контролями.

Оценка экспрессии IL-1 β проводилась с использованием метода ОТ-ПЦР-РВ и оценочно-го критерия $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. В таблице 2 показаны результаты оценки экспрессии IL-1 β . Было выявлено, что при MOI = 0,01, достоверное повышение экспрессии IL-1 β на 28% (Nup98 + FLT4), 58% (Nup205 + Nup98), 62% (Nup205 + FLT4) и 33% (FLT4 + Nup205 + Nup98) наблюдалось относительно неспецифической миРНК L2 на первые

сутки ($p \leq 0,05$). При трансфекции комплексов А и В также отмечалось достоверное повышение экспрессии IL-1 β на вторые и третьи сутки. На вторые сутки рост экспрессии составил 84% для комплекса А и 77% для комплекса В относительно миРНК L2 ($p \leq 0,05$). На третьи сутки повышенная экспрессия IL-1 β также отмечалась в клетках, трансфицированных комплексами А и В, и составила 90% для комплекса А и 332% для комплекса В относительно миРНК L2.

Настоящая работа является исследованием по изучению экспрессии гена IL-1 β как основного провоспалительного цитокина и в качестве одного из критериев эффективности применения миРНК в отношении клеточных генов, принимающих непосредственное участие в репродукции вируса гриппа. IL-1 β является основным провоспалительным цитокином. Данный цитокин играет важную роль в повышении экспрессии генов MCP-1 и MCP-3 и созревании макрофагов и дендритных клеток. Это приводит к более выраженной воспалительной реакции и активации эффективной системы презентации антигена [3]. Параллельно с этим, IL-1 β обладает и другими иммунологическими функциями: способствует дифференцировке и пролиферации В- и Т-лимфоцитов (преимущественно Т-хелперов), повышение продукции белков острой фазы и стимуляция активности клеток эндотелия. Также IL-1 β служит индуктором активации для Т-клеток через систему АПК [3].

В ходе исследования было установлено, что подавление активности клеточных генов *FLT4*, *Nup98* и *Nup205*, необходимых для вирусной репродукции, приводило к достоверному снижению вирусной активности и росту экспрессии IL-1 β . Важно, однако, учитывать, что комплексы миРНК по-разному влияли на экспрессию IL-1 β . Можно сделать предположение, что подобный результат обусловлен тем фактом, что каждый комплекс миРНК уникален и имеет собственную нуклеотидную последовательность и способен по-разному взаимодействовать с Toll-подобными рецепторами 3-го типа, поскольку именно они взаимодействуют с двухцепочечной молекулой

ТАБЛИЦА 1. КОМПЛЕКСЫ миРНК, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В РАБОТЕ

TABLE 1. COMPLEX siRNA USED IN THE WORK

Комплекс миРНК Complex siRNA	Процессы вирусной репродукции, на которые влияет комплекс миРНК Virus reproduction processes in which siRNA complexes are found
Nup98 + FLT4	Ядерный импорт вРНК / вирусный эндоцитоз vRNA nuclear import / viral endocytosis
Nup205 + Nup98	Ядерный импорт вРНК vRNA nuclear import
Nup205 + FLT4	Ядерный импорт вРНК / вирусный эндоцитоз vRNA nuclear import / viral endocytosis
FLT4 + Nup205 + Nup98	Ядерный импорт вРНК / вирусный эндоцитоз vRNA nuclear import/viral endocytosis

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА IL-1 β В ТЕЧЕНИЕ ТРЕХ СУТОК С МОМЕНТА ТРАНСФЕКЦИИ И ЗАРАЖЕНИЯ, % (* – p \leq 0,05 ОТНОСИТЕЛЬНО НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ L2)

TABLE 2. DYNAMICS OF IL-1 β GENE EXPRESSION DURING THREE DAYS WITH THE MOMENTS OF TRANSFECTION AND INFECTION, % (*, p \leq 0.05 RELATIVE TO NON-SPECIFIC CONTROL L2)

Комплекс миРНК Complex siRNA	Сутки Day		
	1	2	3
Nup98 + FLT4 / IAV	32 \pm 6*	96 \pm 9*	112 \pm 8*
Nup205 + Nup98 / IAV	62 \pm 38*	89 \pm 15*	354 \pm 69*
Nup205 + FLT4 / IAV	66 \pm 50*	20 \pm 4	103 \pm 86
FLT4 + Nup205 + Nup98 / IAV	37 \pm 7*	32 \pm 3	56 \pm 3
L2 / IAV	4 \pm 5	12 \pm 6	22 \pm 12
IAV	10 \pm 7	35 \pm 10	18 \pm 16
Отриц. контроль Negative control	100 \pm 20	105 \pm 26	105 \pm 26

Примечание. * – данные в таблице приведены в процентном соотношении. За 100 процентов принято экспрессия гена IL-1 β в незараженных клетках (отриц. контроль). Расчет достоверности результатов проводился относительно зараженных клеток с неспецифической миРНК L2 (L2/IAV).

Note. *, the data in the table are given as a percentage. The expression of the IL-1 β gene in uninfected cells was taken as 100 percent (negative control). The calculation of the reliability of the results was carried out in relation to infected cells with non-specific miRNA L2 (L2/IAV).

РНК. Совокупность этих факторов может приводить, по-нашему мнению, к неоднородному росту экспрессии IL-1 β .

Заключение

Применение миРНК в качестве лекарственного средства не ограничивается респиратор-

ными или иными вирусными инфекциями, но также может находить применение в терапии соматических и наследственных заболеваний, поскольку роль Toll-подобные рецепторы принимают непосредственное участие в развитии многих патологий, в том числе и неинфекционных.

Список литературы / References

1. Ганковская О.А., Бахарева И.В., Ганковская Л.В., Сомова О.Ю., Зверев В.В. Исследование экспрессии генов TLR9, NF- κ B, ФНО α в клетках слизистой цервикального канала беременных с герпесвирусной инфекцией // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2009. № 2. С. 61-64. [Gankovskaya O.V., Bakhareva I.V., Gankovskaya L.V., Somova O.Yu., Zverev V.V. Study of expression of TLR9, NF- κ B, TNF α genes in cells of cervical canal mucosa in pregnant women with herpesvirus infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2009, no. 2, pp. 61-64. (In Russ.)]
2. Макаров О.В., Бахарева И.В., Ганковская Л.О. [и др.] // Toll-подобные рецепторы в генезе невынашивания беременности // Акушерство и гинекология, 2008. № 2. С. 22-27. [Makarov O.V., Bakhareva I.V., Gankovskaya L.V., Romanovskaya V.V., Gankovskaya O.A. Toll-like receptors in the genesis of miscarriage. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2015, no. 2, pp. 22-27. (In Russ.)]
3. Duan T., Du Y., Xing C., Wang H.Y., Wang R.F. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 3, pp. 1-22. doi: 10.3389/fimmu.2022.812774.
4. Gavrillov K., Saltzman W.M. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J. Biol. Med.*, 2012, Vol. 85, no. 2, pp. 187-200.
5. Han J., Perez J., Schafer A., Cheng H., Peet N., Rong L., Manicassamy B. Influenza virus: small molecule therapeutics and mechanisms of antiviral resistance. *Curr. Med. Chem.*, 2018, Vol. 25, no. 38, pp. 5115-5127.
6. Park H.S., Liu G., Thulasi Raman S.N., Landreth S.L., Liu Q., Zhou Y. NS1 Protein of 2009 Pandemic Influenza A Virus Inhibits Porcine NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1 Beta Production by Suppressing ASC Ubiquitination. *J. Virol.*, 2018, Vol. 92, no. 8, pp. 1-16.
7. Pashkov E., Korchevaya E., Faizuloev E., Rtishchev A., Cherepovich B., Bystritskaya E., Sidorov A., Poddubikov A., Bykov A., Dronina Y., Svitch O., Zverev V. Knockdown of FLT4, Nup98, and Nup205 cellular genes effectively suppresses the reproduction of influenza virus strain A/WSN/1933 (H1N1) *in vitro*. *Infect. Disord. Drug Targets*, 2022, Vol. 5, pp. 100-108.
8. Plotnikova M.A., Klotchenko S.A., Vasin A.V. Development of a multiplex quantitative PCR assay for the analysis of human cytokine gene expression in influenza A virus-infected cells. *J. Immunol. Methods*, 2016, Vol. 430, pp. 51-55.

9. Trougakos I.P., Stamatelopoulos K., Terpos E., Tsitsilonis O.E., Aivalioti E., Paraskevis D., Kastritis E., Pavlakis G.N., Dimopoulos M.A. Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. *J. Biomed. Sci.*, 2021, Vol. 28, no. 1, 9. doi: 10.1186/s12929-020-00703-5.

Авторы:

Пашков Е.А. — ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет); младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Пак А.В. — студентка ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Абрамова Н.Д. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Яковлева И.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных гибридов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Вартанова Н.О. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории условно-патогенных бактерий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Богданова Е.А. — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Пашков Е.П. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Зверев В.В. — д.б.н., академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Authors:

Pashkov E.A., Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Pak A.V., Student, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abramova N.D., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Yakovleva I.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Hybridomas, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Vartanova N.O., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Microbiology of Opportunistic Bacteria, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Bogdanova E.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Pashkov E.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Zverev V.V., PhD, MD (Biology), Full Member, Russian Academy of Sciences, Scientific Advisor, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Head, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Поступила 15.07.2022

Отправлена на доработку 20.07.2022

Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022

Revision received 20.07.2022

Accepted 28.07.2022

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИ-TNF ТЕРАПИИ У ДЕТЕЙ С ИММУНОЗАВИСИМЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПО АКТИВНОСТИ NF-κB В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ

Петричук С.В.¹, Радыгина Т.В.¹, Купцова Д.Г.¹, Курбатова О.В.¹, Семикина Е.Л.^{1,2}, Мурашкин Н.Н.^{1,2,3}, Потапов А.С.^{1,2}, Фисенко А.П.¹

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

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

³ ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента РФ, Москва, Россия

Резюме. Ядерный фактор транскрипции κB (NF-κB) регулирует функции врожденного и адаптивного иммунитета, является медиатором воспалительных реакций, активируя транскрипцию провоспалительных цитокинов. Ингибиторы TNF блокируют сигнальный путь NF-κB, снижая активность воспалительного процесса. Цель исследования – оценить информативность определения фактора транскрипции NF-κB в популяциях лимфоцитов у детей с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) и псориазом для оценки эффективности анти-TNF терапии. Обследованы: 124 ребенка с ВЗК и 55 детей с вульгарным псориазом на фоне поддерживающего курса анти-TNF терапии, 30 здоровых детей. Разделение на группы проводили по индексам PCDIA, PUCAI, PASI (≤ 10 – ремиссия). Количество клеток с транслокацией NF-κB определяли методом проточной цитометрии с визуализацией (Amnis ImageStream^x Mk II). Статистическую обработку проводили программой Statistica 10.0 и SPSS 16.0. Наибольшее количество клеток с транслокацией NF-κB выявлено в В-лимфоцитах и НК-клетках, что достоверно выше, чем в Т-хелперах и цитотоксических Т-лимфоцитах (p = 0,000). У пациентов в стадии обострения увеличен процент клеток с транслокацией NF-κB в популяциях НК-клеток, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Th17-лимфоцитов, цитотоксических Th17-лимфоцитов (Tc17) и Treg относительно группы сравнения. В состоянии ремиссии активность NF-κB в популяциях лимфоцитов ниже, чем в стадии обострения. При псориазе в состоянии ремиссии активность NF-κB в В-лимфоцитах, НК-клетках, цитотоксических Т-лимфоцитах была достоверно ниже, чем в группе сравнения. При ВЗК в состоянии ремиссии активность NF-κB была повышена только в Т-хелперах. Уровень транслокации NF-κB в популяции НК-клеток отличался у детей с ВЗК и псориазом как в обострении (ВЗК – 46,2% (34-58); псориаз – 36,5% (29-48), p = 0,041), так и

Адрес для переписки:

Петричук Светлана Валентиновна
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: cito@list.ru

Address for correspondence:

Petrichuk Svetlana V.
National Medical Research Center for Children's Health
119296, Russian Federation, Moscow,
Lomonosovsky ave., 2, bldg 1.
Phone: 7 (499) 134-13-98.
Fax: 7 (499) 134-70-01.
E-mail: cito@list.ru

Образец цитирования:

С.В. Петричук, Т.В. Радыгина, Д.Г. Купцова, О.В. Курбатова, Е.Л. Семикина, Н.Н. Мурашкин, А.С. Потапов, А.П. Фисенко «Оценка эффективности анти-tnf терапии у детей с иммунозависимыми заболеваниями по активности NF-κB в популяциях лимфоцитов» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 491-498.
doi: 10.46235/1028-7221-1191-EOA

© Петричук С.В. и соавт., 2022

For citation:

S.V. Petrichuk, T.V. Radygina, D.G. Kuptsova, O.V. Kurbatova, E.L. Semikina, N.N. Murashkin, A.S. Potapov, A.P. Fisenko "Evaluation of anti-TNF treatment efficiency in children with immune-dependent diseases by means of testing the NF-κB activity in lymphocyte populations", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 491-498.
doi: 10.46235/1028-7221-1191-EOA

DOI: 10.46235/1028-7221-1191-EOA

в ремиссии заболевания (ВЗК – 25,4% (22-35); псориаз – 19,1% (17-22), $p = 0,000$). ROC-анализ состояний «обострение/ремиссии» по количеству НК-клеток с транслокацией NF-κB показал хорошее качество разделительной модели ($AUC > 0,8$): cut-off при ВЗК составил 41% ($Se = 65,4$; $Sp = 89,1$), при псориазе – 23% ($Se = 85,2$; $Sp = 94,7$). Показана информативность уровня транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов у детей с ВЗК и псориазом для оценки эффективности анти-TNF терапии. Обострение заболевания при снижении эффективности терапии характеризуется активацией NF-κB в популяциях лимфоцитов у детей с ВЗК и псориазом.

Ключевые слова: дети, ВЗК, вульгарный псориаз, NF-κB, лимфоциты, проточная цитометрия с визуализацией

EVALUATION OF ANTI-TNF TREATMENT EFFICIENCY IN CHILDREN WITH IMMUNE-DEPENDENT DISEASES BY MEANS OF TESTING THE NF-κB ACTIVITY IN LYMPHOCYTE POPULATIONS

Petrichuk S.V.^a, Radygina T.V.^a, Kuptsova D.G.^a, Kurbatova O.V.^a, Semikina E.L.^{a, b}, Murashkin N.N.^{a, b, c}, Potapov A.S.^{a, b}, Fisenko A.P.^a

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

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

^c Central State Medical Academy, Department of Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation

Abstract. Nuclear transcription factor κB (NF-κB) regulates innate and adaptive immunity functions and mediates inflammatory responses by activating proinflammatory cytokine gene transcription. TNF inhibitors block the NF-κB signaling pathway, thus reducing inflammatory activity. The aim of the study was to evaluate the informativity of NF-κB transcription factor determination in the lymphocyte populations in children with inflammatory bowel disease (IBD) and psoriasis to assess the efficacy of anti-TNF therapy. We have examined 124 children with IBD and 55 children with psoriasis vulgaris administered maintenance anti-TNF therapy, and 30 healthy children. Stratification into the study groups was carried out according to PCDIA, PUCAI, PASI indices (≤ 10 , remission). The number of cells with NF-κB translocation was determined by flow cytometry with visualization (Amnis ImageStreamX Mk II). Statistical evaluation was performed using Statistica 10.0 and SPSS 16.0. The highest number of cells with NF-κB translocation was detected in B-lymphocytes and NK cells, thus being significantly higher than in T helper cells and cytotoxic T lymphocytes ($p = 0.000$). The percentage of cells with translocation of NF-κB in populations of NK cells, T helper, cytotoxic T lymphocytes, Th17 lymphocytes, cytotoxic Th17 lymphocytes (Tc17) and Treg was increased in the patients at the acute disease stage against the comparison group. In the remission state, NF-κB activity in lymphocyte populations was lower than in acute stage. In remission of psoriasis, NF-κB activity in B lymphocytes, NK cells, and cytotoxic T lymphocytes was significantly lower than in comparison group. In IBD remission state, the NF-κB activity was elevated only in T-helper cells. The level of NF-κB translocation in the NK-cell population differed in children with IBD and psoriasis, both in acute phase (IBD, 46.2% (34-58); psoriasis, 36.5% (29-48), $p = 0.041$), and remission of disease (IBD, 25.4% (22-35); psoriasis, 19.1% (17-22), $p = 0.000$). ROC analysis of the data from “exacerbation/remission” states assessed as the NK cell numbers with NF-κB translocation showed a good quality of the stratification model ($AUC > 0.8$): The cut-off value in IBD was 41% ($Se = 65.4$; $Sp = 89.1$), and in psoriasis it was 23% ($Se = 85.2$; $Sp = 94.7$). The informativity of NF-κB translocation level in lymphocyte populations in children with IBD and psoriasis was shown to correlate with efficacy of anti-TNF therapy. Exacerbation the disease with decreased therapeutic response is characterized by NF-κB activation in lymphocyte populations in the children with IBD and psoriasis.

Keywords: children, IBD, psoriasis vulgaris, NF-κB, lymphocytes, Amnis ImageStream

Введение

Ядерный фактор транскрипции κB (NF- κB) регулирует функции врожденного и адаптивного иммунитета, является основным медиатором воспалительных реакций [6]. Этот фактор транскрипции был открыт в зрелых В-лимфоцитах и в настоящее время обнаружен в различных клетках иммунной системы: Т-лимфоцитах, нейтрофилах, макрофагах, дендритных клетках и др. [5, 6]. NF- κB влияет на процессы воспаления за счет синтеза провоспалительных цитокинов, хемокинов и молекул адгезии, а также регулирует клеточную пролиферацию, апоптоз, морфогенез и дифференцировку [11, 15]. В отсутствие специфических сигналов белки NF- κB связаны с ингибирующим комплексом (I κB) и находятся в цитоплазме в латентном состоянии. Под действием стимулирующего агента происходит высвобождение NF- κB от I κB и транслокация его в ядро клетки, где он активирует транскрипцию контролируемых генов [6, 13].

Нарушение регуляции NF- κB играет важную роль в патогенезе таких иммунозависимых заболеваний, как ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), рассеянный склероз, атеросклероз, системная красная волчанка, псориаз и др. [4, 11, 12, 14]. Для лечения аутоиммунных заболеваний используются препараты модулирующие активацию NF- κB : глюкокортикостероиды, нестероидные противовоспалительные препараты и антитела, нейтрализующие цитокины и их рецепторы, в частности анти-TNF препараты [5, 6]. Накоплен богатый опыт применения ингибиторов TNF у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, которые блокируют сигнальный путь NF- κB и, тем самым, снижают активность воспалительного процесса [3, 5, 6, 8]. Однако применение анти-TNF терапии не всегда эффективно: у 30% пациентов с ВЗК и псориазом наблюдается потеря эффекта и не удается достичь стойкой ремиссии заболевания [1, 10]. В связи с этим, мониторинг уровня транслокации NF- κB (количество активированных клеток) может отражать эффективность иммуносупрессивной терапии при аутоиммунных заболеваниях.

Цель исследования — оценить информативность определения фактора транскрипции NF- κB в различных популяциях лимфоцитов у детей с иммунозависимыми заболеваниями для оценки эффективности анти-TNF терапии.

Материалы и методы

В исследование включены 124 ребенка с ВЗК и 55 детей с вульгарным псориазом, группу сравнения составили 30 здоровых детей. Возраст детей

составил: ВЗК (группа 1) — Ме 13,4 (10,3-16,1), псориаз (группа 2) — Ме 12,5 (8,3-15,5), группа сравнения (группа 3) — Ме 12,4 (7,4-16,1). Проведенное исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Все пациенты были обследованы на фоне поддерживающего курса (более 16 недель) анти-TNF терапии: для ВЗК — препаратами инфликсимабом и адалимумабом, для детей с псориазом — адалимумабом и этанерцептом. Тяжесть заболевания у пациентов с ВЗК оценивали по индексам активности PCDIA для болезни Крона и PUCAI для язвенного колита, для пациентов с псориазом — по индексу PASI. Низкая степень активности заболевания соответствовала индексам ≤ 10 — ремиссия, значения индексов > 10 — обострение. В состоянии ремиссии было 46 детей с ВЗК и 24 ребенка с псориазом, в состоянии обострения 78 детей с ВЗК и 31 пациент с вульгарным псориазом.

Имунофенотипирование лимфоцитов и оценку уровня транслокации NF- κB из цитоплазмы в ядро проводили на предварительно выделенных мононуклеарных клетках периферической крови (PBMCs). В работе использовали моноклональные антитела, меченные флуорохромами: CD19-PE, CD4-PE, CD8-PE, CD(16/56)-PE, CD127-PE, CD161-PE, CD3-ECD, CD4-PB, CD25-PE-Cy7 (Beckman Coulter, США). Исследовали следующие популяции клеток: CD3⁺CD19⁺ (В-лимфоциты); CD3⁺CD16⁺/CD56⁺ (NK-клетки); CD3⁺CD4⁺ (Т-хелперы); CD3⁺CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты); CD3⁺CD161⁺CD4⁺ (Th17-лимфоциты); CD3⁺CD161⁺CD8⁺ (цитотоксические Th17-лимфоциты — Tc17); CD4⁺CD25⁺CD127^{high} (активированные Т-хелперы — Thact); CD4⁺CD25⁺CD127^{low} (регуляторные Т-лимфоциты — Treg).

Оценку количества клеток с транслокацией NF- κB проводили методом проточной цитометрии с визуализацией (Amnis ImageStream^x Mk II) с применением набора Amnis NF- κB Translocation Kit (Luminex, США). Визуализацию и запись клеток выполняли при 40-кратном увеличении и низкой скорости потока, анализировали изображения отдельных клеток в хорошем фокусе. Для двойных позитивных клеток — NF- κB ⁺/7-AAD⁺ определяли процент клеток с транслокацией NF- κB в популяциях лимфоцитов (% активированных клеток).

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета Statistica 10.0, описательная статистика показателей представлена в виде: Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Для оценки значимости различий между группами использовали

непараметрический критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. ROC-анализ выполняли с использование программы SPSS 16.0.

Результаты и обсуждение

Проведенный анализ показал, что у пациентов с ВЗК и псориазом в стадии обострения уве-

личен процент клеток с транслокацией NF-κB в популяциях НК-клеток, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Th17-лимфоцитах, Tc17, Thact и Treg относительно группы сравнения (табл. 1). Количество В-лимфоцитов с транслокацией NF-κB в состоянии обострения заболевания в обеих группах не отличалось от уровня здоровых детей (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ПРОЦЕНТ КЛЕТОК С ТРАНЛОКАЦИЕЙ NF-κB В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ВЗК И ПСОРИАЗОМ В СТАДИИ ОБОСТРЕНИЯ И РЕМИССИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 1. PERCENTAGE OF CELLS WITH TRANSLOCATION OF NF-κB IN LYMPHOCYTE POPULATIONS IN CHILDREN WITH IBD AND PSORIASIS AT THE STAGE OF EXACERBATION AND REMISSION OF THE DISEASE

Популяция Population	Состояние Condition	ВЗК IBD Группа 1 Group 1	Псориаз Psoriasis Группа 2 Group 2	Группа сравнения Comparison group Группа 3 Group 3	Уровень достоверности Confidence level p
CD19	Обострение Exacerbation	60,3 (45-73)	54,5 (43-74)	58,4 (40-72)	$p_{1,3} = 0,471$; $p_{2,3} = 0,994$
	Ремиссия Remission	46,3 (37-57)*	41,1 (36-51)*		$p_{1,3} = 0,068$; $p_{2,3} = 0,019$
НК	Обострение Exacerbation	46,2 (34-58)	36,5 (29-48)	29,9 (18-42)	$p_{1,3} = 0,000$; $p_{2,3} = 0,007$
	Ремиссия Remission	25,4 (22-35)*	19,1 (17-22)*		$p_{1,3} = 0,489$; $p_{2,3} = 0,001$
CD4	Обострение Exacerbation	28,5 (19-41)	22,8 (19-34)	18,4 (14-20)	$p_{1,3} = 0,000$; $p_{2,3} = 0,000$
	Ремиссия Remission	19,8 (17-26)*	18,1 (16-20)*		$p_{1,3} = 0,017$; $p_{2,3} = 0,473$
CD8	Обострение Exacerbation	24,6 (17-36)	22,6 (18-28)	17,2 (16-24)	$p_{1,3} = 0,001$; $p_{2,3} = 0,011$
	Ремиссия Remission	18,0 (14-22)*	15,4 (13-17)*		$p_{1,3} = 0,755$; $p_{2,3} = 0,040$
Th17	Обострение Exacerbation	29,3 (21-38)	22,9 (21-32)	19,6 (17-23)	$p_{1,3} = 0,000$; $p_{2,3} = 0,001$
	Ремиссия Remission	20,6 (16-26)*	18,3 (14-22)*		$p_{1,3} = 0,067$; $p_{2,3} = 0,377$
Tc17	Обострение Exacerbation	32,8 (23-44)	32,6 (25-37)	20,8 (16-26)	$p_{1,3} = 0,000$; $p_{2,3} = 0,000$
	Ремиссия Remission	24,0 (14-31)*	16,4 (14-17)*		$p_{1,3} = 0,532$; $p_{2,3} = 0,009$
Thact	Обострение Exacerbation	25,9 (18-39)	20,9 (16-31)	15,2 (15-18)	$p_{1,3} = 0,000$; $p_{2,3} = 0,004$
	Ремиссия Remission	18,8 (13-27)*	17,6 (14-20)*		$p_{1,3} = 0,102$; $p_{2,3} = 0,518$
Treg	Обострение Exacerbation	28,4 (20-43)	29,0 (21-36)	20,3 (16-26)	$p_{1,3} = 0,001$; $p_{2,3} = 0,001$
	Ремиссия Remission	23,6 (19-28)**	20,6 (20-25)*		$p_{1,3} = 0,087$; $p_{2,3} = 0,518$

Примечание. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,05$ при сравнении состояний «обострение-ремиссия» внутри групп.

Note. *, $p < 0.01$; **, $p < 0.05$ when comparing “exacerbation-remission” states within groups.

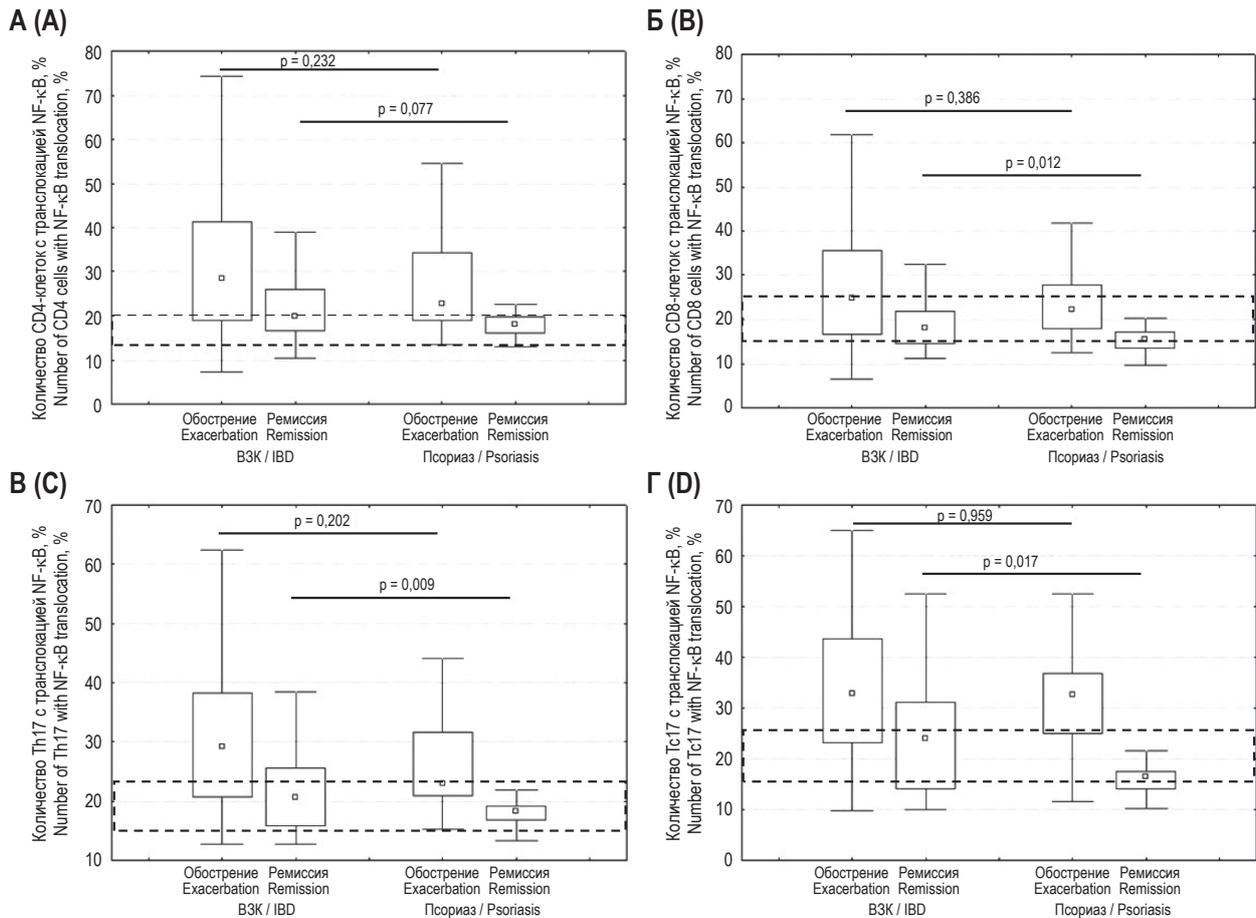


Рисунок 1. Относительное количество Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Th17 и Tc17 с транслокацией NF-κB при обострении и ремиссии ВЗК и псориаза у детей

Примечание. Пунктиром выделен диапазон нормы для количества клеток с транслокацией NF-κB. Данные представлены в виде: Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}); разброс без выбросов.

Figure 1. Relative number of T helpers, cytotoxic T lymphocytes, Th17 and Tc17 with NF-κB translocation during exacerbation and remission of IBD and psoriasis in children

Note. The dotted line highlights the norm range for the number of cells with translocation NF-κB. The data is presented in the form: Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}); non-outlier range.

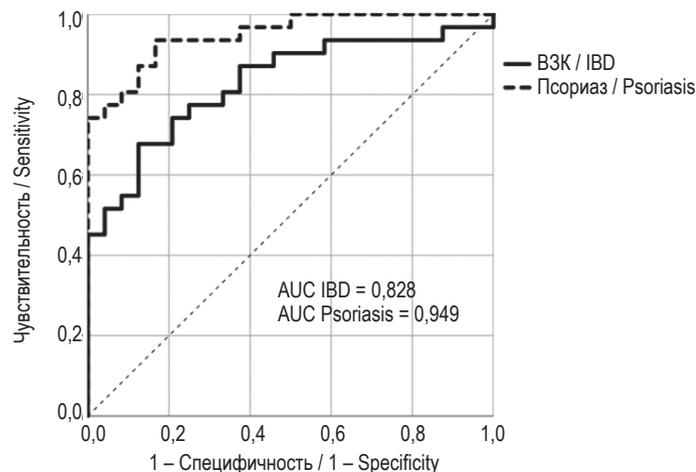


Рисунок 2. ROC-кривые для разделения состояний «обострение-ремиссия» по количеству НК-клеток с транслокацией NF-κB для детей с ВЗК и псориазом

Figure 2. ROC curves for the separation of "exacerbation-remission" states by the number of NK cells with NF-κB translocation for children with IBD and psoriasis

У детей с псориазом в состоянии ремиссии на фоне анти-TNF терапии процент клеток с транслокацией NF-κB в популяциях В-лимфоцитов, НК-клеток, цитотоксических Т-лимфоцитах и Tc17 был достоверно ниже, чем в группе сравнения (табл. 1). Тогда как у пациентов с ВЗК в состоянии ремиссии активность NF-κB не отличалась от группы сравнения во всех популяциях, за исключением Т-хелперов, в которых активность оставалась повышенной (табл. 1).

В состоянии ремиссии заболевания на фоне биологической терапии активность фактора NF-κB была достоверно ниже во всех исследованных популяциях, чем в стадии обострения, как для ВЗК, так и при псориазе (табл. 1).

Хотелось бы отметить, что у детей с ВЗК в состоянии обострения и в ремиссии заболевания наибольшее количество клеток с транслокацией NF-κB в изученных популяциях было выявлено в популяции В-лимфоцитов и в НК-клетках. Активность фактора транскрипции в этих популяциях достоверно превышает активность в Т-хелперах и цитотоксических Т-лимфоцитах ($p = 0,000$). Данный факт согласуется с результатами исследований, полученных при других иммунозависимых патологиях и у здоровых [2, 3].

В состоянии ремиссии заболевания у детей с ВЗК выявлено достоверно более высокий уровень активности NF-κB в популяциях цитотоксических Т-лимфоцитов, Th17 и Tc17, чем в группе детей с псориазом (рис. 1). При сравнении количества клеток с транслокацией NF-κB у пациентов с ВЗК и псориазом в состоянии обострения количество В-лимфоцитов ($p = 0,44$), Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Th17, Tc17, Thact ($p = 0,212$) и Treg ($p = 0,849$) с транслокацией NF-κB не отличалось, но в группе детей с ВЗК наблюдался больший разброс показателей (рис. 1).

Уровень транслокации NF-κB в популяции НК-клеток был единственным показателем, который отличался у детей с ВЗК и псориазом как в

состоянии обострения (ВЗК – 46,2 (34-58); псориаз – 36,5 (29-48), $p = 0,041$), так и в ремиссии заболевания (ВЗК – 25,4 (22-35); псориаз – 19,1 (17-22), $p = 0,000$).

Проведенный ROC-анализ для состояний обострение-ремиссия по количеству НК-клеток с транслокацией NF-κB для детей с ВЗК и псориазом показал очень хорошее качество разделительной модели (рис. 2). Расчеты показали, что уровень cut-off данного показателя для детей с ВЗК составил 41% (Se = 65,4; Sp = 89,1), для детей с псориазом – 23% (Se = 85,2; Sp = 94,7).

NF-κB один из наиболее изученных факторов транскрипции, впервые идентифицирован в ядре В-лимфоцитов. Этот белок играет ключевую роль в регуляции иммунной системы человека, а его неконтролируемая дисрегуляция связана со многими хроническими заболеваниями, включая рак, аутоиммунные заболевания и воспалительные процессы [9]. В настоящее время разработаны методы количественной оценки уровня транслокации NF-κB в различных популяциях клеток [7]. Проведенное исследование показало информативность определения уровня транслокации NF-κB в популяциях лимфоцитов для детей с ВЗК и псориазом для оценки эффективности терапии блокаторами TNFα. Для состояния обострения характерно повышение активности NF-κB в популяциях Т-хелперов, Th17-лимфоцитах и Treg, которые играют непосредственную роль в развитии воспаления при ВЗК и псориазе [9].

Заключение

Таким образом, состояние обострения заболевания на фоне анти-TNF терапии (при снижении эффективности терапии) характеризуется активацией фактора транскрипции NF-κB в популяциях лимфоцитов у детей с ВЗК и псориазом. Повышение НК-клеток с транслокацией NF-κB у детей с ВЗК более 41%, а у детей с псориазом более 23% может быть предиктором снижения эффективности анти-TNF терапии.

Список литературы / References

1. Илларионов А.С., Потапов А.С., Петричук С.В., Фисенко А.П., Радыгина Т.В., Купцова Д.Г., Сурков А.Н., Коноплева Т.Н. Значение мониторинга уровня инфликсимаба и антител к нему в сыворотке крови для оптимизации терапии воспалительных заболеваний кишечника у детей // Вопросы практической педиатрии, 2021. Т. 16, № 2. С. 14–21. [Illarionov A.S., Potapov A.S., Petrichuk S.V., Fisenko A.P., Radygina T.V., Kuptsova D.G., Surkov A.N., Konopleva T.N. Monitoring of serum levels of infliximab and anti-infliximab antibodies and its role in optimizing therapy of inflammatory bowel disease in children. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Clinical Practice in Pediatrics*, 2021, Vol. 16, no. 2, pp. 14-21. (In Russ.)]
2. Комах Ю.А., Борзенко С.А., Радыгина Т.В., Купцова Д.Г., Петричук С.В. Фактор транскрипции NF-κB в прогнозе результата рекератопластики // Офтальмологический журнал, 2021. № 2. С. 16-22. [Komakh Y.A., Borzenok S.A., Radygina T.V., Kuptsova D.G., Petrichuk S.V. Transcription factor NF-κB in the prognosis of outcomes for patients undergoing repeat keratoplasty. *Oftalmologicheskii zhurnal = Journal of Ophthalmology (Ukraine)*, 2021, no. 2, pp. 16-22. (In Russ.)]
3. Купцова Д.Г., Петричук С.В., Мурашкин Н.Н., Курбатова О.В., Радыгина Т.В., Хотко А.А., Иванов Р.А. Активность ядерного фактора транскрипции κB в популяциях лимфоцитов у детей с псориазом // Вест-

ник РГМУ, 2022. № 2. С. 30-38. [Kuptsova D.G., Petrichuk S.V., Murashkin N.N., Kurbatova O.V., Radygina T.V., Khotko A.A., Ivanov R.A. Activity of nuclear factor κ B in lymphocyte populations of children with psoriasis. *Vestnik RGMU = Bulletin of Russian State Medical University*, 2022, no. 2, pp. 28-35. (In Russ.)]

4. Abdallah H.B, Johansen C., Iversen L. Key signaling pathways in psoriasis: recent insights from antipsoriatic therapeutics. *Psoriasis (Auckl.)*, 2021, Vol. 11, pp. 83-97.

5. Andres-Ejarque R., Ale H.B., Grys K., Tosi I., Solanky S., Ainali C., Catak Z., Sreeneebus H., Saklatvala J., Dand N., de Rinaldis E., Chapman A., Nestle F.O., Barnes M.R., Warren R.B., Reynolds N.J., Griffiths C., Barker J.N., Smith C.H., Di Meglio P., PSORT Consortium. Enhanced NF- κ B signaling in type-2 dendritic cells at baseline predicts non-response to adalimumab in psoriasis. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 4741, pp. 1-16.

6. Barnabei L., Laplantine E., Mbongo W., Rieux-Laucat F., Weil, R. NF- κ B: At the borders of autoimmunity and inflammation. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 716469. doi: 10.3389/fimmu.2021.716469.

7. Barteneva N.S., Vorobjev I.A. Imaging flow cytometry methods and protocols. *Methods Mol. Biol.*, 2017, pp. 178-188.

8. Herrington F.D., Carmody R.J., Goodyear C.S. Modulation of NF- κ B signaling as a therapeutic target in autoimmunity. *J. Biomol. Screen.*, 2016, Vol. 21, no. 3, pp. 223-242.

9. Kunnumakara A.B., Shabnam B., Girisa S., Harsha C., Banik K., Devi T B., Choudhury R., Sahu H., Parama D., Sailo B.L., Thakur K.K., Gupta S.C., Aggarwal B.B. Inflammation, NF- κ B, and chronic diseases: how are they linked? *Crit. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 40, no. 1, pp. 1-39.

10. Liao M.M., Oon H.H. Therapeutic drug monitoring of biologics in psoriasis. *Biologics*, 2019, Vol. 13, pp. 127-132.

11. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2017, Vol. 2, 17023. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.

12. McDaniel D.K., Eden K., Ringel V.M., Allen I.C. Emerging roles for noncanonical NF- κ B signaling in the modulation of inflammatory bowel disease pathobiology. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2016, Vol. 22, no. 9, pp. 2265-2279.

13. Uttarkar S., Brembilla N.C., Boehncke W. H. Regulatory cells in the skin: Pathophysiologic role and potential targets for anti-inflammatory therapies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 143, no. 4, pp. 1302-1310.

14. Zhang Q., Lenardo M.J., Baltimore D. 30 Years of NF- κ B: A blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell*, 2017, Vol. 168, no. 1-2, pp. 1-40.

15. Zaidi D., Wine, E. Regulation of nuclear factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B Cells (NF- κ B) in inflammatory bowel diseases. *Front. Pediatr.*, 2018, Vol. 6, 317. doi: 10.3389/fped.2018.00317

Авторы:

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

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, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

Семикина Е.Л. — д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии, руководитель лабораторного отдела 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

Authors:

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

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

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

Kurbatova O.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

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 (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Мурашкин Н.Н. — д.м.н., заведующий отделением дерматологии с группой лазерной хирургии, заведующий лабораторией патологии кожи у детей отдела научных исследований в педиатрии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента 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

Потапов А.С. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории научных основ детской гастроэнтерологии и гепатологии, заведующий гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой 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

Murashkin N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Research Institute of Pediatric Dermatology, Dermatology Department with a Laser Surgery unit, Head, Laboratory of Children's Skin Pathology, National Medical Research Center for Children's Health; Professor, Department of Dermatovenereology and Cosmetology, Central State Medical Academy, Department of Presidential Affairs; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Potapov A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Research in Pediatric Gastroenterology and Hepatology, Head, Gastroenterology Department with Hepatology Group, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

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

Поступила 15.07.2022
Отправлена на доработку 21.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022
Revision received 21.07.2022
Accepted 28.07.2022

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПАЦИЕНТА С СИНДРОМОМ ГИЙЕНА–БАРРЕ ПОСЛЕ ПЕРЕНОСЕННОГО COVID-19

Пономарева Н.Ю.¹, Кошелев Р.В.¹, Лазарев В.В.¹, Кочетков А.В.^{1,2}

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации и курортологии Федерального медико-биологического агентства России», Москва, Россия

² Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России», Москва, Россия

Резюме. Представлен клинический случай реабилитации после развития острой воспалительной полирадикулонейропатии аутоиммунного генеза – синдрома Гийена–Барре у пациента, перенесшего новую коронавирусную инфекцию SARS CoV-2. Пациенту с отягощенным преморбидным фоном (гипертоническая болезнь, гиперхолестеринемия, сахарный диабет 2 типа, стенозирующий атеросклероз брахиоцефальных артерий) было проведено исследование однонуклеотидных полиморфизмов генов, ассоциированных с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний, нарушений обмена, иммунопатологией, фармакогенетикой – с применением полимеразной цепной реакции PCR-RT «Генетический паспорт» и трактовка результатов для прогноза развития осложнений, нежелательных лекарственных реакций и выбора биомаркеров для проведения превентивных мер. Сопоставлены клинические проявления, коморбидный фон и выявленные особенности генотипа: минорные гомо- и гетерозиготные варианты генов *ACE*, *AGT*, *CYP1A2*, *NOS3*, *PPARD*, *EDN*, *PALLD*, *SNX19*, ассоциированные с предрасположенностью к сердечно-сосудистой патологии, увеличивающие риск нарушения регуляции артериального давления, развития эндотелиальной дисфункции; варианты генов: *FXII*, *ITGA2*, *ITGB3*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*, *PAI-1*, увеличивающие риск венозных и артериальных тромбозов, варианты генов *ADRB3*, *FTO*, *INSIG2*, *KCNJ11*, *LEP*, *PPARD*, *TCF7L2*, *ApoC3*, *PON1*, ассоциированные с нарушениями углеводного и липидного обмена; полиморфизмы в генах, детерминирующих иммунный ответ: *IL4*, *IL6*, *IL8*, *IL10*, *CDH1*, *BDNF1*, *CRP*, гена *CCR5* (в котором аллель del 32 считается маркером тяжелого течения SARS-CoV-2), гомозиготный полиморфизм гена *FCGR2*, ассоциирован с риском развития антиген-антитело-комплемент-опосредованной цитотоксичности, циркуляторного стаза, оседанием иммунных комплексов на эндотелии микрососудов, снижением ан-

Адрес для переписки:

Пономарева Наталья Юрьевна
ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр
медицинской реабилитации и курортологии Федерального
медико-биологического агентства России»
141551, Россия, Московская обл., Солнечногорский район,
д. Голубое.
Тел.: 8 (495) 536-21-12.
E-mail: ponomarevanyu@ckbvl.net

Address for correspondence:

Ponomareva Natalia Yu.
Federal Research and Clinical Center of Medical
Rehabilitation and Balneology
141551, Russian Federation, Moscow Region, Solnechnogorsk
District, Goluboe.
Phone: 7 (495) 536-21-12.
E-mail: ponomarevanyu@ckbvl.net

Образец цитирования:

Н.Ю. Пономарева, Р.В. Кошелев, В.В. Лазарев,
А.В. Кочетков «Клинико-генетическое обследование
и восстановительное лечение пациента с синдромом
Гийена–Барре после перенесенного COVID-19»
// Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 4. С. 499-504.
doi: 10.46235/1028-7221-1166-CGC
© Пономарева Н.Ю. и соавт., 2022

For citation:

N.Yu. Ponomareva, R.V. Koshelev, V.V. Lazarev,
A.V. Kochetkov “Clinical genetic counselling and rehabilitation
treatment of a patient with Guillain–Barré syndrome after
COVID-19”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 499-504.
doi: 10.46235/1028-7221-1166-CGC
DOI: 10.46235/1028-7221-1166-CGC

титромбогенной и повышением прокоагулянтной активности; по данным фармакогенетического исследования антикоагулянтов выявлен вариант гена *CYP4F2*; при оценке ответа на антиагреганты выявлен полиморфизм гена *CYP2C19*, ассоциированный с замедлением метаболизма ряда лекарств, что определяет необходимость повышения дозы или выбора препарата с другим механизмом действия; варианты генов *CYP1A2*, *GSTP1*, *GSTT1* снижают эффективность детоксикационной системы организма; варианты генов *NAT2*5* и *NAT2*6* определяют снижение активности фермента, при назначении стандартной дозы лекарственных препаратов — процесс их детоксикации замедлен, накопление токсических метаболитов клинически проявляется нежелательными реакциями (гепатотоксичность, диспепсия, волчаночноподобный синдром, полиневриты). На основе генотипа, определяющего патогенез мультифакториальной патологии (в т. ч. и иммуно-опосредованные осложнения COVID-19), для пациента рекомендован персонализированный подход к лечению и профилактике осложнений с мониторингом биохимических, иммунологических и коагулологических биомаркеров, адекватным выбором фармпрепаратов.

Ключевые слова: новая коронавирусная инфекция, постковидный синдром, коморбидность, синдром Гийена–Барре, молекулярная диагностика, персонализированный подход, реабилитация

CLINICAL GENETIC COUNSELLING AND REHABILITATION TREATMENT OF A PATIENT WITH GUILLAIN–BARRÉ SYNDROME AFTER COVID-19

Ponomareva N. Yu.^a, Koshelev R. V.^a, Lazarev V. V.^a, Kochetkov A. V.^{a, b}

^a Federal Research and Clinical Center of Medical Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russian Federation

^b Federal Research and Clinical Center for Specialized Medical Care and Medical Technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract. The authors present a clinical case of rehabilitation after the development of Guillain–Barré syndrome, an acute autoimmune inflammatory polyradiculoneuropathy, in a patient who underwent a SARS CoV-2 infection. The patient previously manifested with severe comorbidities (arterial hypertension, hypercholesterolemia, type 2 diabetes mellitus, stenosing atherosclerosis of brachiocephalic arteries). A diagnostic panel of single nucleotide gene polymorphisms associated with risk factors of cardiovascular diseases, metabolic disorders, immunopathology, pharmacogenetics was applied using PCR-RT “Genetic Passport” test system, and the results were interpreted in order to predict potential complications, adverse drug reactions and the choice of biomarkers for preventive measures. We have compared clinical manifestations, comorbid background and the identified genotype features, as follows: minor homo- and heterozygous variants of *ACE*, *AGT*, *CYP1A2*, *NOS3*, *PPARD*, *EDN*, *PALLD*, *SNX19* genes associated with predisposition to cardiovascular diseases, increasing the risk of dysregulation of blood pressure, development of endothelial dysfunction. The following gene variants were revealed: *FXII*, *ITGA2*, *ITGB3*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*, *PAI-1* that increase the risk of venous and arterial thrombosis, along with gene variants of *ADRB3*, *FTO*, *INSIG2*, *KCNJ11*, *LEP*, *PPARD*, *TCF7L2*, *ApoC3*, *PON1* associated with carbohydrate and lipid metabolism disorders; polymorphisms in the genes determining the immune response, i.e., *IL4*, *IL6*, *IL8*, *IL10*, *CDH1*, *BDNF1*, *CRP*, *CCR5* (with del32 allele considered a risk factor of severe SARS-CoV-2), homozygous polymorphism of a gene of *FCGR2* associated with risk of antigen-antibody-complement-mediated cytotoxicity, circulation arrest, deposition of immune complexes in endothelium of microvessels, decreased antithrombotic effects and increased procoagulant activity. Pharmacogenetic study revealed a variant of the *CYP4F2* gene, a *CYP2C19* gene polymorphism associated with delayed metabolism of a number of pharmaceuticals which requires higher drug dosage, or choosing a drug with a different mechanism of action; gene variants of *CYP1A2*, *GSTP1*, *GSTT1* reducing efficiency of the cellular detoxification system; *NAT2*5* and *NAT2*6* variants determining a decrease in appropriate enzyme activities when administering a standard dose of drugs with slowdown of their detoxification, accumulation of toxic metabolites causing clinical adverse effects (hepatotoxicity,

dyspepsia, lupus-like syndrome, polyneuritis). Based on the genotype that determines pathogenesis of the multifactorial pathology (including immune-mediated complications of COVID-19), a personalized approach is recommended to the patient, in terms of treatment and prevention of complications. On the basis of testing the biochemical, immunological and blood coagulation biomarkers, an adequate choice of pharmaceuticals is recommended for the patient.

Keywords: COVID, post-covid syndrome, comorbidity, Guillain–Barré syndrome, molecular diagnostics, personalized approach, rehabilitation

Введение

Генетически детерминированные особенности работы регуляторных систем, участвующих в процессах реализации иммунного ответа, гомеостаза, гемостаза, детоксикации и других защитно-приспособительных механизмов, ассоциированные с патогенезом развития мультифакториальных заболеваний (МФЗ), в клинической практике используются как инструмент персонализированной медицины [4].

Цель — выявление у пациента, перенесшего COVID-19 с последующим развитием синдрома Гийена–Барре, с отягощенным преморбидным фоном полиморфизма генов, ассоциированных с патологией адаптационно-регуляторных систем — для прогноза развития осложнений, нежелательных лекарственных реакций и выбора биомаркеров для проведения превентивных мер.

Материалы и методы

Молекулярно-генетическое типирование одонуклеотидных полиморфизмов генов с применением полимеразной цепной реакции PCR-RT; трактовка на основе данных мета-анализов и полногеномного поиска ассоциаций генотипов с клиническими проявлениями (GWAS — Genome Wide Association Studies); диагностика, лечение и реабилитация с использованием персонализированных подходов, разработанных в ФМБА.

Результаты и обсуждение

Пациент 70 лет, в семейном и личном анамнезе ССЗ, СД2, возрастные когнитивные и двигательные нарушения. В апреле 2021 г. перенес новую коронавирусную инфекцию внебольничную полисегментарную пневмонию, с положительной динамикой (по КТ органов грудной клетки и PCR-теста) выписан из стационара. Однако в течение двух последующих недель появилась и нарастала (до невозможности самостоятельно ходить) симметричная парестезия, слабость и онемение конечностей, в клинике нервных болезней был установлен диагноз — синдром Гийена–Барре (СГБ). В сыворотке крови пациента методом им-

муноферментного анализа (ИФА) определялись: суммарные аутоантитела (IgM+G) к ганглиозидам asialo-GM1, GM1, GM2, GD1a, GD1b, GQ1b (выявлены антитела к ганглиозиду GD1b); содержание антител классов IgA и IgG к *Campylobacter jejuni* и антител класса IgM и IgG к ЦМВ (выявлены антитела к IgM к ЦМВ. Пациенту проведен пятидневный курс — внутривенный иммуноглобулин (интратект) 0,4 на 1 кг веса, нейропротекторная терапия (цитиколин) 500 мг в течение 10 дней, ипидакрин по 15 мг 14 дней. Затем пациент переведен для реабилитационного лечения в ФГБУ ФНКЦ МРиК ФМБА России с диагнозом «синдром Гийена–Барре — дистальная дисметаболическая сенсомоторная полинейропатия с тетрапарезом 4б». Состояние после перенесенной новой коронавирусной инфекции, двусторонней полисегментарной пневмонии, с выраженным астеническим синдромом. Сопутствующий диагноз: мультисистемная атрофия, паркинсонизм, вестибулопатия, дисциркуляторная энцефалопатия на фоне гиперхолестеринемии, стенозирующего атеросклероза, гипертонической болезни, СД2. Пациент поступил с хронической задержкой мочеотделения (установлена цистостома) с вялым тетрапарезом кистей и стоп, с нарушением чувствительности, снижением сухожильных рефлексов, снижением мышечной силы, развитием гипотрофии мышц конечностей, брадикинезией, постуральным тремором, дисдиадохикинезом. На ЭМГ — нарушение проведения импульса по аксонально-демиелинизирующему типу. В отделении персонализированной медицины ФГБУ ФНКЦ МРиК ФМБА России, пациент консультировался ранее в 2018 г. по поводу анамнеза, осложненного ССЗ и коморбидной патологией. Было проведено генотипирование по набору панелей «Генетический паспорт», включающих полиморфизмы генов предрасположенности к МФЗ. При повторном консультировании после перенесенной коронавирусной инфекции, осложненной аутоиммунным синдромом Гийена–Барре, в связи с необходимостью длительного назначения лекарственной терапии, была проведена ретроспективная трактовка данных генотипирования с реко-

мендациями по мониторингованию биомаркеров и выбору фармпрепаратов для предотвращения осложнений и нежелательных лекарственных реакций. В результате молекулярно-генетического исследования пациента выявлены минорные полиморфизмы генов в гетеро- и гомозиготном состоянии: *ACE*, *AGT*, *CYP1A2*, *NOS3*, *PPARD*, *EDN*, *PALLD*, *SNX19*, увеличивающие риск нарушения регуляции артериального давления, развития эндотелиальной дисфункции, ишемического инсульта, инфаркта миокарда; с риском нарушений гемокоагуляции и ССЗ ассоциированы варианты генов: *FXII*, *ITGA2*, *ITGB3*, (предрасполагающие к тромбообразованию за счет увеличения адгезии и агрегации тромбоцитов, снижению тромболитической активности аспирина), сочетанные полиморфизмы генов *MTHFR*, *MTRR*, *MTR* (определяющие нарушения обмена фолатов с развитием гипергомоцистеинемии, что увеличивает риск артериальных и венозных тромбозов и требует контроля уровня гомоцистеина, витаминов группы В); гомозиготный полиморфизм гена *PAI-1* ассоциирован со сниженным тромболитическим (в лечении тромбозов показаны фибринолизин и активаторы фибринолиза, малые дозы низкомолекулярного гепарина); варианты генов *ADRB3*, *FTO*, *INSIG2*, *KCNQ11*, *LEP*, *PPARD*, *TCF7L2*, *ApoC3*, *PON1* предрасполагают к нарушениям углеводного и липидного обмена, развитию гиперлипидемии, метаболического синдрома и СД2, слабому ответу на лечение фибратами, сочетание полиморфизмов генов *ApoC3* и *PON1* ассоциировано с повышенным уровнем тревожности, развитием панических атак и других психовегетативных проявлений [2]; при исследовании набора генов, ассоциированных с иммунопатологией – выявлены полиморфизмы в генах провоспалительных цитокинов *IL4*, *IL6*, *IL8*, *IL10*, которые, так же как и полиморфизм генов *CDH1*, *BDNF1*, повышают риск избыточной реакции иммунной системы на инфекцию; гена *CRP*, который ассоциирован с гипервоспалением, атеротромбозом и повышенным риском ССЗ; гена *CCR5* (гетерозиготный вариант wt/del 32 ассоциирован с аутоиммунными заболеваниями [1], а при анализе данных обследования пациентов с COVID-19 аллель del 32 *CCR5* расценен как генетический маркер смерти, связанной с SARS-CoV-2); гомозиготный полиморфизм гена *FCGR2* (кодирует рецептор для Fc конца иммуноглобулинов G, который при избытке инфекционных антигенов повышает риск развития антиген-антитело-комплемент-опосредованной цитотоксичности, циркуляторный стаз, оседание иммунных комплексов на эндотелии микросо-

судов) определяет снижение антитромбогенной и повышение прокоагулянтной активности [5]; по данным фармакогенетического исследования ответа на антикоагулянты кумаринового ряда, выявлен вариант гена *CYP4F2*, который незначителен и не требует изменения стандартной дозы; при оценке ответа на антиагреганты – полиморфизм гена *CYP2C19*, ассоциированный с замедлением метаболизма ряда препаратов: Клопидогрель (Плавикс) и др., что связано с необходимостью повышения стандартной дозы; полиморфизм гена *CYP1A2* ассоциирован со снижением метаболизма кофеина; выявленные варианты в *GSTP1*, *GSTT1* снижают эффективность детоксикационной системы организма (особенно при сочетании с экзотоксикантами и курением); варианты *NAT2*5* и *NAT2*6* определяют снижение активности фермента, при назначении стандартной дозы лекарственных препаратов процесс их детоксикации замедлен, накопление токсических метаболитов клинически проявляется нежелательными реакциями (гепатотоксичность, диспепсия, волчаночноподобный синдром, полиневриты) [3].

В лечении пациента с постковидным синдромом Гийена–Барре применялся комплексный подход: внутривенный иммуноглобулин, нейрорепараторная терапия, ипидакрин, на втором этапе реабилитации – инъекции (нейпилепт, аксамон, мельдоний, элькар), внутрь (амарил, сиофор, главус, мадопар, лозартан, фелодип, роксера, ксарелто, бисопролол, сорбифер, дюфалак, нимесулид), немедикаментозное лечение: внутривенное лазерное облучение крови, гипербарическая оксигенация, механотерапия на реабилитационных тренажерах с биологической обратной связью, занятия на тренажере «Орторент», подостимуляция на подошвенном имитаторе опорной нагрузки «Корвит», массаж конечностей, индивидуальная гимнастика по методике лечения тетрапареза, 4-камерные ванны, дарсонваль.

Заключение

Выявленные данные генотипа пациента позволяют учитывать особенности патогенеза сердечно-сосудистой и коморбидной патологии и механизмы развития синдрома аутоиммунной дисметаболической сенсо-моторной полинейропатии после COVID-19, повышенного тромбозориска, с контролем биомаркеров (белков воспаления, печеночных ферментов, коагулограммы, гомоцистеина), а также индивидуализировать выбор фармпрепаратов, исходя из особенностей фармакокинетики пациента, что уменьша-

ет риск нежелательных лекарственных реакций. Выявленные нормальные полиморфизмы в генах *CYP1A1*, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *SLCO1B1*, *COMT* – позволяют использовать в терапии стандартную дозировку препаратов: леводопа (мадопар) в лечении паркинсонизма, глимепирид (амарил) в лечении СД2, НПВП (нимесулид), розувастатин (Роксера), Ксарелто (Ривароксабана), β1-адреноблокатора (Бисопролол). При применении терапии выбранными фармпрепаратами – нежелательных лекарственных реакций не наблюдалось. При выписке отмечено улучшение: стал звучнее голос, уменьшились боли и жжение в

ногах, восстановилась чувствительность на руках, выросла сила в конечностях, появились коленные рефлексы, пациент самостоятельно садится в постели, стоит и ходит с поддержкой в ходунках, стал активнее, гемодинамика стабильная, биохимические показатели в пределах нормы. Выписан по месту жительства с рекомендациями для проведения третьего этапа реабилитации под наблюдением терапевта, невролога, уролога, эндокринолога и дальнейшего восстановительного санаторно-курортного лечения с учетом выявленных индивидуальных особенностей.

Список литературы / References

1. Вологжанин Д.А., Голота А.С., Камилова Т.А., Шнейдер О.В., Щербак С.Г. Генетика COVID-19 // Клиническая практика, 2021. № 12 (1). С. 41-52. [Vologzhanin D.A., Golota A.S., Kamilova T.A., Schneider O.V., Shcherbak S.G. Genetics of COVID-19. *Klinicheskaya praktika = Clinical Practice*, 2021, no. 12 (1), pp. 41-52. (In Russ.)]
2. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. Под ред В.С. Баранова. СПб.: Издательство Н-Л, 2009. 528 с. [Genetic passport – the basis of individual and predictive medicine / Ed. V.S. Baranov]. St. Petersburg: N-L Publishing house, 2009. 528 p.
3. Сычев Д.А., Кукес В.Г., Ташенова А.И. Фармакогенетическое тестирование – новая медицинская технология // Модернизация здравоохранения: политика и управление в здравоохранении, 2010. № 2. С. 39-43. [Sychev D.A., Kukes V.G., Tashenova A.I. Pharmacogenetic testing: a new medical technology. *Modernizatsiya zdravookhraneniya: politika i upravlenie v zdravookhranenii = Health Modernization: Health Policy and Management*, 2010, no. 2, pp. 39-43. (In Russ.)]
4. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Кофиади И.А. Роль иммуногенетики в решении фундаментальных и прикладных задач персонализированной медицины // Медицина экстремальных ситуаций, 2016. № 3. С. 9-24. [Khaitov R.M., Alekseev L.P., Kofiadi I.A. The role of immunogenetics in solving the fundamental and applied problems of personalized medicine. *Meditcina ekstremalnykh situatsiy = Medicine of Extreme Situations*, 2016, no. 3, pp. 9-24. (In Russ.)]
5. Чернова А.А., Толстокорова Ю.А. Роль однонуклеотидного полиморфизма гена CCR5 в развитии ревматоидного артрита // Российский иммунологический журнал, 2019. № 4. С. 15-17. [Chernova A.A., Tolstokorova J.A. The role of the single nucleotide polymorphism of the CCR5 gene in the development of rheumatoid arthritis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, no. 4, pp. 15-17. (In Russ.)]

Авторы:

Понюмарева Н.Ю. – к.м.н., врач-генетик, заведующая отделением персонифицированной медицины ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации и курортологии Федерального медико-биологического агентства России», Москва, Россия

Коселев Р.В. – д.м.н., исполняющий обязанности генерального директора ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации и курортологии Федерального медико-биологического агентства России», Москва, Россия

Authors:

Ponomareva N. Yu., PhD (Medicine), Clinical Geneticist, Head, Department of Personalized Medicine, Federal Research and Clinical Center of Medical Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russian Federation

Koshelev R. V., PhD, MD (Medicine), Acting General Director, Federal Research and Clinical Center of Medical Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russian Federation

Лазарев В.В. — к.м.н., заведующий неврологическим отделением ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации и курортологии Федерального медико-биологического агентства России», Москва, Россия

Кочетков А.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой реабилитации Академии постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»; заместитель главного врача по науке и медицинским технологиям ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации и курортологии Федерального медико-биологического агентства России», Москва, Россия

Lazarev V.V., PhD (Medicine), Head, Department of Neurology, Federal Research and Clinical Center of Medical Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russian Federation

Kochetkov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Rehabilitation, Academy of Postgraduate Education, Federal Research and Clinical Center for Specialized Medical Care and Medical Technologies; Deputy Chief Physician for Science and Medical Technology, Federal Research and Clinical Center of Medical Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russian Federation

Поступила 07.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 07.07.2022
Accepted 28.07.2022

ДИНАМИКИ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ СЕМЕЙСТВА IL-6, АДИПОНЕКТИНА И ЛЕПТИНА В ПОСТКОВИДНОМ ПЕРИОДЕ У ПАЦИЕНТОВ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Радаева О.А.¹, Симбирцев А.С.^{2,3}, Костина Ю.А.¹, Негоднова Е.В.¹,
Бесшейнов Д.Д.¹, Машнина С.В.¹, Еремеев В.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

² ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. COVID-19 является мультисистемным заболеванием, однако масштабы последствий SARS-CoV-2 инфицирования в настоящее время недостаточно изучены, особенно у лиц с метаболическими нарушениями. Цель исследования – изучить особенности изменения уровней цитокинов семейства IL-6 (IL-6 и sIL-6, LIF и sLIFr), адипонектина и лептина в течение 360 дней после SARS-CoV-2 инфицирования у пациентов с метаболическим синдромом (МС) для выделения иммунопатогенетических особенностей в зависимости от вакцинации для профилактики COVID-19 в анамнезе.

Для достижения поставленной цели были сформированы группы пациентов: 1) больные с МС, которые перенесли COVID-19 (КТ-1-2) через 6-12 месяцев после полной вакцинации векторной вакциной (32 человека); 2-я группа – пациенты с МС, которые перенесли COVID-19 (КТ-1-2) без вакцинации в анамнезе (29 человек). Группа контроля – условно здоровые лица без МС: 3) вакцинированные и 4) невакцинированные, также перенесшие COVID-19.

Определение IL-6 и sIL-6, LIF и sLIFr, лептина и адипонектина, NO, ADMA, SDMA проводили методом ИФА. У пациентов с МС выявлены изменения цитокиновой регуляции в сторону провоспалительных реакций (рост уровня IL-6 в крови, повышение лептина), что наиболее выражено при МС в первые 30 дней постковидного периода, но с сохранением ряда изменений в течение 12 месяцев наблюдения (например, повышение в крови концентрации лептина). Вакцинация для профилактики COVID-19 снижает степень выраженности эффектов действия провоспалительного звена в системах sIL-6r/IL-6 и лептин/адипонектин в сторону протективного адипонектина, но не отменяет стойкого повышения лептина. В рамках представленных результатов не выявлено негативных отличия в группе однократно вакцинированных лиц с МС в рамках анализируемых звеньев цитокиновой регуляции

Адрес для переписки:

Радаева Ольга Александровна
ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский
Мордовский государственный университет имени
Н.П. Огарева»
430000, Россия, г. Саранск, ул. Ульянова, 26а.
Тел./факс: 8 (8342) 3-21-98.
E-mail: radaevamed@mail.ru

Address for correspondence:

Radaeva Olga A.
N. Ogarev National Research Mordovia State University
430000, Russian Federation, Saransk, Ulyanov str., 26a.
Phone/fax: 7 (8342) 3-21-98.
E-mail: radaevamed@mail.ru

Образец цитирования:

О.А. Радаева, А.С. Симбирцев, Ю.А. Костина,
Е.В. Негоднова, Д.Д. Бесшейнов, С.В. Машнина,
В.В. Еремеев «Динамики уровней цитокинов семейства
IL-6, адипонектина и лептина в постковидном
периоде у пациентов с метаболическим синдромом»
// Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 4. С. 505-514.

doi: 10.46235/1028-7221-1174-COT

© Радаева О.А. и соавт., 2022

For citation:

O.A. Radaeva, A.S. Simbirtsev, Kostina Yu.A.,
E.V. Negodnova, D.D. Besheyenov, S.V. Mashnina,
V.V. Ereemeev "Cytokines of the IL-6 family, adiponectin
and leptin levels in patients with metabolic syndrome during
the post-COVID period", Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4,
pp. 505-514.

doi: 10.46235/1028-7221-1174-COT

DOI: 10.46235/1028-7221-1174-COT

МС в течение 1 года после COVID-19. Проведенный однофакторный, а далее многофакторный корреляционный анализ содержания в сыворотке крови sIL-6r/IL-6, LIF/ sLIFr, адипонектина и лептина с уровнями вазоактивных веществ (NO, ADMA и SDMA), гликированным гемоглобином, ЛПНП определил: рост отношения sIL-6r/IL-6 выступает независимым фактором снижения NO ($r = 0,74$, $p < 0,01$); увеличение sLIFr положительно коррелирует с повышением гликированного гемоглобина ($r = 0,69$, $p < 0,01$) и независимая связь с ростом ADMA ($r = 0,82$, $p < 0,001$), лептин (в указанной модели) – независимый фактор увеличения ЛПНП ($r = 0,69$, $p < 0,05$).

Изучение влияния «предковидных» модифицируемых факторов, в частности вакцинации, в аспекте снижения вероятности прогрессирования ранее существующих хронических заболеваний (артериальной гипертензии, атеросклероза, сахарного диабета) у лиц с МС после перенесенного COVID-19 является актуальным и имеет перспективы внедрения в клиническую практику.

Ключевые слова: IL-6, sIL-6, LIF, sLIFr, адипонектин, лептин, метаболический синдром, постковид, COVID-19, вакцинация

CYTOKINES OF THE IL-6 FAMILY, ADIPONECTIN AND LEPTIN LEVELS IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME DURING THE POST-COVID PERIOD

Radaeva O.A.^a, Simbirtsev A.S.^{b,c}, Kostina Yu.A.^a, Negodnova E.V.^a, Besheynov D.D.^a, Mashnina S.V.^a, Ereemeev V.V.^a

^a N. Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

^b State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

^c First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. COVID-19 is a multisystem disease, but the extent of its consequences is currently poorly understood, especially in the persons with metabolic disorders. The aim of the present study was to evaluate the special changes in the cytokines of IL-6 family (IL-6 and sIL-6, LIF and sLIFr), adiponectin and leptin within 360 days after SARS-CoV-2 infection in the patients with metabolic syndrome (MetS), to discern features of immunopathogenesis depending on previous vaccination against COVID-19.

We have classified the patients in two groups: (1) patients with MetS who underwent COVID-19 6-12 months after full-course vaccination with a vector vaccine ($n = 32$); (2) patients with MetS who underwent COVID-19 without story of vaccination ($n = 29$). Control group included conditionally healthy individuals without MetS: (3) vaccinated, and (4) non-vaccinated, who also had COVID-19. The levels of IL-6 and sIL-6, LIF and sLIFr, leptin and adiponectin, NO, ADMA, SDMA were determined by ELISA technique.

In patients with MetS, changes in cytokine regulation towards proinflammatory reactions were revealed (an increase in blood IL-6 and leptin levels), which was most pronounced in MetS within first 30 days post-COVID, but with a number of changes which remained for 12 months (e.g., increased leptin concentration in blood). Vaccination against COVID-19 reduced the severity of pro-inflammatory changes in the sIL-6r/IL-6 and leptin/adiponectin systems towards protective adiponectin. However, the persistent increase in leptin was not canceled. When interpreting these results, no negative differences were revealed in the group of once vaccinated individuals with MetS, concerning the mentioned cytokine regulations of MetS over 1 year after COVID-19. The univariate, and then multifactorial correlation analysis between serum contents of sIL-6r/IL-6, LIF/ sLIFr, adiponectin and leptin and the levels of vasoactive substances (NO, ADMA and SDMA), glycated hemoglobin, LDL has shown that the increased ratio of sIL-6r/IL-6 is an independent factor for the NO reduction of ($r = 0.74$, $p < 0.01$); an increase in sLIFr positively correlates with increase in glycated hemoglobin ($r = 0.69$, $p < 0.01$), and an association with increase of ADMA ($r = 0.82$, $p < 0.001$), leptin (in this model) are shown to be an independent factor of LDL increase ($r = 0.69$, $p < 0.05$).

Influence of «pre-COVID» modifiable factors, in particular, vaccination, is relevant in terms of reducing the likelihood of progression of pre-existing chronic diseases (hypertension, atherosclerosis, diabetes mellitus) in the persons with MetS after COVID-19 and has prospects for implementation into clinical practice.

Keywords: IL-6, sIL-6, LIF, sLIFr, adiponectin, leptin, metabolic syndrome, post covid, COVID-19, vaccination

Введение

Проблема постковидного синдрома, «лонгко-вида» и ряда особенностей течения хронических заболеваний пациентов после перенесенного COVID-19 привлекают внимание исследователей во всем мире. Несмотря на то, что острые симптомы и стратегии ведения пациентов с COVID-19 хорошо документированы, миллионы людей во всем мире испытывают длительный и изнурительный спектр симптомов, который, как сообщается, длится месяцы и даже годы [7]. Опубликованы данные демонстрирующие, что вероятность развития дополнительных патологических состояний после SARS-CoV-2 инфицирования выше у лиц с избыточной массой тела/ожирением и с сахарным диабетом [9]. Важно отметить потенциальное патогенетическое значение изменения цитокиновой регуляции основных компонентов метаболического синдрома после SARS-CoV-2 инфицирования за счет цитокинового дисбаланса в острый период COVID-19. Так необходимо выделить значимость изучения у пациентов с метаболическим синдромом (МС) роли в постковидном периоде адипоцитокинов, к которым на сегодняшний день можно отнести как представителей семейства IL-6, так и классические: адипонектин и лептин.

COVID-19 является мультисистемным заболеванием, однако масштабы последствий SARS-CoV-2 инфицирования в настоящее время недостаточно изучены, особенно у лиц с метаболическими нарушениями. Ранние сообщения указывают на то, что для обеспечения эффективной и реабилитационной поддержки пациентов и восстановления качества жизни/функционального статуса данной категории пациентов необходимы междисциплинарные исследования, объединяющие фундаментальные (иммунопатогенетические) и клинические данные о постковидном периоде [1]. Необходимо изучить влияние «предковидных» модифицируемых факторов, в частности вакцинации, в аспекте снижения вероятности прогрессирования ранее существующих хронических заболеваний (артериальной гипертензии (АГ), атеросклероза, сахарного диабета (СД)) после перенесенного COVID-19.

Цель исследования – изучить особенности изменения уровней цитокинов семейства IL-6 (IL-6 и sIL-6, LIF и sLIFr), адипонектина и лептина в течение 360 дней после SARS-CoV-2 инфицирования у пациентов с МС для выделения иммунопатогенетических особенностей в зависимости от вакцинации для профилактики COVID-19 в анамнезе.

Материалы и методы

Для достижения поставленной цели были сформированы 2 группы пациентов из базы данных, включающих пациентов с МС для динамического анализа цитокиновых звеньев патогенеза (сформирована в феврале 2021 года, содержит информацию о 440 пациентов). 1-я группа: больные с МС, которые перенесли COVID-19 (КТ-1-2) через 6-12 месяцев после полной вакцинации векторной вакциной (32 человека); 2-я группа – пациенты с МС, которые перенесли COVID-19 (КТ-1-2) без вакцинации в анамнезе (29 человек). Критерии включения пациентов в исследование: 1965-1970 годы рождения, МС (АГ 2-я степень, 2-я стадия, ожирение 1-й степени, СД 2-го типа с преимущественной инсулинорезистентностью и относительной инсулиновой недостаточностью), гипотензивная терапия – иАПФ (с достижением «целевого АД»), прием препаратов из группы статинов и метформин с достижением «целевых» уровней ЛПНП и гликированного гемоглобина (HbA1c) менее 7%, подписание пациентом информированного согласия, диагноз COVID-19 выставлен в соответствии с актуальными клиническими рекомендациями по профилактике, диагностике и лечению COVID-19 с учетом данных ПЦР на наличие РНК SARS-CoV-2 и определения IgM/IgA и IgG к SARS-CoV-2 в динамике. Критерии исключения: ассоциированные клинические состояния (инфаркт миокарда, коронарная реваскуляризация, острое / транзиторное нарушение мозгового кровообращения и др.), СД 1-го типа, аллергические / аутоиммунные заболевания, психические заболевания. Группы сравнения (3-й и 4-й группы) составили пациенты сопоставимые по возрасту и полу без признаков МС, сердечно-сосудистых, эндокринных и иных аутоиммунных/аллергических заболеваний: 3 группа – вакцинированные лица которые перенесли COVID-19 (КТ-1-2) через 6-12 месяцев после полной вакцинации векторной вакциной (19 человека), 4-я группа – без вакцинации в анамнезе (15 человек).

В 1-й группе (МС и вакцинация) и 3-й группе (условно здоровые и вакцинация) до и через 21 после введения 2 компонента «Гам-Ковид-Вак», а также в всех группах через 10, 30, 180, 360 дней после клиничко-лабораторного выздоровления пациентов (два отрицательных результата ПЦР на наличие РНК SARS-CoV-2), проводился забор крови до 9:00 натощак. Сыворотку хранили при температуре -30°. Определение IL-6 и sIL-6, LIF и sLIFr, лептина и адипонектин, NO, ADMA, SDMA проводили методом ИФА на базе кафедры

иммунологии, микробиологии, вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии (лаборатория иммуноферментного анализа — лицензия № 13.01.04. 0001. Л.000005.06.11, бессрочная), с использованием иммуноферментного анализатора Personal Lab TM (Adaltis, Италия). Применяли Nycocard HbA1c тест-системы для определения HbA1c.

Проводился анализ результатов дополнительного диспансерного наблюдения пациентов для сопоставления лабораторных и клинических характеристик

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью Stat Soft Statistica 13.5. Данные представлены в виде медианы (Me) и персентилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Распределение данных отличалось от распределения Гаусса–Лапласа, что обосновало при сравнении зависимых выборок использовали критерий Вилкоксона, несвязанных выборок — критерий Манна–Уитни. Использовали построение регрессионной модели Кокса с применением однофакторного и многофакторного анализов.

Результаты и обсуждение

Анализ динамики содержания представителей семейства IL-6 в сыворотке крови больных с МС в период после COVID-19 определил в группе ранее вакцинированных (за 6 месяцев до SARS-CoV-2 инфицирования) рост ($p < 0,01$) уровня IL-6 к 10-му дню после клиничко-лабораторного выздоровления на 18% (95% ДИ [12–24]%) при сопоставлении с данными доинфекционного периода (перед и после введения векторной вакцины для профилактики COVID-19) и снижение к 30-му дню до уровней доинфекционного периода (без изменения количественных характеристик sIL-6r) (табл. 1). Схожая тенденция содержания в крови IL-6 у пациентов с МС без вакцинации к 10-му дню после выздоровления, но на фоне роста в сыворотке крови sIL-6r ($p < 0,001$) и с восстановлением уровня IL-6 до показателей доинфекционного периода к 180-му дню после выздоровления (табл. 2). В группе здоровых вакцинированных (табл. 3) в сыворотке крови зарегистрированы более низкие концентрации IL-6 и sIL-6r как до SARS-CoV-2 инфицирования ($p < 0,001$), так и в постковидном периоде при сравнении с больными с МС и вакцинацией в анамнезе ($p < 0,001$), но направление изменения содержания данных цитокинов в постковидном периоде совпадало с группой привитых пациентов с МС: рост IL-6 к 10-му дню ($p < 0,001$) со снижением к 30-му дню без динамики sIL-6.

В системе LIF и его растворимого рецептора sLIFr, относящихся к системе IL-6, также обнаружены значимые отличия между анализируемыми группами. У пациентов с МС, которые были вакцинированы, зарегистрирован рост LIF в сыворотке крови после COVID-19 в интервале от 10 до 180 дня после клиничко-лабораторного выздоровления, снижение к 1 году до уровней доинфекционного периода (табл. 1). Не вакцинированные пациенты с МС характеризуется идентичными количественными и качественными характеристиками изменения содержания LIF в крови, но с сохранением более высоких концентраций данного цитокина и через 1 год при сравнении с данными до SARS-CoV-2 инфицирования ($p < 0,05$) (табл. 2). Важно отметить, что в обеих группах больных с МС отмечается увеличением в постковидном периоде концентрации sLIFr, которое сохраняется в течение 12 месяцев после клиничко-лабораторного выздоровления. Лица группы сравнения (условно здоровые вакцинированные пациенты) в постковидном периоде: без динамики уровней LIF в сыворотке периферической крови и с кратковременным ростом sLIFr (восстановление количественных характеристик к доинфекционному уровню в период от 10 до 30 дней) (табл. 3).

Вне зависимости от вакцинации у пациентов с МС повышается уровень лептина после перенесенного COVID-19 с сохранением достоверных отличий через 12 месяцев при сопоставлении с данными до SARS-CoV-2 инфицирования ($p < 0,01$). У здоровых вакцинированных лиц увеличение уровня лептина в сыворотке крови регистрируются только через 10 дней после клиничко-лабораторного выздоровления.

Значимым отличием между вакцинированными и не вакцинированными пациентами с МС является отсутствие у лиц с МС и поствакцинальным иммунитетом снижения в постковидном периоде уровня адипонектина в крови (табл. 1). При МС без вакцинации определяется сохранение сниженного уровня адипонектина в сыворотке крови до 12 месяцев после клиничко-лабораторного выздоровления (табл. 2). При этом у здоровых привитых лиц регистрировался двукратный рост данного адипокина к 10-му дню после клиничко-лабораторного выздоровления ($p < 0,01$) при сопоставлении с данными до SARS-CoV-2 инфицирования и вакцинации (табл. 3).

Здоровые пациенты без вакцинации в период после COVID-19 характеризовались достоверными отличиями от группы привитых здоровых только характеристиками динамики адипонек-

тина: без увеличения данного цитокина к 10-му дню. Закономерности изменения других показателей были сопоставимы ($p > 0,05$).

При анализе кривых изменения содержания IL-6 и sIL-6r, LIF и sLIFr, а также адипонектина и лептина в сыворотке крови определено, что выявленные средние закономерности соответствуют индивидуальным данным 78,1% вакцинированных пациентов с МС (25 человек из 32, включенных в исследование), 82,8% не вакцинированных пациентов МС (24 человек из 29, включенных в исследование) и 73,7% из группы здоровых (14 человек из 19, включенных в исследование), а 22%, 17% и 16% соответственно характеризуются иными динамическими характеристиками, которые отличаются от средних данных.

Клинически, группа больных с МС и вакцинированных характеризовалась меньшим числом лиц: а) требующих изменения схем антигипертензивной терапии (9 человек из 32) при сравнении с группой без вакцинации (18 из 29 человек); б) с ростом ЛПНП при сохранении диеты и приемом препаратов из группы статинов в прежней дозе (7 из 32 пациентов и 14 из 29 соответственно); в) с ростом уровня HbA1c (10 из 32 больных и 19 из 29 соответственно). У 6 пациентов из группы с МС, но не вакцинированных, в первые 6 месяцев после клиничко-лабораторного выздоровления сформировался дополнительный компонент МС в виде артериальной гипертензии (ранее не регистрировалось), в группе вакцинированных – 2 пациента из 32 человек.

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С МС (ВАКЦИНИРОВАННЫЕ) ДО, ЧЕРЕЗ 10, 30, 180 И 360 ДНЕЙ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО COVID-19, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF CYTOKINE LEVELS IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH MS (VACCINATED) BEFORE, 10, 30, 180 AND 360 DAYS AFTER COVID-19, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	Пациенты с МС вакцинированные Patients with MS vaccinated (n = 32)					
	До COVID-19 Before COVID-19	После COVID-19 After COVID-19				
	До вакцины Before	21 день после вакцины 21 days after the vaccine	Через 10 дней 10 days after	Через 30 дней 30 days after	Через 180 дней 180 days after	Через 1 год 1 year after
	1	2	3	4	5	6
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	32,7 (26,4-35,4)	31,8 (22,9-34,3)	40,2 ^{**1,2} (33,3-45,2)	31,5 ^{**3} (29,7-36,9)	29,7 ^{**3} (22,4-32,7)	33,5 ^{**3} (24,6-38,1)
sIL-6r, пг/мл sIL-6r, pg/mL	2290 (1660-2420)	2570 (1380-2860)	2630 (2230-3110)	2620 (1710-3310)	2890 (1710-3440)	2270 (1930-2710)
LIF, пг/мл LIF, pg/mL	7,24 (2,45-12,60)	7,11 (3,26-11,90)	16,7 ^{***1,2} (12,5-19,3)	21,3 ^{***1,2,3} (18,1-26,5)	24,7 ^{***1,2} (16,2-27,1)	6,15 ^{***3,4,5} (2,17-11,7)
sLIFr, пг/мл sLIFr, pg/mL	2880 (1830-3450)	3920 ^{***1} (2950-4940)	6320 ^{***1} (4250-7600)	7410 ^{***1*3} (5300-8110)	7460 ^{***1*3} (6120-9400)	4120 ^{*1***3,4,5} (2769-4542)
Лептин, нг/мл Leptin, ng/mL	44,3 (32,1-49,6)	35,1 (29,6-41,2) ¹	89,5 ^{***1,2} (59,3-101,0)	64,8 ^{***1,2,3} (42,1-79,3)	67,5 ^{***1,2,3} (58,9-84,6)	55,7 ^{***1,2,3*4,5} (42,6-61,3)
Адипонектин, мкг/мл Adiponectin mcg/mL	8,33 (5,97-9,11)	7,98 (6,38-9,24)	8,23 (5,36-9,86)	8,68 (5,47-9,24)	8,23 (5,77-9,96)	8,2 (5,17-9,11)

Примечание. *** – уровень достоверности $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ (применяли критерий Вилкоксона для связанных совокупностей).

Note. ***, the significance level $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$ (used the Wilcoxon signed-rank test for related samples).

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С МС (НЕ ВАКЦИНИРОВАННЫЕ) ДО, ЧЕРЕЗ 10, 30, 180 И 360 ДНЕЙ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО COVID-19, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF CYTOKINE LEVELS IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH MS (UNVACCINATED) BEFORE, 10, 30, 180 AND 360 DAYS AFTER COVID-19, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	Пациенты с МС не вакцинированные Patients with MS unvaccinated (n = 29)				
	До COVID-19 Before COVID-19	После COVID-19 After COVID-19			
		Через 10 дней 10 days after	Через 30 дней 30 days after	Через 180 дней 180 days after	Через 1 год 1 year after
	1	2	3	4	5
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	33,9 (25,8-37,1)	46,7***1 (39,5-52,5)	44,7***1 (36,9-49,6)	30,1***2,3 (24,6-34,9)	31,9***2 (23,8-39,3)
sIL-6r, пг/мл sIL-6r, pg/mL	2250 (1410-2640)	3530***1 (2430-4210)	3710***1 (2910-4560)	3810***1 (2960-4270)	1920***2,3,4 (1760-2270)
LIF, пг/мл LIF, pg/mL	7,39 (2,54-11,30)	28,2***1 (19,3-33,9)	29,7***1 (21,1-34,3)	31,6***1,2 (27,3-36,7)	10,5*1***2,3,4 (5,21-14,90)
sLIFr, пг/мл sLIFr, pg/mL	2690 (1910-3350)	6110***1 (4360-7200)	7580***1*2 (5800-7900)	7630***1*2 (6340-8900)	4860***1,2,3,4 (3490-6840)
Лептин, нг/мл Leptin, ng/mL	44,8 (31,8-50,2)	91,3***1 (63,5-112,0)	88,3***1 (59,7-96,3)	71,1***1,2*3 (65,2-78,5)	59,3*1***2,3*4 (51,2-71,8)
Адипонектин, мкг/мл Adiponectin, mcg/mL	8,41 (4,63-9,37)	3,97***1 (3,15-4,63)	4,11***1 (3,27-5,13)	5,67***1,2**3 (5,12-6,64)	6,21*1***2,3*4 (5,42-8,44)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Проведенный однофакторный, а далее многофакторный корреляционный анализ содержания в сыворотке крови sIL-6r/IL-6, LIF/ sLIFr, адипонектина и лептина с уровнями вазоактивных веществ (NO, ADMA и SDMA), HbA1c, ЛПНП определил: рост отношения sIL-6r/IL-6 выступает независимым фактором снижения NO ($r = 0,74$, $p < 0,01$); увеличение sLIFr положительно коррелирует с повышением HbA1c ($r = 0,69$, $p < 0,01$), но независимая связь с ростом ADMA ($r = 0,82$, $p < 0,001$), лептин (в указанной модели) – независимый фактор увеличения ЛПНП ($r = 0,69$, $p < 0,05$).

Пациенты с МС входят в группу повышенного риска развития сердечно-сосудистых осложнений (ОНМК, ТНМК и ОКС) [3, 5], что, учитывая полученные в ходе представленного исследования данные об изменении цитокинового профиля у данной категории больных в период после COVID-19, может быть клинически реализовано в большем проценте случаев, чем до пандемии,

и требует понимания эффектов специфических мер профилактики не только в отношении снижения риска развития COVID-19, но особенностей постковидного периода. Зарегистрированные у пациентов с МС и вакцинацией (для профилактики SARS-CoV-2) в анамнезе особенности в виде более раннего снижения LIF и провоспалительного цитокина – IL-6 без увеличения содержания sIL-6r при сравнении с лицами без вакцинации выступает протективным фактором, так как вакцинация в данной модели нивелирует патогенетически значимую отрицательную корреляционную цепь между повышением sIL-6r/IL-6 и снижением вазодилатора NO, что вторично выступает компонентом противодействия прогрессированию эндотелиальной дисфункции и находит клиническое подтверждение в снижении процента пациентов в группе ранее привитых, которые нуждались в изменении антигипертензивной терапии из-за неэффективности в течение 1 года после COVID-19. Фиксируя выше

ТАБЛИЦА 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ ДО, ЧЕРЕЗ 10, 30, 180 И 360 ДНЕЙ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО COVID-19, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF CYTOKINE LEVELS IN THE BLOOD SERUM OF VACCINATED HEALTHY INDIVIDUALS BEFORE, 10, 30, 180 AND 360 DAYS AFTER COVID-19, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	Здоровые вакцинированные Vaccinated healthy individuals (n = 19)					
	До COVID-19 Before COVID-19		После COVID-19 After COVID-19			
	До вакцины Before	21 день после вакцины 21 days after the vaccine	Через 10 дней 10 days after	Через 30 дней 30 days after	Через 180 дней 180 days after	Через 1 год 1 year after
	1	2	3	4	5	6
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	2,91 (1,79-3,28)	3,24 (1,65-3,40)	6,98***1, 2 (4,32-8,82)	2,86***3 (1,68-3,32)	2,77***3 (1,93-3,14)	3,11***3 (2,34-3,45)
sIL-6r, пг/мл sIL-6r, pg/mL	712 (483-855)	760 (510-840)	754 (412-891)	710 (472-836)	677 (488-751)	693 (610-769)
LIF, пг/мл LIF, pg/mL	1,25 (0,93-2,12)	1,33 (1,05-2,27)	1,12 (0,98-1,72)	1,22 (0,74-1,93)	1,15 (0,82-1,27)	1,33 (1,12-1,45)
sLIFr, пг/мл sLIFr, pg/mL	3880 (3290-4340)	4120 (3340-4720)	2900*1, 2 (2510-3430)	3500 (3120-4250)	3460 (2980-4400)	3120 (2670-3400)
Лептин, нг/мл Leptin, ng/mL	5,93 (5,12-6,74)	4,87 (4,34-5,97) ¹	12,3***1, 2 (9,67-13,90)	3,12**1, 2***3 (2,74-3,41)	5,66***3, 4 (4,83-6,17)	5,18***3, 4 (4,57-5,93)
Адипонектин, мкг/мл Adiponectin mcg/mL	8,24 (7,13-9,25)	8,62 (6,93-9,17)	16,3***1, 2 (15,5-17,8)	7,13***3 (6,39-10,11)	8,64***3 (7,36-10,20)	9,51***3 (7,72-11,80)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

описанное позитивное изменение цитокиновых звеньев с потенциалом влияния на эндотелий сосудов на фоне введения вакцины у лиц с МС необходимо отметить, что, несмотря на вакцинацию в обеих группах МС в постковидном периоде длительно сохраняется повышение содержания в крови sLIFr, что ассоциировано с ростом ADMA (ADMA является мощным эндогенным ингибитором eNOS. Эта диметилированная аминокислота образуется в эндотелиальных клетках из L-аргинина и молекулярного кислорода, в реакции, катализируемой семейством ферментов метилирования белка аргинина. Помимо конкуренции с L-аргинином за eNOS, ADMA также способствует расщеплению eNOS с целью образования свободных радикалов через [8]). При сопоставлении клинических особенностей пост-

ковидного периода и изменения цитокиновых звеньев патогенеза МС выявлена значимая связь между увеличением sLIFr и уровнями HbA1c, что значимо не только в аспекте формирования/прогрессирования СД, но и как фактор изменения течения АГ или ее манифеста, что было зарегистрировано у 6 не привитых пациентов, относящихся к IV квартилю повышения sLIFr. По данным публикации 2022 года, более высокий базовый уровень HbA1c не был независимым фактором риска развития АГ, но временной период, ассоциированный с изменением (ростом) уровня HbA1c независимо связан с большим повышением артериального давления и ростом риска клинической инициации АГ [4], что актуально для представленных данных собственного исследования, которые были описаны выше.

Вакцинация пациентов с МС не выступила фактором, блокирующим повышение в крови уровня лептина в постковидном периоде с сохранением более высоких показателей у 78% через 12 месяцев, данная тенденция совпадала в обеих группах лиц с МС, но отсутствовала в группе здоровых вне зависимости от вакцинации. В аспекте иммунного ответа и поддержания хронического воспаления лептин является провоспалительным фактором и его повышение – проявление «лептиновой резистентности», отменяющее его положительные патогенетические эффекты и усиливающее метавоспалительные реакции [6]. При этом у больных с МС без вакцинации рост содержания лептина в сыворотке крови происходил на фоне снижения адипонектина, что усиливало дисбаланс отношения лептин/адипонектин и ассоциировано, по данным литературы, с вторичным повреждением эндотелия [2, 10], прогрессированием атеросклероза (по собственным данным адипонектин – независимый фактор роста ЛПНП в анализируемой модели), снижением толерантности к глюкозе и др.

Изменения цитокиновой регуляции в сторону провоспалительных реакций наиболее выражено у пациентов с МС в первые 30 дней постковидного периода, но необходимы дополнительные более длительные подходы для профилактики потенциальных осложнений у данной категории больных, учитывая сохранение особенностей уровней адипоцитокинов, в частности лептина, и в течение 12 месяцев наблюдения.

Заключение

Анализ цитокиновых звеньев иммунопатогенеза постковидного периода у пациентов с МС актуален. Дисбаланс жирового секретома в виде перепроизводства провоспалительных адипоцитокинов, что происходит после COVID-19 при МС, объясняют системную метаболическую дисфункцию и прогрессирование сердечно-сосудистых заболеваний. Вакцинация для профилактики COVID-19 не выступает фактором, нивелирующим все потенциально отрицательные цитокинопосредованные звенья в постковидном периоде у больных с МС, но снижает степень выраженности эффектов действия провоспалительного звена в системах sIL-6/IL-6 и лептин/адипонектин. В представленном исследовании не выявлено негативных отличия в группе однократно вакцинированных лиц с МС при сопоставлении с больными МС без вакцинации против COVID-19 в анамнезе в рамках анализируемых звеньев цитокиновой регуляции патогенетических звеньев МС в течение 1 года после COVID-19. Однако при интерпретации результатов этого исследования необходимо учитывать ограниченный размер выборки, но достаточный для обоснования дальнейших исследований, в том числе интегрируя принципы метаболики и протеомики в изучении цитокин-зависимых механизмов прогрессирования эндотелиальной дисфункции, индуцированной SARS-CoV-2 инфицированием (а возможно и при ряде других вирусных инфекциях) у больных с МС.

Список литературы / References

1. Ashton R., Ansdell P., Hume E., Maden-Wilkinson T., Ryan D., Tuttiett E., Faghy M. COVID-19 and the long-term cardio-respiratory and metabolic health complications. *Rev. Cardiovasc. Med.*, 2022, Vol. 23, no. 2, 53. doi: 10.31083/j.rcm2302053.
2. Kim J.E., Kim J.S., Jo M.J., Cho E., Ahn S.Y., Kwon Y.J., Ko G.J. The roles and associated mechanisms of adipokines in development of metabolic syndrome. *Molecules*, 2022, Vol. 27, no. 2, 334. doi: 10.3390/molecules27020334.
3. Li X., Zhai Y., Zhao J., He H., Li Y., Liu Y., Feng A., Li L., Huang T., Xu A., Lyu J. Impact of metabolic syndrome and its components on prognosis in patients with cardiovascular diseases: a meta-analysis. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2021, Vol. 8, 704145. doi: 10.3389/fcvm.2021.704145.
4. Liu L., Zhen D., Fu S., Sun W., Li H., Zhao N., Hou L., Tang X. Associations of the baseline level and change in glycosylated hemoglobin A1c with incident hypertension in non-diabetic individuals: a 3-year cohort study. *Diabetol. Metab. Syndr.*, 2022, Vol. 14, no. 1, 54. doi: 10.1186/s13098-022-00827-8.
5. McClung J.A., Levy L., Garcia V., Stec D.E., Peterson S.J., Abraham N.G. Heme-oxygenase and lipid mediators in obesity and associated cardiometabolic diseases: Therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.*, 2022, Vol. 231, 107975. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107975.
6. Muskiet FA.J., Carrera-Bastos P., Pruijboom L., Lucia A., Furman D. Obesity and leptin resistance in the regulation of the Type I interferon early response and the increased risk for severe COVID-19. *Nutrients*, 2022, Vol. 14, no. 7, 1388. doi: 10.3390/nu14071388.

7. Raveendran A.V., Misra A. Post COVID-19 syndrome ("Long COVID") and diabetes: challenges in diagnosis and management. *Diabetes Metab. Syndr.*, 2021, Vol. 15, no. 5, 102235. doi: 10.1016/j.dsx.2021.102235.
8. Roumeliotis S., Mallamaci F., Zoccali C. Endothelial dysfunction in chronic kidney disease, from biology to clinical outcomes: a 2020 update. *J. Clin. Med.*, 2020, Vol. 9, no. 8, 2359.
9. Sudre C.H., Murray B., Varsavsky T. Attributes and predictors of long COVID. *Nat. Med.*, 2021, Vol. 27, pp. 626-631.
10. Yang J., Liu D., Liu Z. Integration of metabolomics and proteomics in exploring the endothelial dysfunction mechanism induced by serum exosomes from diabetic retinopathy and diabetic nephropathy patients. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2022, Vol. 13, 830466. doi: 10.3389/fendo.2022.830466.

Авторы:

Радеева О.А. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, главный научный сотрудник ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Костина Ю.А. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Негоднова Е.В. — ассистент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Authors:

Radaeva O.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Immunology, Microbiology and Virology with course of Clinical Immunology and Allergology, N. Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Chief Research Associate, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Kostina Yu.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology with course of Clinical Immunology and Allergology, N. Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

Negodnova E.V., Assistant Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology with course of Clinical Immunology and Allergology, N. Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

Бесшейнов Д.Д. — аспирант кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Машнина С.В. — аспирант кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Еремеев В.В. — аспирант кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Besheyinov D.D., Postgraduate Student, Department of Immunology, Microbiology and Virology with course of Clinical Immunology and Allergology, N. Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

Mashnina S.V., Postgraduate Student, Department of Immunology, Microbiology and Virology with course of Clinical Immunology and Allergology, N. Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

Eremeev V.V., Postgraduate Student, Department of Immunology, Microbiology and Virology with course of Clinical Immunology and Allergology, N. Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

Поступила 12.07.2022
Принята к печати 19.07.2022

Received 12.07.2022
Accepted 19.07.2022

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ, НЕЙРОПЕПТИДОВ И МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

Ручкин М.П.^{1,2}, Маркелова Е.В.¹, Федяшев Г.А.^{1,2}, Ющук В.Н.¹

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

² ООО «Приморский центр микрохирургии глаза», г. Владивосток, Россия

Резюме. В настоящее время диабетическая ретинопатия (ДР) рассматривается не только со стороны сосудистых поражений, но и как нейродегенеративное заболевание. Нормальное функционирование глии и нейронов сетчатки зависит от баланса между системой цитокинов, нейротрофическими факторами и матриксными металлопротеиназами. Нарушения, возникающим в данных системах, отводят важную роль во многих нейродегенеративных процессах. Цель исследования – определить уровни IL-1 β , IL-17A, TNF α , IFN γ , IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, белка S100b, BDNF и NGF в сыворотке крови пациентов с сахарным диабетом 2 типа с признаками нейродегенерации сетчатки и выявить дополнительные иммунологические маркеры для диагностики и прогноза течения данного состояния. В исследование были включены 80 пациентов с верифицированным у эндокринолога диагнозом сахарный диабет 2 типа. Всем включенным в исследование проводилось обследование на оптическом когерентном томографе RTVue-100 (США), определяли объем фокальных потерь ганглиозных клеток сетчатки (FLV). По его результатам пациентов основной группы разделили на 2 подгруппы. В первую вошли 22 человека (подгруппа 1) у которых показатель FLV не имел достоверных различий с контрольной группой. Во вторую вошли 58 человек с достоверно большим объемом FLV (подгруппа 2). В подгруппе пациентов с высоким уровнем фокальных потерь ГКС выявлено достоверное увеличение уровня IL-1 β и дефицит IL-10 в сравнении с контрольной группой и подгруппой без значимых потерь ГКС на протяжении всего периода наблюдения. Выявлен дефицит TGF- β 3 у пациентов подгруппы 2 в сравнении с контролем и подгруппой 1. Определен дисбаланс в системе тканевого протеолиза, уровни MMP-9 и TIMP-2 были повышены, уровень MMP-7 был понижен у пациентов обеих подгрупп в сравнении с контролем. При анализе сывороточной концентрации нейроспецифических белков в группе пациентов с ОКТ-признаками нейродегенерации сетчатки выявлены высокие уровни белка S100b и NGF, в отличие от группы контроля и подгруппы 1.

Ключевые слова: нейродегенерация, цитокины, нейропептиды, матриксные металлопротеиназы, диабетическая ретинопатия

Адрес для переписки:

Ручкин Михаил Петрович
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
690088, Россия, г. Владивосток, ул. Борисенко, 100е.
Тел.: 8 (924) 137-04-78.
E-mail: michaelr-n@mail.ru

Address for correspondence:

Ruchkin Mikhail P.
Pacific State Medical University
690088, Russian Federation, Vladivostok, Borisenko str., 100e.
Phone: 7 (924) 137-04-78.
E-mail: michaelr-n@mail.ru

Образец цитирования:

М.П. Ручкин, Е.В. Маркелова, Г.А. Федяшев, В.Н. Ющук «Роль цитокинов, нейропептидов и матриксных металлопротеиназ в иммунопатогенезе нейродегенерации сетчатки при диабетической ретинопатии» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 515-520.
doi: 10.46235/1028-7221-1157-ROC

© Ручкин М.П. и соавт., 2022

For citation:

M.P. Ruchkin, E.V. Markelova, G.A. Fedyashev, V.N. Yushchuk “Role of cytokines, neuropeptides and matrix metalloproteinases in the immunopathogenesis of retinal neurodegeneration in diabetic retinopathy”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 515-520.
doi: 10.46235/1028-7221-1157-ROC

DOI: 10.46235/1028-7221-1157-ROC

ROLE OF CYTOKINES, NEUROPEPTIDS AND MATRIX METALLOPROTEINASES IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF RETINAL NEURODEGENERATION IN DIABETIC RETINOPATHY

Ruchkin M.P.^{a,b}, Markelova E.V.^a, Fedyashev G.A.^{a,b}, Yushchuk V.N.^a

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Primorsky Eye Microsurgery Center, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Currently, diabetic retinopathy (DR) is considered both a vascular lesion, as well as a neurodegenerative disease. The normal functioning of the glia and retinal neurons depends on the balance between the cytokine system, neurotrophic factors and matrix metalloproteinases. The disorders that occur in these systems are assigned an important role in many neurodegenerative processes. The purpose of the present study was to determine the levels of IL-1 β , IL-17A, TNF α , IFN γ , IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, S100b protein, BDNF and NGF in the serum of patients with type 2 diabetes mellitus with signs of retinal neurodegeneration, and to identify additional immunological markers for diagnosis and prediction of their clinical course. The study included 80 patients with endocrinologically verified diagnosis of type 2 diabetes. All subjects were examined at an optical coherent tomograph RTVue-100 (USA), and the volume of focal loss of retinal ganglion cells (FLV) was determined. According to its results, the patients of the main group were divided into 2 subgroups. The first group included 22 persons in whom the FLV indexes did not show significant differences from the controls. The second group included 58 patients with a significantly larger FLV volume. In the subgroup of patients with high level of focal GCS loss, a significant increase in the level of IL-1 β and IL-10 deficiency was revealed in comparison with the controls, and the subgroup without significant losses of GCS over the entire observation period. TGF- β 3 deficiency was found in patients of subgroup 2 versus controls and subgroup 1. An imbalance in the tissue proteolysis system was revealed, MMP-9 and TIMP-2 levels were elevated, and MMP-7 levels were decreased in both subgroups compared to controls. When analyzing serum contents of neurospecific proteins in the group of patients with OCT signs of retinal neurodegeneration, high levels of the S100b protein and NGF were revealed, in contrast to the control group and subgroup 1.

Keywords: neurodegeneration, cytokines, neuropeptides, matrix metalloproteinases, diabetic retinopathy

Введение

Постоянный рост заболеваемости сахарным диабетом (СД) во всем мире определяет необходимость изучения механизмов развития как самого сахарного диабета, так и его осложнений [6]. Сетчатая оболочка глазного яблока является одной из мишеней СД и ее поражение может приводить к тяжелой утрате зрительных функций. В настоящее время диабетическая ретинопатия (ДР) рассматривается не только со стороны сосудистых поражений, но и как нейродегенеративное заболевание. Нормальное функционирование глии и нейронов сетчатки зависит от баланса между системой цитокинов, нейротрофическими факторами и матриксными металлопротеиназами. Нарушения, возникающим в данных системах, отводят важную роль во многих нейродегенеративных процессах [3]. В своих прошлых исследованиях мы обнаружили корреляции между морфофункциональными признаками поражения нейронов сетчатки и лабораторными показателями, которые возникают у пациентов с СД 2 типа [2].

Цель исследования – определить уровни IL-1 β , IL-17A, IL-10, TNF α , IFN γ , TGF- β 1, TGF- β 2,

TGF- β 3, MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, белка S100b, BDNF и NGF в сыворотке крови пациентов с сахарным диабетом 2-го типа с признаками нейродегенерации сетчатки и выявить дополнительные иммунологические маркеры для диагностики и прогноза течения данного состояния.

Материалы и методы

В исследование были включены 80 пациентов с верифицированным у эндокринолога диагнозом сахарный диабет 2-го типа при офтальмологическом осмотре которых не было клинических признаков диабетической ретинопатии, а также пациенты с начальными признаками непролиферативной диабетической ретинопатии. В наших прошлых исследованиях мы не обнаружили достоверной разницы между данными группами в морфо-функциональных признаках нейродегенерации сетчатки [2]. Все пациенты основной группы принимали пероральные сахароснижающие препараты, средний «стаж» СД составил 7,5 лет, уровень гликированного гемоглобина в среднем равнялся 7,7%. Контрольную группу составили 30 практически здоровых доброволь-

цев сопоставимых по полу и возрасту с основной группой. Распределение по полу в основной группе: мужчин 42,5% (n = 34), женщин 57,5% (n = 46), средний возраст 60,8±6 лет. У всех лиц, участвующих в исследовании, получено информированное согласие. Проведение исследования одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» от 16.12.2019 протокол №4.

Всем включенным в исследование проводилось обследование на оптическом когерентном томографе RTVue-100 (США), определяли объем фокальных потерь ганглиозных клеток сетчатки (FLV). По его результатам пациентов основной группы разделили на 2 подгруппы. В первую вошли 22 человека у которых показатель FLV не имел достоверных различий с контрольной группой. Во вторую вошли 58 человек с достоверно большим объемом FLV. Так как данный показатель может служить диагностическим маркером нейродегенерации сетчатки, подгруппы 1 и 2 мы определили как пациентов без признаков нейродегенерации сетчатки и с ними соответственно.

Уровень IL-1 β , IL-17A, TNF α , IFN γ , IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, белка S100b, BDNF и NGF в сыворотке крови определяли с помощью специфических реактивов фирмы R&D Diagnostics Inc. (США) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа, согласно прилагаемых инструкций. Учет результатов производили с помощью иммуноферментного анализатора Multiscan (Финляндия). Количественную оценку измеряемых параметров выражали в пг/мл или нг/мл.

Клинико-инструментальное и лабораторное обследование пациентов основной группы проводилось при первичном обращении, а также через 6 и 12 месяцев.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи программы SPSS Statistics 23 (IBM, США). Показатели представлены в виде медиан (Me), нижнего и верхнего квартилей (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Сравнение количественных величин в несвязанных выборках осуществлялось с использованием U-критерия Манна-Уитни, в связанных выборках использовали T-критерий Вилкоксона, для корреляционного анализа применяли ранговый коэффициент Спирмена. Различия считались достоверными при p \leq 0,05. Чувствительность и специфичность изменений исследуемых показателей оценивались методом линейной регрессии с построением ROC-кривых.

Результаты и обсуждение

При оценке данных ОКТ в динамике, в подгруппе 1 отсутствовало достоверное изменение FLV. При первичном осмотре он составил 0,26

(0,16-0,62) %, через 6 месяцев – 0,25 (0,15-0,62) %, через 12 месяцев – 0,26 (0,15-0,6) %. В подгруппе 2, наоборот, зарегистрировано достоверное (p = 0,0001) увеличение данного показателя, которое составило при первичном осмотре 2,49 (1,56-3,52) %, через 6 месяцев – 2,54 (1,59-3,56) %, через 12 месяцев – 2,59 (1,66-3,59) %. Таким образом нейродегенеративные изменения имели тенденцию к прогрессированию у лиц с изначально большим объемом фокальных потерь ганглиозных клеток. При этом отсутствовала взаимосвязь со стажем диабета, клиническими признаками ДР, уровнем гликированного гемоглобина.

В таблице 1 представлены результаты лабораторного анализа сыворотки крови у пациентов 1 и 2 подгруппы.

Отсутствовала достоверная разница между группами в уровнях IL-17A, IFN γ , TGF- β 1, MMP-2, TIMP-1, как при первичном осмотре, так и в динамике. TNF α и TGF- β 2 были повышены у пациентов основной группы в сравнении с контролем, однако отсутствовала разница между подгруппами 1 и 2.

В подгруппе пациентов с высоким уровнем фокальных потерь ГКС выявлено достоверное увеличение уровня IL-1 β и дефицит IL-10 в сравнении с контрольной группой и подгруппой без значимых потерь ГКС на протяжении всего периода наблюдения. Данный факт говорит о дисбалансе между про- и противовоспалительными цитокинами. Во многих исследованиях, изучающих роль воспаления в патогенезе ДР, выявлен высокий уровень IL-1 β и дефицит IL-10 в сыворотке крови, влаги передней камеры и стекловидном теле [3]. Существует предположение, что глиальные клетки сетчатки являются основным источником высокого уровня IL-1 β , что может потенцировать гибель ГКС [7]. При помощи построения ROC кривых, мы оценили диагностический потенциал определения уровня данных цитокинов в сыворотке крови для прогнозирования развития нейродегенерации сетчатки у пациентов с СД. Уровень IL-1 β показал хорошую прогностическую ценность (AUC = 0,89) (рис. 1), в то время как ROC-кривая уровня IL-10 не показала значимости этого цитокина в прогнозе развития данного состояния (AUC = 0,45).

Выявлен дефицит TGF- β 3 у пациентов подгруппы 2 в сравнении с контролем и подгруппой 1. В недавнем экспериментальном исследовании на культуре ГКС было показано, что TGF- β 3 повышает выживаемость ГКС в условиях гипергликемии [5]. Однако ROC-анализ не показал достоверного влияния сывороточного уровня данного цитокина на проявления нейродегенерации (AUC = 0,33), этот факт требует дальнейшего изучения.

Определен дисбаланс в системе тканевого протеолиза, уровни MMP-9 и TIMP-2 были повышены, уровень MMP-7 был понижен в обеих

ТАБЛИЦА 1. СЫВОРОТОЧНЫЕ УРОВНИ ИССЛЕДУЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ПАЦИЕНТОВ ПОДГРУППЫ 1, 2 И В ГРУППЕ КОНТРОЛЯ

TABLE 1. SERUM LEVELS OF STUDIED PARAMETERS IN CONTROL GROUP, SUBGROUP 1 AND SUBGROUP 2

№ No.	Показатель Index	Контроль Control	Подгруппа 1 Subgroup 1			Подгруппа 2 Subgroup 2		
			Базовый Base	6 месяцев 6 months	12 месяцев 12 months	Базовый Base	6 месяцев 6 months	12 месяцев 12 months
1	IL-1 β , пг/мл IL-1 β , pg/mL	1,61 (1,37- 2,18)	1,42 (1,23- 1,75)	1,46 (1,21- 1,75)	1,42 (1,22- 1,74)	3,46 (2,20- 4,89) ^{a, b}	3,35 (2,31- 4,83) ^{a, b}	3,42 (2,19- 4,92) ^{a, b}
2	IL-17A, пг/мл IL-17A, pg/mL	5,32 (5,05- 5,89)	5,42 (5,01- 6,23)	5,34 (4,97- 5,90)	5,38 (5,05- 5,92)	5,39 (5,18- 6,25)	5,36 (5,12- 6,01)	5,42 (5,19- 6,06)
3	IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	16,28 (12,68- 21,95)	14,98 (12,55- 19,36)	15,25 (12,63- 20,01)	16,07 (12,70- 21,39)	13,64 (11,34- 17,87) ^{a, b}	13,46 (11,31- 17,86) ^{a, b}	14,01 (11,56- 18,18) ^{a, b}
4	TNF α , пг/мл TNF α , pg/mL	2,48 (1,37- 3,47)	3,84 (3,34- 4,97) ^a	4,02 (3,30- 5,12) ^a	3,95 (3,29- 5,09) ^a	3,65 (3,21- 5,48) ^a	3,85 (3,32- 5,01) ^a	3,88 (3,34- 5,19) ^a
5	IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/mL	14,0 (10,91- 15,55)	15,03 (10,42- 17,25)	14,86 (10,39- 16,54)	14,19 (10,72- 16,98)	13,72 (10,43- 20,53)	14,37 (10,35- 15,78)	13,88 (10,56- 17,80)
6	TGF- β 1, нг/мл TGF- β 1, ng/mL	36,81 (34,30- 43,01)	35,2 (28,38- 38,50)	34,5 (28,57- 40,81)	36,17 (30,19- 40,55)	36,19 (30,93- 43,22)	36,44 (29,97- 42,21)	36,66 (31,20- 42,36)
7	TGF- β 2, пг/мл TGF- β 2, pg/mL	116,9 (103,87- 150,41)	142,86 (127,06- 185,34) ^a	142,63 (124,96- 181,31) ^a	138,28 (122,34- 184,67) ^a	142,75 (122,59- 183,70) ^a	144,02 (123,23- 182,97) ^a	140,88 (124,67- 181,03) ^a
8	TGF- β 3, пг/мл TGF- β 3, pg/mL	119,49 (66,09- 196,64)	132,24 (59,14- 191,00)	123,33 (63,23- 190,80)	126,87 (70,02- 195,43)	69,8 (37,54- 118,50) ^{a, b}	75,89 (38,23- 122,60) ^{a, b}	77,98 (35,09- 119,45) ^{a, b}
9	MMP-2, нг/мл MMP-2, ng/mL	207,65 (155,78- 251,12)	196,51 (152,20- 235,19)	200,18 (154,50- 241,13)	211,13 (161,30- 239,56)	192,32 (158,66- 244,85)	199,59 (156,33- 248,24)	193,32 (155,76- 250,47)
10	MMP-7, нг/мл MMP-7, ng/mL	2,17 (1,45- 2,85)	1,66 (0,9- 2,7) ^a	1,64 (0,88- 2,63) ^a	1,58 (0,91- 2,61) ^a	1,45 (0,75- 2,38) ^a	1,49 (0,78- 2,40) ^a	1,5 (0,77- 2,38) ^a
11	MMP-9, нг/мл MMP-9, ng/mL	317,04 (269,89- 363,58)	354,79 (314,45- 427,30) ^a	361,22 (309,11- 441,61) ^a	356,25 (312,30- 427,45) ^a	338,6 (310,50- 409,23) ^a	348,99 (315,96- 433,18) ^a	347,83 (312,41- 431,50) ^a
12	TIMP-1, нг/мл TIMP-1, ng/mL	191,04 (177,74- 201,97)	189,75 (164,03- 217,27)	188,34 (168,28- 208,44)	189,19 (169,13- 214,33)	197,25 (169,46- 226,60)	192,11 (170,15- 208,45)	193,92 (172,28- 213,44)
13	TIMP-2, нг/мл TIMP-2, ng/mL	92,18 (86,92- 97,73)	104,61 (95,52- 115,86) ^a	105,34 (99,24- 111,35) ^a	103,38 (96,25- 109,67) ^a	117,14 (109,30- 128,91) ^{a, b}	121,43 (109,34- 132,19) ^{a, b}	119,7 (105,66- 133,43) ^{a, b}
14	белок S100b, пг/мл protein S100b, pg/mL	45,19 (37,27- 51,79)	44,84 (37,52- 53,05)	45,31 (37,19- 52,14)	46,11 (36,67- 55,32)	53,44 (43,82- 75,82) ^{a, b}	56,83 (45,43- 75,80) ^{a, b}	58,11 (43,26- 77,37) ^{a, b}
15	BDNF, нг/мл BDNF, ng/mL	30,19 (27,38- 32,14)	28,99 (27,18- 31,82)	32,13 (27,11- 33,23)	29,59 (27,12- 32,72)	26,35 (24,51- 29,22) ^{a, b}	26,57 (24,31- 29,19) ^{a, b}	27,33 (25,29- 30,22) ^{a, b}
16	NGF, пг/мл NGF, pg/mL	5,96 (4,77- 8,13)	5,63 (4,82- 7,58)	5,66 (4,78- 7,73)	5,63 (4,76- 7,19)	7,26 (5,44- 8,17) ^{a, b}	7,32 (5,48- 8,02) ^{a, b}	7,35 (5,38- 8,25) ^{a, b}

Примечание. ^a – достоверная ($p < 0,05$) разница в сравнении с контрольной группой; ^b – достоверная ($p < 0,05$) разница между подгруппой 1 и 2.

Note. ^a, significant ($p < 0.05$) difference compared to the control group; ^b, significant ($p < 0.05$) difference between subgroup 1 and 2.

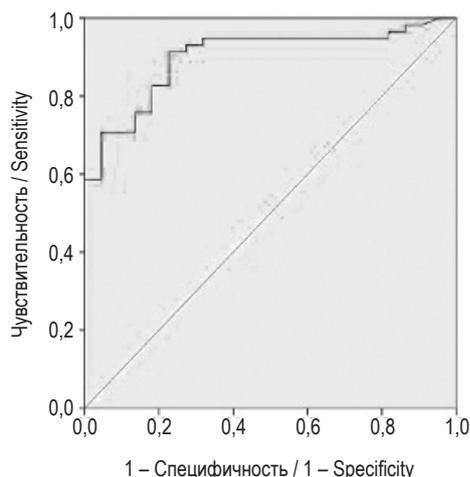


Рисунок 1. ROC-кривая IL-1 β у пациентов с нейродегенерацией сетчатки

Figure 1. ROC-curve of IL-1 β in patients with neurodegeneration of retina

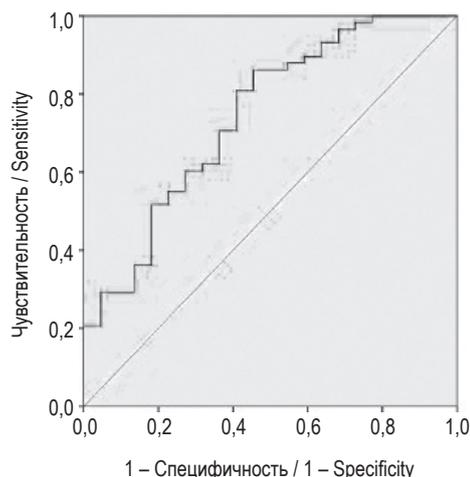


Рисунок 2. ROC-кривая TIMP-2 у пациентов с нейродегенерацией сетчатки

Figure 2. ROC-curve of TIMP-2 in patients with neurodegeneration of retina

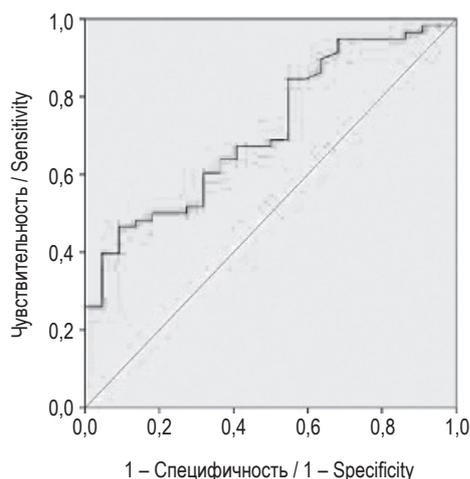


Рисунок 3. ROC-кривая S100b у пациентов с нейродегенерацией сетчатки

Figure 3. ROC-curve of S100b in patients with neurodegeneration of retina

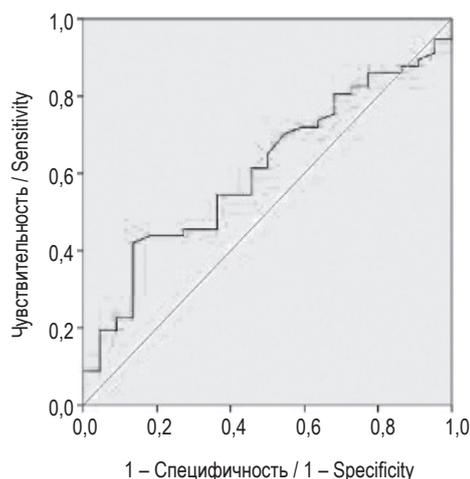


Рисунок 4. ROC-кривая NGF у пациентов с нейродегенерацией сетчатки

Figure 4. ROC-curve of NGF in patients with neurodegeneration of retina

подгруппах в сравнении с контролем. Многие исследования показывают важную роль матричных металлопротеиназ в развитии дегенеративных процессов нервной ткани [4]. Достоверная разница между пациентами подгруппы 1 и 2 наблюдалась по сывороточной концентрации TIMP-2. ROC-анализ подтвердил ($AUC = 0,74$) роль данного ингибитора в индукции нейродегенерации сетчатки при ДР (рис. 2).

При анализе сывороточной концентрации нейроспецифических белков в группе пациентов с ОКТ-признаками нейродегенерации сетчатки выявлены высокие уровни белка S100b и NGF и дефицит BDNF в отличие от группы контроля и подгруппы 1. Белок S100b является одним из мар-

керов повреждения нервной ткани и его высокие уровни стимулируют нейродегенерацию [1]. NGF является одним из наиболее изученных нейротрофических факторов, его физиологические эффекты направлены на повышение выживаемости нейронов [8]. Его повышение возможно является компенсаторной реакцией в ответ на повреждение нервных структур (в т.ч. сетчатки), которое вызвано нарушением гомеостаза при СД. ROC кривые показали удовлетворительную прогностическую значимость как для белка S100b ($AUC = 0,71$) (рис. 3), так и для NGF ($AUC = 0,6$) (рис. 4). Для BDNF ROC-анализ не подтвердил диагностической значимости ($AUC = 0,38$).

Выводы

Механизмы нейродегенерации сетчатки, вызванные сахарным диабетом малоизучены и требуют не только клинических, но и фундаментальных исследований. Настоящее исследование показало роль нейровоспаления в развитии дан-

ного состояния, что может быть основой для разработки новых диагностических и лечебных мероприятий. Требуется дальнейшее изучение взаимного влияния цитокинов, нейропептидов и матриксных металлопротеиназ на нейродегенеративные процессы в нервной ткани при различных социально значимых заболеваниях.

Список литературы / References

1. Маркелова Е.В., Зенина А.А., Кадыров Р.В. Нейропептиды как маркеры повреждения головного мозга // Современные проблемы науки и образования, 2018. № 5. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28099>. [Markelova E.V., Zenina A.A., Kadyrov R.V. Neuropeptides as markers of brain damage. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2018, no. 5. [Electronic resource]. Access mode: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28099>. (In Russ.)]
2. Ручкин М.П., Еремеева Л.В., Маркелова Е.В., Федяшев Г.А. Роль дисбаланса системы матриксных металлопротеиназ в индукции нейродегенерации сетчатки при диабетической ретинопатии // Современные проблемы науки и образования, 2022. № 1. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/article/view?id=31427>. [Ruchkin M.P., Eremeeva L.V., Markelova E.V., Fedyashev G.A. The role of imbalance in matrix metalloproteinases system in induction of neurodegeneration of retina in diabetic retinopathy, *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2022, no. 1. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/article/view?id=31427>. (In Russ.)]
3. Barber A.J., Lieth E., Khin S.A., Antonetti D.A., Buchanan A.G., Gardner T.W. Neuronal apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J. Clin. Invest.*, 1998, Vol. 102, no. 4, pp. 783-791.
4. Behl T., Kaur G., Sehgal A., Bhardwaj S., Singh S., Buhas C., Judea-Pusta C., Uivarosan D., Munteanu M.A., Bungau S. Multifaceted role of matrix metalloproteinases in neurodegenerative diseases: pathophysiological and therapeutic perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 3, pp. 1413-1423.
5. Chen H., Ho Y., Chou H., Liao E., Tsai Y., Wei Y., Lin L., Lin M., Wang Y., Ko M., Chan H. The role of transforming growth factor-beta in retinal ganglion cells with hyperglycemia and oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 18, 6482. doi: 10.3390/ijms21186482.
6. Khan A., Hashim M., King J., Govender R., Mustafa H., Al Kaabi J. Epidemiology of type 2 diabetes – global burden of disease and forecasted trends. *J. Epidemiol. Glob. Health*, 2020, Vol. 10, no. 1, pp. 107-111.
7. Mendiola A., Cardona A. The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases. *J. Neural Transm. (Vienna)*, 2018, Vol. 125, no. 5, pp. 781-795.
8. Padmakumar S., Taha M., Kadakia E. Delivery of neurotrophic factors in treatment of age-related chronic neurodegenerative diseases. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2020, Vol. 17, no. 3, pp. 323-340.

Авторы:

Ручкин М.П. — заочный аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач-офтальмолог ООО «Приморский центр микрохирургии глаза», г. Владивосток, Россия

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

Федяшев Г.А. — д.м.н., профессор кафедры офтальмологии и оториноларингологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; главный врач ООО «Приморский центр микрохирургии глаза», г. Владивосток, Россия

Ющук В.Н. — ассистент кафедры общественного здоровья и организации здравоохранения ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Authors:

Ruchkin M.P., Postgraduate Student, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University; Ophthalmologist, Primorsky Eye Microsurgery Center, Vladivostok, Russian Federation

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

Fedyashev G.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, Pacific State Medical University; Chief Physician, Primorsky Eye Microsurgery Center, Vladivostok, Russian Federation

Yushchuk V.N., Assistant Professor, Department of Public Health and Healthcare Organization, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

ИЗМЕНЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА МОНОНУКЛЕАРОВ КАПИЛЛЯРНОЙ И ВЕНОЗНОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЛЕЧЕНИЯ

Сенникова С.В.¹, Топтыгина А.П.^{1,2}

¹ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Резюме. Традиционно для лечения псориаза используют топические глюкокортикоиды, однако такое лечение дает непродолжительный эффект и чревато различными осложнениями при длительном применении. Детальное изучение иммунопатогенеза псориаза позволило использовать биоинженерные препараты, блокирующие основные цитокины. Показано, что IL-36 играет важную регуляторную роль в патогенезе псориаза. Цель исследования – изучить влияние терапии больных псориазом топическим глюкокортикоидным гормоном или рецепторным антагонистом IL-36 (RAIL-36) на клиническое течение псориаза и субпопуляционный состав мононуклеаров венозной и капиллярной крови, взятой вблизи очага воспаления. 16 больных псориазом (группа 1а) получали 0,1% крем мометазона на протяжении 14 дней, 20 пациентов группы 1б получали гель, содержащий 0,4% рекомбинантного RAIL-36 на протяжении 14 дней. 20 здоровых взрослых составили контрольную группу. Эффективность лечения оценивали по индексам PASI, ДИШС и DLQI. 19 субпопуляций лимфоцитов и 3 субпопуляции моноцитов оценивали с помощью четырехцветного окрашивания цельной капиллярной и венозной крови с лизированием эритроцитов, используя технологии и реактивы BD Biosciences (США). Показано, что оба препарата приводили к снижению выраженности симптомов заболевания на момент окончания лечения, но спустя 2 недели после окончания лечения в группе 1а уровни индексов практически возвращались к исходному, а в группе 1б сниженные уровни индексов сохранялись и спустя 2 недели. Выявлены значимые отклонения (больше в капиллярной крови) в уровнях нескольких субпопуляций у больных псориазом по сравнению со здоровыми. В результате лечения выявлены общие для двух групп изменения в уровнях субпопуляций и характерные различия для двух вариантов лечения, более выраженные в капиллярной крови. Оба использованных препарата пригодны для лечения псориаза.

Ключевые слова: псориаз, субпопуляции лимфоцитов, моноциты, капиллярная кровь, гормональная терапия, иммуномодулирующая терапия

Адрес для переписки:

Топтыгина Анна Павловна
ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.
Тел.: 8 (495) 452-18-01.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Address for correspondence:

Toptygina Anna P.
G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology
125212, Russian Federation, Moscow,
Admiral Makarov str., 10.
Phone: 7 (495) 452-18-01.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Образец цитирования:

С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина «Изменение субпопуляционного состава мононуклеаров капиллярной и венозной крови больных псориазом в зависимости от лечения» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 521-528.
doi: 10.46235/1028-7221-1159-CIM

© Сенникова С.В., Топтыгина А.П., 2022

For citation:

S.V. Sennikova, A.P. Toptygina “Changes in mononuclear cell subsets in capillary and venous blood of patients with psoriasis depending on the treatment”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 521-528.
doi: 10.46235/1028-7221-1159-CIM

DOI: 10.46235/1028-7221-1159-CIM

CHANGES IN MONONUCLEAR CELL SUBSETS IN CAPILLARY AND VENOUS BLOOD OF PATIENTS WITH PSORIASIS DEPENDING ON THE TREATMENT

Sennikova S.V.^a, Toptygina A.P.^{a, b}

^a G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Topical glucocorticoids are conventionally used to treat psoriasis, but such treatment provides a short-term effect, and may cause various complications during long-term usage. A detailed study of the immunopathogenesis of psoriasis has made it possible to use bioengineered drugs that block the main cytokines. It has been shown that IL-36 plays an important regulatory role in pathogenesis of psoriasis. The aim of the study was to study therapeutic effect of patients with psoriasis using topical glucocorticoid hormone *versus* IL-36 receptor antagonist (RAIL-36), with respect to clinical course of psoriasis and the subsets of mononuclear cells in venous and capillary blood taken close to the focus of inflammation. 16 patients with psoriasis (group 1a) received 0.1% mometasone cream for 14 days; 20 patients of group 1b received a gel containing 0.4% recombinant RAIL-36 for 14 days. Control group included 20 healthy adults. Treatment efficacy was assessed by PASI, DISHS and DLQI indices. 19 lymphocyte subsets and 3 monocyte subsets were assessed by four-color staining of whole capillary and venous blood with erythrocyte lysis using BD Biosciences (USA) technologies and reagents. It was shown that both drugs led to a decrease in the severity of the disease at the end of treatment. However, 2 weeks after the end of treatment in group 1a, the disease indexes nearly returned to the initial values. Meanwhile, the reduced index levels persisted 2 weeks later in group 1b. Significant deviations (more pronounced in capillary blood) were revealed for the levels of several leukocyte subsets in the psoriasis patients compared with healthy persons. As a result of treatment, we have revealed some changes in the levels of leukocyte subsets common to the two groups, and special differences for the two treatment options, that were more pronounced in capillary blood samples. Both medical preparations used are suitable for treatment of psoriasis.

Keywords: psoriasis, lymphocyte subsets, monocytes, capillary blood, hormone therapy, immunomodulating therapy

Введение

Лечение псориаза базируется на представлении о том, что это хроническое аутоиммунное, преимущественно Т-клеточное мультифакториальное заболевание [5]. Традиционно для лечения используют топические глюкокортикоидные гормоны, которые, несомненно, оказывают противовоспалительное действие [11], однако при отмене терапии процесс вспыхивает снова, а длительная терапия топическими кортикостероидами оказывает также и негативные воздействия, такие как атрофия кожи, гипертрихоз, телеангиэктазии, стероидные акне. Кроме того, всасываясь через воспаленную кожу, гормоны могут оказывать нежелательное системное воздействие [2]. Детальное изучение иммунопатогенеза псориаза показало, что активное участие в поддержании хронического воспаления играют субпопуляции хелперов Th1, Th17 и Th22 [8]. Это дало основание для использования биоинженерных препаратов, блокирующих основные цитокины, такие как интерферон (IFN γ), интер-

лейкины (IL-17, IL-12 и IL-23) для лечения псориаза, однако эти препараты вводятся системно и оказывают воздействие на иммунитет человека в целом, тогда как эти цитокины играют важную роль в защите организма от внутриклеточных патогенов [7]. Относительно недавно было показано, что IL-36 играет важную регуляторную роль в патогенезе псориаза [6]. У больных псориазом резко повышается уровень IL-36 γ , который поддерживает формирование петли положительной обратной связи, удерживающей воспаление в псориазическом очаге, и стимулирует ось IL-17/IL-23/IL-22, которая признана ответственной за воспаление кожи при псориазе [9]. Для регуляции активности IL-36 в организме вырабатывается рецепторный антагонист этого цитокина (RAIL-36), который блокирует соответствующий рецептор и препятствует излишнему сигналингу, провоцируемому повышенным уровнем IL-36 при псориазе [10]. Показано, что антитела против мышиного и человеческого ре-

цептора для IL-36, а также RAIL-36 приводят к снижению воспалительного ответа [4, 12].

Цель исследования — изучить влияние терапии больных псориазом топическим глюкокортикоидным гормоном или RAIL-36 на клиническое течение псориаза и субпопуляционный состав мононуклеаров венозной и капиллярной крови, взятой вблизи очага воспаления.

Материалы и методы

Группу обследованных составили 36 пациентов (25 мужчин и 11 женщин). Критерий включения в исследование: клинически подтвержденный псориаз, прогрессирующая стадия, легкой и средней степени тяжести, возраст 18-70 лет. Средний возраст составил 44,2 года. Для оценки тяжести и эффективности терапии использовали индекс PASI (Psoriasis Area and Severity Index), тяжесть кожной симптоматики рассматривали с помощью определения дерматологического индекса шкалы симптомов (ДИШС), пациенты заполняли опросник для оценки влияния заболевания на качество жизни DLQI (Dermatology Life Quality Index). В контрольную группу вошли 20 практически здоровых взрослых, сопоставимых по полу и возрасту. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН МНИ-ИЭМ им Г.Н. Габричевского (протокол № 52), обследованные подписывали информированное согласие. Группа пациентов была разделена на две подгруппы. Пациенты группы 1а (16 человек) получали терапию: 0,1% крем мометазона на протяжении 14 дней, локально на очаги поражения 1 раз в сутки, пациенты группы 1б (20 человек) были резистентны к предшествующей терапии топическими глюкокортикоидными препаратами и получали терапию: гель, содержащий 0,4% рекомбинантного RAIL-36 (производство ФГУП ГНИИ ОЧБ ФМБА) [1] на протяжении 14 дней, локально на очаги поражения 1 раз в сутки.

Взятие капиллярной крови осуществляли из пальца кисти у здоровых однократно, а у больных псориазом вблизи очага с клиническими проявлениями до лечения, на 14-й и 28-й день в объеме 200 мкл в микровету (Microvette 200 K3 EDTA). Кровь из локтевой вены отбирали в те же сроки в вакуумную пробирку с ЭДТА в объеме 3 мл. Иммунофенотипирование осуществляли с помощью четырехцветного окрашивания цельной капиллярной и венозной крови с лизированием эритроцитов, используя технологии и реактивы BD Biosciences (США) — проточный цитометр BD FACSantoII, программа сбора и обработки информации FACSDiva. Использовали следующие маркеры: CD16-FITC, CD14-PE, CD45PerCP, CD3-FITC, CD16/56-PE, CD4-PerCP, CD8-APC,

CD45RA-FITC, CD45R0-PE, CD161-APC, CD25-FITC, CD127-PE, CD249-APC, CXCR5-APC, CD27-FITC, CD1d-PE, CD5-PerCP, CD19-APC.

Полученные результаты подвергли статистическим методам обработки. Для исследуемых параметров была подтверждена гипотеза о нормальности распределения признаков методом Колмогорова—Смирнова. Вычисляли среднюю арифметическую и ее стандартную ошибку ($M \pm SE$), различия между группами оценивали с помощью параметрического *t*-критерия. Уровень $p < 0,05$ считали значимым.

Результаты и обсуждение

Были исследованы 19 субпопуляций лимфоцитов и 3 субпопуляции моноцитов у всех обследованных лиц (табл. 1). Исходно у больных псориазом были значимо ($p < 0,05$) повышены некоторые субпопуляции. Так, дважды положительных лимфоцитов (CD45RA⁺/CD45R0⁺) было — 3,26% против 0,56% у здоровых в капилляре и 2,64% у больных против 0,42% у здоровых в вене. Активированные хелперы (CD25⁺CD127⁺CD4⁺) от всех хелперов у больных в капилляре — 11,72% против 7,93% у здоровых и 10,92% у больных против 7,34% у здоровых в вене. Т-регуляторные клетки — Treg (CD25⁺CD127⁻CD4⁺) у больных повышены в капилляре до 8,46% против 5,91%, а в вене — 7,88% против 6,78% у здоровых. Т-фолликулярные хелперы — Tfh (CD4⁺CXCR5⁺) оказались повышены до 16,15% у больных против 14,91% у здоровых в капилляре, а в вене 16,57% и 13,94%, соответственно. В-клетки (CD19⁺) были повышены в капилляре у больных до 13,62% против 9,73% у здоровых, а в вене — 13,06% против 8,88% у здоровых. В1-клетки (CD5⁺CD19⁺) от всех В-клеток у больных составили 20,73%, а у здоровых — 13,33% в капилляре и 17,36% и 11,86% в венозной крови, соответственно. В-регуляторные клетки — Breg (CD1d⁺CD5⁺CD19⁺) также были значимо повышены в крови больных: 9,53% против 6,29% в капилляре и 8,15% против 4,39% в вене. NKT-клетки (CD3⁺CD16/56⁺) у больных были повышены в капиллярной крови до 2,95% против 1,13% и в венозной крови до 2,34% против 0,87% у здоровых. Среди моноцитов у больных псориазом были значимо ($p < 0,05$) повышена субпопуляция неклассических моноцитов (CD14^{lo}CD16^{hi}) до 7,4% у больных в капилляре против 4,88% у здоровых и в вене до 7,71% против 5,58% у здоровых. При этом оказалась значимо снижена ($p < 0,05$) субпопуляция промежуточных моноцитов (CD14⁺CD16^{int}) в капиллярной крови 6,64% против 8,95% у здоровых, и в венозной крови 7,22% против 8,95% у здоровых. Следует также отметить, что уровень большинства исследован-

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОНУКЛЕАРОВ ВЕНОЗНОЙ И КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ (M±SE, %)

TABLE 1. SUBSETS COMPOSITION OF MONONUCLEAR VENOUS AND CAPILLARY BLOOD OF HEALTHY AND PSORIASIS PATIENTS (M±SE, %)

	Псориаз / Psoriasis					
	Группа 1a / Group 1a					
	День 0 / Day 0		День 14 / Day 14		День 28 / Day 28	
	Капилляр Capillary	Вена Vien	Капилляр Capillary	Вена Vien	Капилляр Capillary	Вена Vien
Лимфоциты Lymphocytes CD45RA ⁺	48,47±1,35	49,31±2,16	47,74±1,52	46,81±2,20	40,98±1,76	48,41±1,66
CD45R0⁺	32,25±2,62	29,77±2,23	33,05±1,72	32,92±2,28	35,11±1,97	33,57±2,07
CD45RA⁺/CD45R0⁺	4,17±0,33*	3,12±0,31*	3,23±0,24*	3,30±0,28*	1,59±0,13#	2,71±0,25*
CD4⁺CD45RA⁺	15,46±1,35	14,35±1,45	13,08±1,24	10,96±1,06	12,97±1,18	13,78±1,01
CD4⁺CD45R0⁺	23,04±1,81	20,25±1,85	21,82±2,13*	17,95±1,46	24,08±2,10	24,79±2,19**
CD3⁺	65,65±1,86	64,20±1,98	64,24±2,98	66,53±2,20	69,07±2,31	66,65±1,53
CD3⁺CD4⁺	43,17±2,15	41,21±2,01	42,88±3,17	37,26±2,71	43,25±2,66	43,90±1,75
CD4⁺CD294⁺	1,28±0,11	1,49±0,14	1,53±0,13	1,72±0,12	1,10±0,11	1,72±0,15
CD25⁺CD127⁺CD4⁺	11,45±1,03*	10,97±0,84*	10,96±0,81*	9,27±0,91*	12,41±1,14*	11,98±1,08*
CD25⁺CD127⁺CD4⁺	8,29±0,57*	7,99±0,58*	9,29±0,63*	9,18±0,66*	8,82±0,37*	8,26±0,54*
CD45R0⁺CD4⁺CD161⁺	15,66±1,52	16,21±1,18	15,01±1,34	13,00±1,16#	13,48±0,69	15,14±1,24
CD4⁺CXCR5⁺	15,08±1,01	15,69±1,14	15,37±0,93	14,90±0,81	12,27±0,64**	12,71±0,67#
CD3⁺CD8⁺	20,20±1,55	19,77±1,55	19,40±1,67	19,39±1,59	20,46±2,02	17,23±1,57
CD19⁺	14,69±1,17*	13,02±1,28*	13,37±1,19*	12,70±1,18*	12,65±1,12*	12,45±1,05*
CD5⁺CD19⁺	21,68±2,14*	18,52±1,72*	19,43±1,24*	16,63±1,61*	15,45±1,28#	14,88±1,36**
CD1d⁺CD5⁺CD19⁺	9,85±0,81*	8,28±0,83*	9,51±0,97*	7,79±0,74*	8,46±0,74*	7,04±0,68*
CD27⁺CD19⁺	15,79±1,28*	12,94±1,17	12,60±1,14**	10,63±1,05*	14,06±1,28*	11,26±1,11*
CD3⁺CD16/56⁺	10,24±1,05	9,35±0,72	9,20±0,86*	8,92±0,87*	7,72±0,71**	7,48±0,72**
CD3⁺CD16/56⁺	2,90±0,28*	2,38±0,21*	2,28±0,16*	2,23±0,21*	1,41±0,13#	1,15±0,11#
Моноциты Monocytes CD14 ^{hi} CD16 ⁻	80,67±1,75	79,37±2,27	71,63±2,81**	74,71±3,89*	77,33±3,17*	77,81±3,22*
CD14^{lo}CD16^{hi}	6,65±0,56*	7,98±0,78*	10,97±1,07**	12,08±1,14**	8,48±0,71**	8,71±0,86*
CD14⁺CD16^{int}	6,33±0,82*	7,56±0,75*	7,10±0,71*	6,87±0,57*	7,56±0,72	6,30±0,58*

Примечание. * – p < 0,05 по сравнению с соответствующим здоровым контролем. # – p < 0,05 по сравнению с исходным уровнем.

Note. *, p < 0.05 compared to matched healthy controls; #, p < 0.05 compared to the baseline.

ных субпопуляций в капиллярной крови был несколько выше, чем в венозной, как у здоровых, так и у больных, но различия были недостоверны.

В группе больных 1a, получавших стандартное лечение, индекс PASI до лечения составил 9,99±0,41, через 14 дней (окончание лечения) значимо снизился до 6,21±0,36 (p < 0,05), а еще через 14 дней поднялся до 9,38±0,56 и значимо не отличался от PASI в исходной точке. При оценке ДИШС до лечения средний индекс составил 20,71±0,73, на момент окончания лечения он

снизился до 15,57±0,73 (p < 0,05), а спустя 2 недели после лечения составил 18,07±0,70 (p < 0,05). Индекс DLQI до начала лечения составил 11,79±0,74, а после лечения 9,5±1,02 (p < 0,05). В этой группе были отмечены изменения в уровнях отдельных субпопуляций, при этом различия с соответствующим уровнем до лечения были значимы. Так, на 14 день исследования (окончание использования препарата) в капиллярной крови выявлено снижение В-клеток памяти (CD27⁺CD19⁺) с 15,79% до 12,60%, классических

Псориаз / Psoriasis						Здоровые Healthy	
Группа 1б / Group 1b							
День 0 / Day 0		День 14 / Day 14		День 28 / Day 28			
Капилляр Capillary	Вена Vien	Капилляр Capillary	Вена Vien	Капилляр Capillary	Вена Vien	Капилляр Capillary	Вена Vien
48,16±2,36	41,00±2,96	45,09±2,77	46,42±2,48	48,39±2,30	47,43±2,69	49,37±2,73	50,57±2,78
36,00±2,26	31,52±2,47	34,94±2,70	33,07±2,87	36,23±2,09	35,12±2,25	36,72±2,12	26,17±1,65
2,35±0,21*	2,16±0,15*	1,69±0,14**	2,38±0,20*	0,98±0,09**	2,20±0,17*	0,56±0,05	0,42±0,04
12,67±1,31	10,48±1,03	14,15±1,35	10,93±1,06	11,99±1,09	11,99±1,07	14,21±1,27	11,40±1,02
22,72±1,64*	19,15±1,81	21,82±1,62*	19,75±1,64	22,83±1,58*	21,34±1,62	26,78±1,83	18,14±1,48
64,42±2,65	63,56±2,59	65,27±2,91	64,46±2,67	67,35±2,31	65,54±2,34	68,84±2,26	69,36±2,35
38,38±2,25	36,02±2,11	38,11±1,87	37,25±1,99	39,13±1,79	37,49±1,93	43,30±2,18	41,07±2,20
3,70±0,36	3,06±0,18	2,83±0,25	2,55±0,22	2,86±0,22	1,16±0,09	1,68±0,79	1,92±0,12
11,99±1,13*	10,88±1,04*	11,27±1,05*	10,48±1,01*	9,20±0,89#	10,35±1,02*	7,93±0,64	7,34±0,58
8,76±0,47*	8,65±0,53*	8,63±0,49*	7,77±0,51*	8,94±0,64*	8,76±0,49*	5,91±0,36	6,78±0,49
16,22±1,05	13,81±1,13	14,56±1,26	14,02±1,06	14,05±1,07#	15,78±1,21	13,17±1,10	14,19±0,88
17,23±0,72*	17,46±0,74*	16,02±0,97	16,27±0,87	15,51±0,73#	16,96±0,97	14,91±0,93	13,94±0,76
22,70±1,58	20,36±1,48	21,22±1,85	20,00±1,71	21,24±1,72	21,25±1,61	19,46±1,42	19,01±1,43
12,54±1,13*	13,08±1,19*	11,65±0,90*	11,85±0,91*	11,87±0,83*	12,13±0,88*	9,73±0,76	8,88±0,79
19,77±1,49*	16,19±1,57*	16,55±1,37**	16,61±1,16*	17,16±1,32*	16,36±1,47*	13,33±1,07	11,86±0,94
9,22±0,87*	8,01±0,67*	7,42±0,66**	8,00±0,61*	11,20±1,08*	7,59±0,65*	6,29±0,53	4,39±0,40
17,76±1,61	14,70±1,39	15,46±1,44*	16,60±1,27*	18,05±1,56	17,58±1,68*	20,60±1,48	13,76±0,85
12,09±1,13	10,96±0,98	12,12±1,16	10,20±0,79	11,57±0,92	10,72±0,94	12,15±1,03	11,24±0,77
2,99±0,21*	2,29±0,18*	3,42±0,29*	2,79±0,23*	2,96±0,19*	2,53±0,26*	1,13±0,08	0,87±0,07
78,00±1,56*	79,60±1,39	75,81±2,79*	80,76±2,29	81,56±1,44	81,57±2,12	86,09±2,56	82,99±2,91
8,15±0,80*	7,44±0,57*	9,08±0,79*	7,66±0,65*	6,97±0,58*	7,22±0,69*	4,88±0,30	5,58±0,41
6,96±0,61*	6,89±0,62*	6,80±0,66*	5,30±0,49*	7,82±0,41	6,16±0,60*	8,95±0,55	10,84±0,87

моноцитов (CD14^{hi}CD16⁻) с 80,67% до 71,63% и подъем уровня промежуточных моноцитов с 6,65% до 10,97%. В том же сроке в венозной крови обнаружено снижение Th17-лимфоцитов (CD45R0⁺CD4⁺CD161⁺) с 16,21% до 13% и подъем уровня неклассических моноцитов с 7,98% до 12,08%. Однако эти изменения не приводили к нормализации указанных показателей и значимо отличались от соответствующих уровней здоровых (p < 0,05). Через 2 недели после окончания лечения (28 день наблюдения) в капиллярной

крови больных выявлено значимое снижение, по сравнению с исходным уровнем субпопуляции CD45RA⁺/CD45R0⁺ с 4,17% до 1,59%, Tfh – с 15,08% до 12,27%, В1-клеток с 21,68% до 15,45%, НК-клеток с 10,24% до 7,72%, НКТ-клеток с 2,9% до 1,41%, а субпопуляция неклассических моноцитов все еще оставалась значимо повышенной по сравнению с исходным уровнем: 8,48% и 6,65%, соответственно. Важно, что уровень субпопуляций CD45RA⁺/CD45R0⁺, В1-клеток и НКТ-клеток на 28 день наблюдения значимо не

отличались от соответствующего уровня здорового контроля, а субпопуляция NK-клеток оказалась значимо снижена не только по отношению к исходному уровню, но и к здоровому контролю. В то же время, в венозной крови значимо повысился уровень субпопуляции CD4⁺CD45R0⁺ с 20,25% до 24,79%, значимо снизился уровень В1-клеток с 18,52% до 14,88% и NK-клеток с 9,35% до 7,48%, при этом последние были значимо снижены не только по сравнению с исходным уровнем, но и со здоровым контролем, как и в капиллярной крови. Уровень Tfh снизился с 15,69% до 12,71%, а NKT-клеток с 2,38% до 1,15%, при этом уровни обеих субпопуляций значимо не отличались от здорового контроля.

В группе больных 1б, получавших инновационный препарат, содержащий рекомбинантный RAIL-36, индекс PASI до лечения составил 11,16±0,58, через 14 дней на момент окончания лечения он значимо снизился до 4,62±0,30 ($p < 0,01$) и спустя 2 недели после лечения сохранился на том же уровне 4,51±0,31. Индекс ДИШС до лечения составил 22,05±0,70, на момент окончания лечения значимо снизился до 13,9±0,42 ($p < 0,01$) и остался на том же уровне спустя 2 недели после лечения 13,8±0,46. Индекс DLQI до лечения составил 12,45±0,60 и значимо снизился после лечения до 4,85±0,35 ($p < 0,01$). На 14 день (окончание использования препарата) в капиллярной крови отмечено значимое снижение уровня субпопуляции CD45RA⁺/CD45R0⁺ с 2,35% до 1,69%, В1-клеток с 19,77% до 16,55%, и Vreg с 9,22% до 7,42%, хотя они все еще значимо отличались от здорового контроля. В венозной крови значимых изменений в уровнях исследованных субпопуляций выявлено не было. На 28 день наблюдений (через 14 дней после окончания лечения) в капиллярной крови продолжилось снижение уровня субпопуляции CD45RA⁺/CD45R0⁺ до 0,98%, но она все еще не достигала уровня здорового контроля. Важно, что значимо ($p < 0,05$) снизился уровень активированных хелперов с 11,99% до 9,2%. Также значимо снизился уровень Th17 с 16,22% до 14,05% и Tfh с 17,23% до 15,51%. При этом все три показателя не отличались значимо от уровня здорового контроля. В то же время в венозной крови не было выявлено значимых различий с исходным уровнем.

Оценивая эффективность лечения по изменениям индексов PASI и ДИШС, мы видим, что оба препарата приводили к снижению выраженности симптомов заболевания на момент окончания лечения, но спустя 2 недели после отмены препаратов в группе 1а уровни индексов практически возвращались к исходному, тогда как в группе 1б сниженные уровни индексов сохранялись спу-

стя 2 недели после отмены препарата. По оценке самими больными индекс качества жизни (чем ниже, тем лучше) DLQI снизился в группе 1а в 1,24 раза, а в группе 1б – в 2,57 раз. Это свидетельствует о лучшей оценке пациентами полученного эффекта в группе 1б, по сравнению с группой 1а.

Выявлены значимые отклонения в уровнях нескольких субпопуляций у больных псориазом по сравнению со здоровыми, при этом такие отклонения были более выражены в капиллярной крови [3]. Так, в группе 1а в капиллярной крови в результате лечения обнаруживалось больше отклонений от исходного уровня, чем в венозной, а в группе 1б вообще все выявленные изменения по результатам терапии касались только капиллярной крови, не затрагивая системный уровень. Можно заключить, что исследование капиллярной крови, взятой близко к очагу псориатического поражения более информативно, чем венозной крови.

Несмотря на то, что исследованные препараты оказывают воздействие на разные звенья иммунопатогенеза псориаза, были обнаружены сходные изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов в обеих группах. Так, в капиллярной крови в обеих группах отмечено снижение изначально повышенного уровня субпопуляции дважды положительных клеток CD45RA⁺/CD45R0⁺. Клетки, несущие одновременно две изоформы молекулы CD45 являются активными участниками иммунного процесса, поэтому снижение уровня этой субпопуляции после лечения, несомненно, следует расценить как позитивное. Также позитивным является снижение уровней субпопуляций Th17 и Tfh до уровней здорового контроля. Известно, что хелперы, и особенно Th17 активно участвуют в создании петли обратной связи, поддерживающей воспаление в псориатической бляшке [10]. Очень интересно, что в обеих группах было отмечено снижение изначально повышенного уровня В1-клеток после лечения. Известно, что В1 клетки принимают активное участие в утилизации гибнущих клеток организма, поэтому любое хроническое воспаление способствует повышению уровня этих клеток в зоне воспаления. В связи с этим, снижение уровня В1-клеток свидетельствует о снижении интенсивности разрушения клеток кожи в псориатической бляшке после лечения.

Выявлены различия в действии изучаемых препаратов на субпопуляции мононуклеаров. Так, у пациентов группы 1а после лечения обнаружено снижения изначально повышенной субпопуляции NKT-клеток и снижение уровня NK-клеток ниже уровня контрольной группы, тогда как у пациентов группы 1б такого эффекта

не выявлено. Не понятно, является ли такое снижение патогенетически значимым и позитивным как результат лечения. Также в группе 1а обнаружено воздействие лечения на уровни субпопуляций моноцитов: снижение уровня классических и подъем уровня неклассических и промежуточных моноцитов, однако такие изменения не приводили к нормализации изначально измененных уровней этих субпопуляций у псориатических больных. В группе 1б также были свои особенности, так местно наносимый препарат оказывал только местное воздействие, все изменения были выявлены только в капиллярной крови, взятой рядом с очагом поражения кожи, тогда как системно, в венозной крови, никаких изме-

нений выявлено не было. Вторая особенность, что было обнаружено значимое снижение Vreg, по-видимому, связанное со снижением воспалительного процесса, что также подтверждается значимым снижением уровня активированных хелперов. Эти два момента, несомненно, следует расценивать как патогенетически значимые положительные эффекты терапии [13].

Заключение

Таким образом, можно заключить, что оба исследованных препарата пригодны для лечения псориаза, однако необходимы дополнительные исследования для подбора наиболее эффективных схем терапии.

Список литературы / References

1. Колобов А.А., Кондратьева Е.В., Кудлинг Т.В., Карасев М.М., Калинин Р.С., Протасов Е.А., Нибирицкий П.П., Стефанов В.Е., Александров Г.В., Петров А.В., Симбирцев А.С. Разработка препарата для лечения псориаза на основе рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина-36 (IL-36RA) человека // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 271. [Kolobov A.A., Kondratieva E.V., Kudling T.V., Karasev M.M., Kalinin R.S., Protasov E.A., Nimiritsky P.P., Stefanov V.E., Aleksandrov G.V., Petrov A.V., Simbirtsev A.S. Development of a drug for the treatment of psoriasis based on the recombinant human interleukin-36 receptor antagonist (IL-36RA). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, No. 5, p. 271. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-0.
2. Олисова О.Ю., Анпилогова Е.М. Системная терапия псориаза: от метотрексата до генно-инженерных биологических препаратов // Вестник дерматологии и венерологии, 2020. Т. 96, № 3. С. 7-26. [Olisova O.Yu., Anpilogova E.M. Systemic treatment of psoriasis: from methotrexate to biologics. *Vestnik dermatologii i venerologii = Journal of Dermatology and Venereology*, 2020, Vol. 96, no. 3, pp. 7-26. (In Russ.)]
3. Сенникова С.В., Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Закиров Р.Ш., Акулова С.С. Субпопуляционный состав мононуклеаров и цитокиновый профиль венозной и капиллярной крови больных псориазом и здоровых людей // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1333-1346. [Sennikova S.V., Topotygina A.P., Semikina E.L., Zakirov R.Sh., Akulova S.S. Mononuclear subsets and cytokine profile of venous and capillary blood in patients with psoriasis and healthy people. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1333-1346. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-MSA-2391.
4. Bachelez H., Choon S.E., Marrakchi S., Burden A.D., Tsai T.F., Morita A., Turki H., Hall D.B., Shear M., Baum P., Padula S.J., Thoma C. Inhibition of the Interleukin-36 pathway for the treatment of generalized pustular psoriasis. *N. Engl. J. Med.*, 2019, Vol. 380, no. 10, pp. 981-983.
5. Boehncke W.H., Brembilla N.C. Autoreactive T-lymphocytes in inflammatory skin diseases. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1198. doi: 10.3389/fimmu.2019.01198.
6. Boutet M.-A., Bart G., Penhoat M., Amiaud J., Brulin B., Charrier C., Morel F., Lecon J.C., Rolli-Derkinderen M., Bourreille A., Vigne S., Gabay C., Palmer G., Le Goff B., Blanchard F. Distinct expression of interleukin (IL)-36 α , β and γ , their antagonist IL-36Ra and IL-38 in psoriasis, rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 2016, Vol. 184, pp. 159-173.
7. Ceccarelli M., Venanzi Rullo E., Berretta M., Cacopardo B., Pellicanò G.F., Nunnari G., Guarneri C. New generation biologics for the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. State of the art and considerations about the risk of infection. *Dermatol. Ther.*, 2021, Vol. 34, no. 1, e14660. doi: 10.1111/dth.14660.
8. Chiricozzi A., Romanelli P., Volpe E., Borsellino G., Romanelli M. Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, 179. doi: 10.3390/ijms19010179.
9. D'Erme A.M., Wilsmann-Theis D., Wagenpfeil J., Hölzel M., Ferring-Schmitt S., Sternberg S., Wittmann M., Peters B., Bosio A., Bieber T., Wenzel J. IL-36 γ (IL-1F9) is a biomarker for psoriasis skin lesions. *J. Invest. Dermatol.*, 2015, Vol. 135, no. 4, pp. 1025-1032.
10. Debets R., Timans J.C., Homey B., Zurawski S., Sana T.R., Lo S., Wagner J., Edwards G., Clifford T., Me-non S., Bazar J.F., Kastelein R.A. Two novel IL-1 family members, IL-1 delta and IL-1 epsilon, function as an antagonist and agonist of NF-kappa B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 3, pp. 1440-1446.

11. European S3-Guidelines on the systemic treatment of psoriasis vulgaris. Update 2015. EDF in cooperation with EADV and IPC. Available at: <http://www.euroderm.org/edf/index.php/edf-guidelines/category/5-guidelinesmiscellaneous> [Accessed on 11 Apr 2022].
12. Ganesan R., Raymond E.L., Mennerich D., Woska J.R., Caviness G., Grimaldi C., Ahlberg J., Perez R., Roberts S., Yang D., Jerath K., Truncali K., Frego L., Sepulveda E., Gupta P., Brown S.E., Howell M.D., Canada K.A., Kroe-Barrett R., Fine J.S., Singh S., Mbow M.L. Generation and functional characterization of anti-human and anti-mouse IL-36R antagonist monoclonal antibodies. *MAbs*, 2017, Vol. 9, no. 7, pp. 1143-1154.
13. Matsushita T. Regulatory and effector B cells: Friends or foes? *J. Dermatol. Sci.*, 2019, Vol. 93, no. 1, pp. 2-7.

Авторы:

Сенникова С.В. — аспирант лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Топтыгина А.П. — д.м.н., главный научный сотрудник, руководитель лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; профессор кафедры иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Authors:

Sennikova S.V., Postgraduate Student, Laboratory of Cytokines, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Toptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head, Laboratory of Cytokines, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Поступила 24.06.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 24.06.2022
Accepted 28.07.2022

ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА К SARS-CoV-2 У ПАЦИЕНТА С ОБЩЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Сизякина Л.П., Андреева И.И., Харитоновна М.В.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. По мере накопления данных в процессе развития пандемии SARS-CoV-2 инфекции стало ясно, что к факторам риска тяжелого течения COVID-19 среди пациентов с первичными иммунодефицитами относятся нарушения, связанные с дисрегуляцией иммунного ответа. В этой связи представляет интерес выявление возможных предикторов развития выраженной воспалительной реакции при инфицировании коронавирусом у пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью. С этой целью на примере случая из практики проведено изучение динамики параметров иммунной системы у пациента с CVID, перенесшего тяжелый клинический вариант COVID-19.

Пациент К., 49 лет, диагноз «CVID» верифицирован в 35 лет, получает регулярную заместительную терапию ВВИГ. Перенес COVID-19 в тяжелой форме, при лечении получал антицитокиновую терапию и дополнительный курс ВВИГ. Выписан в удовлетворительном состоянии. Методом проточной цитофлуориметрии оценивали количественные и функциональные показатели Т- и В-звеньев иммунной системы при плановом обследовании до инфицирования и через три месяца после выписки из стационара после COVID-19. Показано, что до болезни имелись изменения в параметрах В-клеток, характерные для CVID в виде снижения переключенных В-клеток памяти и плазмобластов. Также верифицированы изменения в Т-клеточном звене в виде перераспределения субпопуляционного состава в сторону Т-эффекторов с увеличением цитолитического потенциала этих клеток и ослаблением Т-клеточной супрессии за счет снижения в циркуляции Treg. После перенесенного COVID-19 у пациента сформировались специфические антитела класса М и G. Развитие иммунитета сопровождалось увеличением количества непереключенных и переключенных В-клеток памяти. В Т-клеточном звене при этом зарегистрировано увеличение Т-клеток памяти, готовых к пролиферативному ответу Т-хелперов и Treg. Исходный провоспалительный настрой Т-звена иммунной системы у нашего пациента с CVID объясним реализацией компенсаторных возможностей иммунной системы, что привело к активации цитолитических эффектов клеточного звена адаптивного ответа при ослаблении гуморальной составляющей. С другой стороны, вероятно, что именно эти изменения внесли свой вклад в клиническое течение COVID-19 в данном клиническом случае. Формирование специфического гуморального ответа к SARS-CoV-2 у пациента с CVID после перенесенной инфекции COVID-19 сопровождается увеличением доли В-клеток памяти, согласованной динамикой параметров Т-клеточной супрессии и активации.

Ключевые слова: ОВИН, специфический иммунитет, COVID-19, Т-лимфоциты, В-лимфоциты

Адрес для переписки:

*Андреева Ирина Ивановна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский
университет», г. Ростов-на-Дону, Россия
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону,
пер. Нахичеванский, 29.
Тел.: 8 (863) 263-44-41.
E-mail: iai3012@rambler.ru*

Address for correspondence:

*Andreeva Irina I.
Rostov State Medical University
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don,
Nakhichevan lane, 29.
Phone: 7 (863) 263-44-41.
E-mail: iai3012@rambler.ru*

Образец цитирования:

*Л.П. Сизякина, И.И. Андреева, М.В. Харитоновна
«Динамика параметров иммунной системы при
формировании специфического иммунитета к SARS-
CoV-2 у пациента с общей вариабельной иммунной
недостаточностью» // Российский иммунологический
журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 529-534.
doi: 10.46235/1028-7221-1163-DOI*

© Сизякина Л.П. и соавт., 2022

For citation:

*L.P. Siziakina, I.I. Andreeva, M.V. Kharitonova "Dynamics
of immune system parameters in development of SARS-CoV-2-
specific immunity in a patient with common variable immune
deficiency", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 529-534.
doi: 10.46235/1028-7221-1163-DOI
DOI: 10.46235/1028-7221-1163-DOI*

DYNAMICS OF IMMUNE SYSTEM PARAMETERS IN DEVELOPMENT OF SARS-CoV-2-SPECIFIC IMMUNITY IN A PATIENT WITH COMMON VARIABLE IMMUNE DEFICIENCY

Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Kharitonova M.V.

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. With the accumulation of data on the evolving SARS-CoV-2 infection pandemic, it became clear that the risk factors for severe course of COVID-19 among the patients with primary immunodeficiency include disorders associated with dysregulation of the immune response. In this regard, it is of interest to identify possible predictors of the pronounced inflammatory reaction upon infection with coronavirus in the patients with general variable immune insufficiency. For this purpose, the dynamics of immune system parameters was studied in a patient with CVID who underwent a severe clinical variant of COVID-19, as an example of clinical case.

We present patient K., 49 years old, with CVID diagnosis verified at the age of 35 years who received regular replacement therapy with IVIG. He suffered from COVID-19 in severe form, received anti-cytokine therapy and an additional course of IVIG during the treatment. He was discharged in satisfactory condition. The quantitative and functional parameters of the T and B lineages of immune system were evaluated by flow cytometry during routine examinations before the infection and three months after the discharge from the hospital after COVID-19. It has been shown that, before the disease, there were changes in the parameters of B cells characteristic of CVID manifesting as a decrease in switched-memory B cells and plasmoblasts. Alterations in the T cell subsets were also revealed, as redistribution of the subpopulation composition towards T effectors with an increased cytolytic potential of these cells and a weakening of T cell suppression, due to decreased Treg in peripheral blood. After undergoing COVID-19, the patient developed specific IgM and IgG antibodies. The development of immune response was accompanied by an increase in the number of unswitched and switched memory B cells. At the same time, we have registered an increase in memory T cells ready for the proliferative response of T helper cells and Treg cells. The initial pro-inflammatory pattern of the T cell lineage system in our patient with CVID is explained by the implementation of the compensatory capabilities of the immune system, thus leading to activation of the cytolytic effects of cellular compartment in adaptive immune response, along with attenuation of the humoral component. Moreover, it is likely that these changes contributed to the clinical course of COVID-19 in this clinical case. Development of a specific humoral response to SARS-CoV-2 in a patient with CVID after a COVID-19 infection is accompanied by an increased proportion of memory B cells, coordinated dynamics of T cell suppression and activation parameters.

Keywords: CVID, specific immunity, COVID-19, T lymphocytes, B lymphocytes

Введение

Пациенты с первичными иммунодефицитами (ПИД) с момента развития пандемии SARS-CoV-2 инфекции относились к группе высокого риска и особого внимания специалистов. По мере накопления данных в прогрессии эпидемического процесса стало ясно, что летальность среди пациентов с ПИД не отличалась от таковой в общей популяции, а к факторам риска тяжелого течения COVID-19 в первую очередь относятся врожденные дефекты, связанные с дисрегуляцией иммунного ответа [3]. Так, среди ПИД с нарушением продукции антител наиболее уязвимы для тяжелого течения COVID-19 пациенты с общей вариабельной иммунной недостаточностью

(ОВИН) [5, 9]. Выявление предикторов развития выраженной воспалительной реакции при инфицировании коронавирусом у этой категории больных представляет интерес.

Цель исследования – продемонстрировать динамику изменений параметров иммунной системы у пациента с ОВИН, перенесшего COVID-19.

Материалы и методы

Пациент К., 49 лет. В 31 год диагностирована бронхоэктатическая болезнь, в 35 лет установлена гипогаммаглобулинемия (IgA – 0,01 г/л; IgM – 1,1 г/л; IG – 1,9, г/л), количество CD19⁺ лимфоцитов – 6%, специфические поствакцинальные антитела не выявлены, поставлен

диагноз ОВИН, начата заместительная терапия ВВИГ IgG. Перенес COVID-19 в тяжелой форме: поражение легких соответствовало КТ-4, сатурация 90% с необходимостью кислородной поддержки, температура 38,5-39 °С в течение 5 дней, при лечении COVID-19 получал антицитокиновую терапию и ВВИГ. Выписан в удовлетворительном состоянии через три недели стационарного лечения. Пациент состоит в регистре ПИД Минздрава РО, находится под регулярным наблюдением НИИ и кафедры клинической иммунологии и аллергологии РостГМУ, им подписано информированное согласие на участие в научных исследованиях в соответствии с протоколом, одобренным локальным независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России (протокол № 17/16 от 20.10.2016). Представлены данные иммунологического обследования до болезни и через три месяца после перенесенного COVID-19.

Методом проточной цитофлуориметрии (Cytomics FC 500, США) с использованием моноклональных антител с различным набором цветных меток (Beckman Coulter, США) оценивали общее число Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺), долю Т-клеток памяти (CD3⁺CD45R0⁺), наивных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD45RA⁺, Т-клеток, экспрессирующих активационные маркеры (CD3⁺HLA-DR⁺), общее число CD4⁺Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺), экспрессию на них рецепторов костимулирующего взаимодействия (CD4⁺CD154⁺; CD4⁺CD28⁺), количество циркулирующих Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺); общее число CD8⁺Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), их цитолитический потенциал (CD8⁺GrB⁺), общее число В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺), плазмобластов (CD19⁺ CD27⁺CD38⁺), наивных В-клеток (CD19⁺CD27⁻), В-клеток памяти с переключенным (CD19⁺CD27⁺IgD⁻) и непереключенным (CD19⁺CD27⁺IgD⁺) фенотипом, Breg (CD19⁺CD24⁺CD38⁺), экспрессию костимулирующих рецепторов Т-/В-клеточного взаимодействия (CD19⁺CD40⁺ и CD19⁺CD86⁺). Уровень сывороточных иммуноглобулинов оценивали методом радиальной иммунодиффузии в геле (применяли наборы производства ФГУП НПО «Микроген»). Для определения референс-значений исследуемых параметров обследовано 20 практически здоровых доноров. Содержание в сыворотке крови специфических IgM к SARS-CoV-2 оценивали полуколичественно с определением коэффициента позитивности (КП, тест-система SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ). Концентрацию иммуноглобулинов класса G к Spike-белку SARS-CoV-2 оценивали с помощью тест-системы SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ с определением Binding antibody units – BAU/мл.

Результаты и обсуждение

При проведении планового иммунологического мониторинга, выполненного до контакта с больным COVID-19, в период стойкой клинической ремиссии ОВИН у пациента эффект проводимой заместительной терапии ВВИГ подтвержден претрансфузионным уровнем IgG (10,32 г/л), соответствующим требованиям клинических рекомендаций [1]. Сопоставление результатов иммунофенотипирования клеток иммунной системы с контрольными значениями группы практически здоровых документировало снижение в периферическом кровотоке доли наивных В-клеток и, в особенности, переключенных В-клеток памяти, уменьшение количества плазмобластов и В-клеток, экспрессирующих CD40 при увеличении числа В-клеток, несущих рецептор CD86 и регуляторных В-лимфоцитов (Breg). В клеточном звене адаптивного иммунитета определяются сопоставимые с контролем показатели общего количества Т-лимфоцитов, наивных Т-клеток и Т-клеток памяти, однако субпопуляции перераспределены в сторону снижения CD4⁺ и увеличения CD8⁺Т-клеток. В хелперной субпопуляции отмечено уменьшение доли Treg и готовых к пролиферации CD28⁺Т-клеток, тогда как среди CD8⁺ субпопуляции увеличено число цитолитически активной формы GrB⁺Т-лимфоцитов (табл. 1).

Через 3 месяца после выписки из стационара пациент не предъявлял жалоб, клинически находился в удовлетворительном состоянии. Серологический анализ сыворотки крови детектировал специфические антитела к антигенам SARS-CoV-2 IgM: КП 3,55 и IgG: 487BAU. Сопоставительная характеристика результатов иммунофенотипирования клеток иммунной системы с исходными и нормативными показателями не показала существенной динамики параметров В-лимфоцитов. Не претерпели динамики параметры Breg (оставаясь выше контрольных значений), плазмобластов (ниже нормы), CD19⁺CD40⁺В-лимфоцитов (ниже нормативных параметров). При этом значимо возросло содержание в периферическом кровотоке В-клеток, экспрессирующих корецептор антигенной презентации: количество CD19⁺CD86⁺ клеток в еще большей степени, нежели до болезни, превышает контрольные цифры. Следует отметить существенную динамику В-клеток памяти. Отмечается рост относительного содержания непереключенных В-клеток памяти, доля этого фенотипа В-клеток превысила контрольные значения. Количество переключенных В-клеток памяти выросло до нижней границы нормативных показателей (табл. 1). В Т-клеточном звене, в сравнении с параметрами до болезни, нет дина-

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПАЦИЕНТА С ОВИН ДО ИНФИЦИРОВАНИЯ И ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО COVID-19

TABLE 1. DYNAMICS OF PARAMETERS OF THE IMMUNE SYSTEM OF A PATIENT WITH CVID BEFORE INFECTION AND AFTER UNDERGOING COVID-19

Показатель Indicator	До болезни Before disease	После болезни After disease	Нормальные значения Normal values
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /л	4,8	4,7	5,6 (4-8)
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	21,0	22,0	28 (20-36)
CD19 ⁺ , %	5,0	6,0	8,0 (5,0-10,0)
CD19 ⁺ CD27 ⁻ , %	3,6	3,0	5,7 (5,1-6,1)
CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ , %	1,2	2,3	1,1 (1,0-1,3)
CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻ , %	0,2	0,8	1,1 (0,9-1,3)
CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD24 ⁺ , %	1,2	1,2	0,8 (0,6-1,0)
CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD27 ⁺ , %	0,6	0,6	1,1 (0,9-1,3)
CD19 ⁺ CD40 ⁺ , %	4,8	4,9	7,0 (6,6-7,5)
CD19 ⁺ CD86 ⁺ , %	0,2	1,0	0,13 (0,11-0,15)
CD3 ⁺ , %	75,0	76,0	75 (72-77)
CD3 ⁺ CD45RA ⁺ , %	26,0	25,0	25 (19-32)
CD3 ⁺ CD45R0 ⁺ , %	19,0	25,0	17 (13-21)
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	5,0	5,0	1,3 (0,9-1,8)
CD4 ⁺ , %	24,0	25,0	45 (38-47)
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	0,5	1,6	1,8 (1,3-2,5)
CD4 ⁺ CD28 ⁺ , %	10,0	18,0	28 (21-30)
CD4 ⁺ CD154 ⁺ , %	0,5	0,6	0,5 (0,3-0,9)
CD8 ⁺ , %	49,0	51,0	24 (20-28)
CD8 ⁺ Gr ⁺ , %	30,0	31,0	14 (11-15)

мики количества Т-лимфоцитов, субпопуляционного перераспределения, экспрессии поздних активационных маркеров, наивных Т-клеток и цитолитически активной формы Т-эфффекторов. Однако регистрируется увеличение Т-клеток памяти с превышением верхней границы контрольных цифр, увеличение числа готовых к пролиферативному ответу CD4⁺CD28⁺Т-клеток, относительное количество которых, тем не менее, остается ниже контроля, рост до нормативных показателей количества циркулирующих Treg (табл. 1).

Иммунологическая характеристика пациента с ОВИН до инфицирования документировала отличия от контрольных значений, в том числе те изменения В-лимфоцитов, которые соответствуют критериям ESID [7]: снижение количества переключенных В-клеток памяти до 40% от общего числа В-клеток, двукратное уменьшение в периферическом кровотоке числа плазмбластов. Помимо этого, нами выявлены и другие

отличительные от нормальных значений параметры В-клеточного звена: усиление готовности к презентации антигена посредством повышения экспрессии CD86 при снижении доли супрессорных В reg.

Опыт нашего наблюдения за пациентами с ОВИН, другие литературные данные подтверждают факт существования дисфункции Т-клеток при этом варианте ПИД [2, 4]. Более того, сопоставление особенностей клинического течения COVID-19 у пациентов с Х-АГГ и ОВИН позволило авторам высказать предположение, что более тяжелое заболевание у некоторых пациентов с ОВИН может быть связано с дисфункцией Т-клеток [8]. В представленном клиническом наблюдении до инфицирования SARS-CoV-2 у пациента с ОВИН отмечено изменение дифференцировки субпопуляционного состава в сторону CD8⁺Т-эфффекторов с усилением их литического потенциала и ослаблением Treg супрессии. Эти изменения, вероятно, объяснимы реализаци-

ей компенсаторных возможностей иммунной системы, приведшей у пациента с ослаблением гуморальной составляющей к активации цитолитических эффектов клеточного звена адаптивного ответа. С другой стороны, вероятно, что исходный провоспалительный настрой Т-клеточного звена внес свой вклад в клиническое течение COVID-19 в данном клиническом случае.

Через 4 месяца от начала заболевания у пациента зарегистрирован факт формирования специфического гуморального ответа к вирусу SARS-CoV-2 как класса М, так и класса G. Полученные результаты не противоречат публикациям, показавшим возможность развития специфического ответа у большинства пациентов с ОВИН в ответ на инфицирование SARS-CoV-2 [6]. Формирование гуморального ответа с участием непереключенных и переключенных В-клеток памяти в нашем случае подтверждается результатами иммунофенотипирования после болезни. При этом основную часть составляют непереключенные В-клетки памяти, превышая контрольные значения вдвое. Следует отметить, что данный факт соответствует диагностическим критериям ОВИН и согласуется с выявленным в нашем случае высоким значением специфических IgM-антител к антигенам SARS-CoV-2. В то же время и число переключенных В-клеток памяти через 4 месяца от манифестации инфекционного процесса у нашего пациента выше, нежели до инфицирования,

находясь в пределах нормы. Высокие значения ВАУ подтверждают эффективность механизмов антителопродукции в данном случае.

После перенесенного COVID-19 у пациента на уровне до болезни параметры большинства исследованных показателей Т-клеточного звена, демонстрируя перераспределение субпопуляций в пользу CD8⁺Т-лимфоцитов с высоким эффекторным потенциалом. В то же время относительное количество Treg, увеличившись в ходе инфекции, достигло значений нормы, тогда как доля Т-клеток памяти стала выше, нежели в исходе и группе сравнения. Эти результаты подтверждают не только вовлеченность Т-клеточного звена иммунного ответа в формирование постинфекционного иммунитета, но и стабилизацию на фоне болезни и иммуноотропной терапии регуляторного потенциала Т-клеток.

Заключение

Исходный провоспалительный настрой Т-звена иммунной системы пациента с ОВИН имеет значение в клинической манифестации COVID-19 в данном клиническом случае. Формирование специфического гуморального ответа к SARS-CoV-2 у пациента с ОВИН после перенесенной инфекции COVID-19 сопровождается увеличением доли В-клеток памяти, согласованной динамикой параметров Т- и В-клеточной супрессии и активации.

Список литературы / References

1. Клиническая иммунология и аллергология: федеральные клинические рекомендации. Под ред. Хаитова Р.М., Ильиной Н.И. М.: Фармус Принт Медиа, 2015. 624 с. [Clinical immunology and allergology: federal clinical guidelines. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.]. Moscow: Farmus Print Media, 2015. 624 p.
2. Сизякина Л.П., Андреева И.И., Данилова Д.И. Дисрегуляторные процессы клеточного звена иммунной системы в динамике общевариабельной иммунной недостаточности // Клиническая лабораторная диагностика, 2021. Т. 6, № 3. С. 160-165. [Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Danilova D.I. Dysregulatory processes of the cellular link of the immune system in the dynamics of common variable immunodeficiency. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2021, Vol. 66, no. 3, pp. 160-165. (In Russ.)]
3. Bucciol G., Tangye S.G., Meyts I. Coronavirus disease 2019 in patients with inborn errors of immunity: lessons learned. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2021, Vol. 33, no. 6, pp. 648-656.
4. Fernando S.L., Jang H.S., Li J. The immune dysregulation of common variable immunodeficiency disorders. *Immunol. Lett.*, 2021, no. 230, pp. 21-26.
5. Jones J.M., Faruqi A.J., Sullivan J.K., Calabrese C., Calabrese L.H. COVID-19 outcomes in patients undergoing B cell depletion therapy and those with humoral immunodeficiency states: a scoping review. *Pathog. Immun.*, 2021, Vol. 6, no. 1, pp. 176-103.
6. Pulvirenti F., Fernandez Salinas A., Milito C., Terreri S., Mortari E. P., Quintarelli C., di Cecca S., Lagnese G., Punziano A., Guercio M., Bonanni L., Auria S., Villani F., Albano C., Locatelli F., Spadaro G., Carsetti R., Quinti I. B cell response induced by SARS-CoV-2 infection is boosted by the BNT162b2 vaccine in primary antibody deficiencies. *Cells*, 2021, Vol. 10, no. 11, 2915. doi:10.3390/cells10112915.
7. Seidel M.G., Kindle G., Gathmann B., Quinti I., Buckland M., van Montfrans J., Scheible R., Rusch S., Gasteiger L.M., Grimbacher B., Mahlaoui N., Ehl S., Abinun M., Albert M., Cohen S. B., Bustamante J., Cant A., Casanova J.-L., Chapel H., Dokal I., Donadieu J., Durandy A., Edgar D., Espanol T., Etzioni A., Fischer A., Gaspar B., Gatti R., Gennery A., Grigoriadou S., Holland S., Janka G., Kanariou M., Klein C., Lachmann H., Lilic D., Manson A., Martinez N., Meyts I., Moes N., Moshous D., Neven B., Ochs H., Picard C., Renner E., Rieux-Laucat F., Seger R.,

Soresina A., Stoppa-Lyonnet D., Thon V., Thrasher A., van de Veerdonk F., Villa A., Weemaes C., Warnatz K., Wolska B., Zhang S.-Y. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry Working Definitions for the Clinical Diagnosis of Inborn Errors of Immunity. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2019, no. 7, pp. 1763-1770.

8. Soresina A., Moratto D., Chiarini M., Paolillo C., Baresi G., Focà E., Bezzi M., Baronio B., Giacomelli M., Badolato R. Two X-linked agammaglobulinemia patients develop pneumonia as COVID-19 manifestation but recover. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2020, Vol. 31, no. 5, pp.565-569.

9. Turriziani O., Bondioni M.P., Filippini M., Soresina A., Spadaro G., Agostini C., Carsetti R., Plebani A. A possible role for B cells in COVID-19? Lesson from patients with agammaglobulinemia. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 146, no. 1, pp. 1211-213.

Авторы:

Сизякина Л.П. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической иммунологии и аллергологии, НИИ клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», г. Ростов-на-Дону, Россия

Андреева И.И. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии, НИИ клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», г. Ростов-на-Дону, Россия

Харитоновна М.В. — к.м.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Sizyakina L.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Andreeva I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Kharitonova M.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Immunology and Allergology, Research Institute of Clinical Immunology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 04.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 04.07.2022
Accepted 28.07.2022

АССОЦИАЦИЯ ИЗМЕНЕНИЙ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ И КОМПОНЕНТОВ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ПАЦИЕНТОВ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА

Сумеркина В.А., Телешева Л.Ф., Головнева Е.С.

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

Резюме. Компоненты метаболического синдрома (МС) являются независимыми факторами кардиометаболического риска и ассоциированы с нарушениями гуморального иммунитета, однако литературные данные об особенностях цитокинового профиля при МС неоднозначны. Выполнено определение уровня цитокинов у пациентов обоего пола с МС и исследована их взаимосвязь с компонентами МС, а также показателями, характеризующими функцию висцеральной жировой ткани. В работу включили 149 пациентов в возрасте 18-45 лет. Пациентов распределили в 2 группы: 1-я группа (n = 71) – пациенты без абдоминального ожирения и компонентов МС (группа сравнения); 2-я группа (n = 78) – пациенты с МС. Определяли концентрацию глюкозы, гликозилированного гемоглобина, инсулина, общего холестерина, ХсЛПВП, ХсЛПНП, триглицеридов, лептина, адипонектина; рассчитывали индексы инсулинорезистентности НОМА-IR, Тг/ЛПВП и TuG, а также маркер дисфункции висцеральной жировой ткани VAI. Методом ИФА определяли концентрацию IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN α , IFN γ , MCP-1 и TNF α .

У пациентов с МС было определено повышение уровня IL-6, IL-10, MCP-1 и снижение цитокинов IL-2, IL-4, IFN γ . Методом корреляционного анализа установлена взаимосвязь уровня глюкозы и MCP-1; гликозилированного гемоглобина и IL-6, TNF α . Среди показателей липидного обмена установлена ассоциация ХсЛПНП и IFN γ ; ХсЛПВП и IL-2, IL-4, IFN γ . Уровень триглицеридов был взаимосвязан с MCP-1. Установлена отрицательная взаимосвязь наличия артериальной гипертензии и содержания IL-4. Также была определена отрицательная корреляция уровня лептина с концентрацией IL-4 и IFN γ . Показатели, характеризующие инсулинорезистентность Тг/ЛПВП и TuG, были ассоциированы с поддерживающим хронический воспалительный процесс хемокином MCP-1. Индекс VAI, отражающий дисфункцию висцеральной жировой ткани, был взаимосвязан с MCP-1.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об участии системы цитокинов в формировании патологии висцеральной жировой ткани и развитии метаболического синдрома.

Ключевые слова: метаболический синдром, цитокины, инсулинорезистентность, адипокины, дисфункция висцеральной жировой ткани

ASSOCIATION OF THE CYTOKINE PROFILE AND METABOLIC SYNDROME COMPONENTS IN YOUNG PATIENTS

Sumerkina V.A., Telesheva L.F., Golovneva E.S.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. The components of metabolic syndrome (MS) are independent factors of cardiometabolic risk and are associated with impaired humoral immunity. However, the literature data on the cytokine profile features

Адрес для переписки:

Сумеркина Вероника Андреевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет»
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (906) 866-33-50.
E-mail: veronika.sumerkina@mail.ru

Address for correspondence:

Sumerkina Veronika A.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (906) 866-33-50.
E-mail: veronika.sumerkina@mail.ru

Образец цитирования:

В.А. Сумеркина, Л.Ф. Телешева, Е.С. Головнева
«Ассоциация изменений цитокинового профиля
и компонентов метаболического синдрома у пациентов
молодого возраста» // Российский иммунологический
журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 535-540.
doi: 10.46235/1028-7221-1164-AOT

© Сумеркина В.А. и соавт., 2022

For citation:

V.A. Sumerkina, L.F. Telesheva, E.S. Golovneva
“Association of the cytokine profile and metabolic syndrome components in
young patients”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 535-540.
doi: 10.46235/1028-7221-1164-AOT

DOI: 10.46235/1028-7221-1164-AOT

in MS are ambiguous. Therefore, associations between cytokine levels and MS components were determined in a group of MS patients of both sexes, as well as indices of visceral adipose tissue function were studied. The work included 149 patients aged 18-45 years. The patients were divided into 2 groups: group 1 (n = 71) included patients without abdominal obesity and MS components (comparison group); group 2 (n = 78), patients with MS. The concentrations of glucose, glycosylated hemoglobin, insulin, total cholesterol, HDL-C, LDL-C, triglycerides, leptin, adiponectin were determined. The indexes of insulin resistance HOMA-IR, Tg/HDL and TyG, as well as marker of visceral adipose tissue dysfunction VAI were calculated. ELISA technique was used to determine the concentration of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN α , IFN γ , MCP-1 and TNF α . Results: In the patients with MS, we have found increased levels of IL-6, IL-10, MCP-1, and decrease of IL-2, IL-4, IFN γ levels. Correlation analysis established a relationship between glucose levels and MCP-1; glycosylated hemoglobin and IL-6, TNF α . Among the indices of lipid metabolism, we have revealed some associations between LDL-C and IFN γ ; HDL-C and IL-2, IL-4, IFN γ . The levels of triglycerides correlated with MCP-1. A negative relationship between the presence of arterial hypertension and the IL-4 contents was established. A negative correlation of leptin levels with IL-4 and IFN γ concentrations was also determined. Markers of insulin resistance (Tg/HDL and TyG) were associated with MCP-1 chemokine, thus supporting chronic inflammatory process. The VAI index, which reflects the dysfunction of visceral adipose tissue, showed a correlation with MCP-1. Thus, the results of investigation suggest an involvement of the cytokine system in the disorders of visceral adipose tissue and development of the metabolic syndrome.

Keywords: metabolic syndrome, cytokines, insulin resistance, adipokines, visceral adipose tissue dysfunction

Введение

В настоящее время достигнуты успехи в изучении патогенеза отдельных компонентов метаболического синдрома (МС), однако отсутствует понимание механизмов инициирования мультисистемного ответа и прогрессии типовых патологических процессов, лежащих в основе развития артериальной гипертензии, дислипидемии и гипергликемии. Ожирение и метаболический синдром рассматривают в качестве хронического субклинического воспаления. В работах, освещающих патогенез отдельных компонентов МС (артериальной гипертензии, дислипидемии, гипергликемии, дисфункции эндотелия) воспалительный процесс представлен одним из ведущих механизмов [4, 8]. Вместе с тем сведения о характере системных иммунологических нарушений при ожирении и МС неоднозначны [5, 15]. Большинство современных исследований сосредоточены на механизмах развития локальных иммунных изменений в жировой ткани [1, 2]. Таким образом, изучение при МС системы цитокиновой регуляции представляет большой научный интерес.

Материалы и методы

В работу включили 149 человек в возрасте 18-45 лет. Пациентов распределили в 2 группы: 1-я группа (n = 71) – условно здоровые лица без абдоминального ожирения, избытка массы тела и дополнительных критериев метаболического синдрома; 2-я группа (n = 78) – пациенты с МС (в соответствии с Национальными рекомендациями «Диагностика и лечение метаболического синдрома» Российского кардиологического общества, 2009). Определяли концентрацию глюкозы, гликозилированного гемоглобина, инсулина, общего холестерина, ХсЛПВП, ХсЛПНП,

триглицеридов, лептина, адипонектина; рассчитывали индексы инсулинорезистентности НОМА-IR, Тг/ЛПВП и TyG, а также маркер дисфункции висцеральной жировой ткани VAI. В периферической крови пациентов методом ИФА определяли уровень цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN α , IFN γ , MCP-1 и TNF α . Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 10 (StatSoft, Inc., 2011, США). Для всех видов анализа статистически значимыми считались значения $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В группе пациентов с МС дислипидемия характеризовалась повышением уровня общего холестерина, ХсЛПНП, триглицеридов и снижением ХсЛПВП (табл. 1). Были установлены гипергликемия (повышение уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина) и гиперинсулинемия. Индексы НОМА-IR, Тг/ХсЛПВП и TyG при МС были выше, чем в группе сравнения, их значения свидетельствовали о наличии инсулинорезистентности. При МС установлено изменение профиля адипокинов (повышение лептина и соотношения лептин/адипонектин и снижение адипонектина), а также повышение значения индекса VAI, отражающего дисфункцию висцеральной жировой ткани.

Анализ уровня цитокинов выявил у пациентов с МС повышение концентрации IL-6, IL-10 и MCP-1 (табл. 2), а также снижение уровня IL-2, IL-4, IFN γ относительно группы сравнения. Содержание цитокинов IL-1 β , IL-8, IFN α и TNF α не имело статистически значимых межгрупповых различий.

Нами были проанализированы взаимосвязи между уровнем цитокинов и описанными выше биохимическими показателями при МС (табл. 3).

Установлены ассоциации уровня про- и противовоспалительных цитокинов с компонентами МС, маркерами инсулинорезистентности и дисфункции висцеральной жировой ткани. Противовоспалительный цитокин IL-4 имел положительную корреляцию с ХсЛПВП и отрицательную взаимосвязь с содержанием лептина и наличием у пациентов артериальной гипертензии. Повышенный уровень IL-6 при МС был по-

ложительно взаимосвязан с гликозилированным гемоглобином. Содержание IFN γ коррелировало с показателями липидного обмена ХсЛПНП (положительная связь) и ХсЛПВП (отрицательная связь); лептином (отрицательная связь). Были определены положительные корреляционные связи МСР-1 с уровнем глюкозы, триглицеридов, маркерами инсулинорезистентности Тг/ХсЛПВП

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА, ИНДЕКСЫ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И ДИСФУНКЦИИ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ, КОНЦЕНТРАЦИЯ АДИПОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF LIPID AND CARBOHYDRATES METABOLISM, INDEXES OF INSULIN RESISTANCE AND VISCERAL ADIPOSE TISSUE DYSFUNCTION, CONCENTRATIONS OF ADIPOKINES IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Characteristics	Группа сравнения Comparison group (n = 71)	МС MS (n = 78)	p
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	5,0 (4,7-5,4)	5,7 (5,3-6,0)	p < 0,001
НbA1C, %	4,2 (3,9-4,4)	4,9 (4,5-5,4)	p < 0,001
Инсулин, мкМЕ/мл Insulin, mcU/mL	9,4 (6,9-27,0)	15,5 (10,0-26,1)	p = 0,033
Общий холестерин, ммоль/л Total cholesterol, mmol/L	4,4 (4,1-4,8)	5,9 (5,0-6,5)	p < 0,001
Холестерин ЛПВП, ммоль/л Cholesterol HDL, mmol/L	1,9 (1,4-2,3)	1,2 (0,9-1,6)	p < 0,001
Холестерин ЛПНП, ммоль/л Cholesterol LDL, mmol/L	2,1 (1,8-2,6)	3,8 (3,2-4,3)	p < 0,001
Триглицериды, моль/л Triglyceride, mmol/L	0,7 (0,5-1,0)	1,8 (1,2-2,6)	p < 0,001
НОМА-IR	2,1 (1,6-6,0)	4,3 (2,4-7,1)	p = 0,009
Тг/ХсЛПВП Tg/HDL	0,38 (0,27-0,60)	1,38 (1,00-2,09)	p < 0,001
ТyG	4,38 (4,19-4,49)	4,85 (4,61-5,02)	p < 0,001
VAI	0,62 (0,39-0,92)	2,33 (1,45-3,49)	p < 0,001
Лептин, нг/мл Leptin, ng/mL	9,15 (5,10-15,10)	32,80 (11,90-61,90)	p < 0,001
Адипонектин, мкг/мл Adiponectin, mcg/mL	8,6 (7,1-12,6)	7,0 (5,3-9,1)	p = 0,002
Лептин / адипонектин, нг/мкг Leptin / adiponectin, ng/mcg	0,96 (0,48-1,56)	4,05 (1,65-8,78)	p < 0,001

Примечание. НОМА-IR = Глюкоза (ммоль/л) × Инсулин (мкМЕ/мл) / 22,5.

ТyG = Ln [Триглицериды (мг/дл) × Глюкоза (мг/дл) / 2].

VAI мужчины = (ОТ/39,68 + (1,88 × ИМТ)) × Тг/1,03 × 1,31/ХсЛПВП.

VAI женщины = (ОТ/36,58 + (1,89 × ИМТ)) × Тг/0,81 × 1,52/ХсЛПВП.

Note. HOMA-IR = Glucose (mmol/L) × Insulin (mcU/mL) / 22.5.

TyG = Ln [Triglyceride (mg/dL) × Glucose (mg/gL) / 2].

VAI men = (WC/39.68 + (1.88 × BMI)) × Tg/1.03 × 1.31/HDL.

VAI women = (WC/36.58 + (1.89 × BMI)) × Tg/0.81 × 1.52/HDL.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CONCENTRATIONS OF CYTOKINES IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель, пг/мл Characteristics, pg/mL	Группа сравнения Comparison group (n = 71)	МС MS (n = 78)	р
IL-1 β	3,0 (2,2-4,3)	3,2 (2,2-5,3)	н/з
IL-2	9,8 (8,6-10,2)	4,2 (3,8-8,5)	p < 0,0001
IL-4	2,9 (2,7-3,1)	0,9 (0,7-2,8)	p < 0,0001
IL-6	3,6 (2,8-4,6)	5,1 (3,2-7,1)	p = 0,012
IL-8	44,3 (23,3-95,3)	55,2 (18,4-142,0)	н/з
IL-10	4,9 (4,1-5,6)	5,7 (5,0-7,0)	p < 0,001
IFN α	12,5 (11,1-13,9)	11,2 (7,5-14,8)	н/з
IFN γ	21,9 (20,7-22,5)	5,9 (5,0-21,0)	p < 0,0001
MCP-1	139,2 (101,5-190,9)	164,3 (132,1-195,5)	p = 0,030
TNF α	5,2 (4,1-6,4)	5,4 (3,8-6,6)	н/з

Примечание. н/з – различия статистически не значимые (p > 0,05).

Note. n/s, the differences are statistically no significant (p > 0.05).

и TuG, индексом VAI, отражающим дисфункцию висцеральной жировой ткани.

По литературным данным, ожирение и МС сопровождаются повышением уровня провоспалительных цитокинов. Доказано, что IL-1 β , IL-6, TNF α синтезируются провоспалительными М1 макрофагами висцеральной жировой ткани [7].

В нашем исследовании концентрация IL-6 при МС была повышена и взаимосвязана с гликемией (уровнем гликозилированного гемоглобина). IL-6 синтезируется в макрофагах, эндотелиоцитах, Т-лимфоцитах. Под влиянием IL-6 активируется пролиферация В-лимфоцитов и белков острой фазы. Доказана роль IL-6 в развитии ангиотензин II индуцированной гипертензии [13].

У пациентов с МС было установлено повышение уровня противовоспалительного цитокина IL-10. Вероятно, данный процесс носит компенсаторный характер в ответ на рост концентрации провоспалительных цитокинов и действие других факторов, стимулирующих активацию воспаления. Так, в группе МС нами определена положительная взаимосвязь уровня IL-10 с IL-6 ($r_s = 0,59$; p = 0,026).

В литературных источниках описано повышение уровня MCP-1 при ожирении и метаболическом синдроме, что подтвердилось в нашей рабо-

те. Рост концентрации MCP-1 оказывает влияние на такие иммунные механизмы, как регуляция иммунного ответа, функциональная активность миелоидных клеток, цитотоксические свойства моноцитов и макрофагов, а также является одним из патогенетических факторов развития сердечно-сосудистых заболеваний при ожирении. Наши данные также подтвердили рост MCP-1 при МС. MCP-1 является хемокином, поддерживающим хроническое воспаление посредством привлечения в участок повреждения из периферической крови моноцитов, Т-лимфоцитов, базофилов [6]. Основным источником MCP-1 – моноциты и макрофаги, также MCP-1 синтезируется в эндотелии, фибробластах, клетках эпителия, мезангия, астроцитах, адипоцитах и других. Индукция синтеза MCP-1 происходит под действием цитокинов IL1, IL-4, IL-6, TNF α , IFN γ , PDGF, VEGF и других. Нами установлена ассоциация MCP-1 с компонентами МС – уровнем глюкозы, триглицеридов, маркерами инсулинорезистентности Тг/ЛПВП и TuG, а также с маркером дисфункции висцеральной жировой ткани VAI. В других исследованиях доказана взаимосвязь повышения содержания MCP-1 и нарушения метаболизма глюкозы [3, 11].

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИЯ ЦИТОКИНОВ С КОМПОНЕНТАМИ МС, ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ, ПРОФИЛЕМ АДИПОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ, r_s

TABLE 3. CORRELATIONS OF CYTOKINE LEVEL'S WITH METABOLIC SYNDROME COMPONENTS, INSULIN RESISTANCE, PROFILE OF ADIPOKINES IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME, r_s

Показатель Characteristics	IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/mL	MCP-1, пг/мл MCP-1, pg/mL
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	-0,04; $p = 0,764$	0,14; $p = 0,420$	0,01; $p = 0,902$	0,35; $p = 0,003$
НьА1С, %	0,51; $p = 0,056$	0,42; $p = 0,010$	0,42; $p = 0,052$	0,18; $p = 0,130$
Холестерин ЛПВП, ммоль/л HDL, mmol/L	0,67; $p < 0,0001$	0,42; $p = 0,051$	0,67; $p < 0,0001$	0,01; $p = 0,907$
Холестерин ЛПНП, ммоль/л LDL, mmol/L	-0,21; $p = 0,077$	-0,09; $p = 0,601$	-0,29; $p = 0,015$	-0,04; $p = 0,742$
Триглицериды, ммоль/л Triglyceride, mmol/L	0,35; $p = 0,053$	0,21; $p = 0,212$	0,39; $p = 0,056$	0,39; $p = 0,0007$
Тг/ХсЛПВП Tg/HDL	0,02; $p = 0,843$	0,13; $p = 0,451$	0,01; $p = 0,958$	0,28; $p = 0,023$
ТyG	0,31; $p = 0,008$	0,27; $p = 0,124$	0,34; $p = 0,054$	0,35; $p = 0,003$
VAI	-0,04; $p = 0,755$	0,15; $p = 0,399$	-0,07; $p = 0,590$	0,27; $p = 0,026$
Лептин, нг/мл Leptin, ng/mL	-0,31; $p = 0,016$	0,091; $p = 0,640$	-0,27; $p = 0,044$	0,05; $p = 0,710$
Наличие артериальной гипертензии Hypertension	-0,41; $p = 0,0004$	-0,28; $p = 0,010$	-0,25; $p = 0,054$	-0,21; $p = 0,080$

TNF α в нашей работе не имел статистически значимых межгрупповых отличий, однако при МС был взаимосвязан с уровнем гликозилированного гемоглобина. В исследованиях других авторов продемонстрировано повышение TNF α при МС [12].

IL-2 известен как аутокринный фактор роста для Т-клеток, а также фактор дифференцировки эффекторных клеток и клеток памяти. В нашем исследовании уровень IL-2 при МС был снижен относительно группы сравнения. Снижение концентрации IL-2 или нарушение его взаимодействия с рецептором проявляется численным либо функциональным дефицитом регуляторных Т-клеток, что является одним из механизмов развития аутоиммунных реакций. IL-2 одновременно участвует как в реакциях стимуляции иммунного ответа, так и в механизмах его сдерживания. Синтез IL-2 происходит в CD4-активированных лимфоцитах, NKT- и NK-лимфоцитах. Данный цитокин стимулирует синтез IFN γ посредством Т-лимфоцитов.

Нами определено снижение концентрации противовоспалительного цитокина IL-4 при МС. Снижение IL-4 при ожирении показано в работе зарубежных авторов [10]. В группе МС определе-

на ассоциация концентрации IL-4 с компонентами метаболического синдрома (ХсЛПВП, артериальная гипертензия), уровнем лептина. IL-4 является медиатором дифференцировки Th2-лимфоцитов. Установлено, что продукция IL-4 угнетается при ангиотензин II индуцированной гипертензии [13]. Также ассоциация снижения уровня IL-4 и наличия АГ может быть связана с угнетением синтеза IL-4 под влиянием высокой концентрации ионов натрия, либо со снижением экспрессии генов противовоспалительных цитокинов при гипертензии, что описано в литературе [14]. Однако в других клинических и экспериментальных работах определено повышение IL-4 при артериальной гипертензии [9].

Нами определено снижение уровня IFN γ у пациентов с МС. При МС уровень IFN γ был взаимосвязан с компонентами МС (ХсЛПВП, ХсЛПНП), лептином. IFN γ относится к интерферонам II типа и является сигнальной регуляторной молекулой, оказывающей более 100 биологических эффектов. Наиболее значимыми функциями IFN γ являются противовирусная, противоопухолевая и иммуномодулирующая активность, которые реализуются посредством стимуляции антителообразования, фагоцито-

за, активации НК-клеток, усиления экспрессии МНС II, индукции дифференцировки Т-цитотоксических лимфоцитов и повышения экспрессии Th1-лимфоцитов, блокирования Т-супрессорного звена. Секретция $IFN\gamma$ происходит преимущественно в Т-клетках [13]. Обнаруженное нами снижение концентрации $IFN\gamma$, ве-

роятно, можно рассматривать в качестве маркера иммунодефицитного состояния при МС.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об участии системы цитокинов в формировании патологии висцеральной жировой ткани и развитии метаболического синдрома.

Список литературы / References

1. Blaszcak A.M., Jalilvand A., Hsueh W.A. Adipocytes, innate immunity and obesity: a mini-review. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 650768. doi:10.3389/fimmu.2021.650768.
2. Braune J., Weyer U., Hobusch C., Mauer J., Brüning J.C., Bechmann I., Gericke M. IL-6 regulates M2 polarization and local proliferation of adipose tissue macrophages in obesity. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, no. 7, pp. 2937-2934.
3. Dommel S., Blüher M. Does C-C motif Chemokine Ligand 2 (CCL2) link obesity to a pro-inflammatory state? *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 3, 1500. doi: 10.3390/ijms22031500.
4. Formanowicz D., Rybarczyk A., Radom M., Formanowicz P. A role of inflammation and immunity in essential hypertension — modeled and analyzed using Petri nets. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 9, 3348. doi: 10.3390/ijms21093348.
5. Fu S., Yao Y., Lv F., Zhang F., Zhao Y., Luan F. Associations of immunological factors with metabolic syndrome and its characteristic elements in Chinese centenarians. *J. Transl. Med.*, 2018, Vol. 16, 315. doi: 10.1186/s12967-018-1691-4.
6. Hammarstedt A., Gogg S., Hedjazifar S., Nerstedt A., Smith U. Impaired adipogenesis and dysfunctional adipose tissue in human hypertrophic obesity. *Physiol. Rev.*, 2018, Vol. 98, no. 4, pp. 1911-1941.
7. Hubler M.J., Kennedy A.J. Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells. *J. Nutr. Biochem.*, 2016, Vol. 34, pp. 1-7.
8. Janowska J., Chudek J., Olszanecka-Glinianowicz M., Semik-Grabarczyk E., Zahorska-Markiewicz B. Interdependencies among selected pro-inflammatory markers of endothelial dysfunction, C-peptide, anti-inflammatory interleukin-10 and glucose metabolism disturbance in obese women. *Int. J. Med. Sci.*, 2016, Vol. 13, no. 7, pp. 490-499.
9. Kassem K.M., Ali M., Rhaleb N.-E. Interleukin 4: its role in hypertension, atherosclerosis, valvular, and nonvalvular cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, 2020, Vol. 25, no. 1, pp. 7-14.
10. Lin S.-Y., Yang C.-P., Wang Y.-Y., Hsiao C.-W., Chen W.-Y., Liao S.-L., Lo Y.-L., Chang Y.-H., Hong C.-J., Chen C.-J. Interleukin-4 improves metabolic abnormalities in leptin-deficient and high-fat diet mice. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, 4451. doi: 10.3390/ijms21124451.
11. Liu N., Sheng J., Wang Y. Effect of stress hyperglycaemia on monocyte chemoattractant protein-1 levels and the short-term prognosis of patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Exp. Ther. Med.*, 2019, Vol. 17, no. 5, pp. 3823-3829.
12. Monserrat-Mesquida M., Quetglas-Llabrés M., Capó X., Bouzas C., Mateos D., Pons A., Tur J.A., Sureda A. Metabolic syndrome is associated with oxidative stress and proinflammatory state. *Antioxidants*, 2020, Vol. 9, no. 3, 236. doi: 10.3390/antiox9030236.
13. Rodriguez-Iturbe B., Pons H., Johnson R.J. Role of the immune system in hypertension. *Physiol. Rev.*, 2017, Vol. 97, no. 3, pp. 1127-1164.
14. Rucker A.J., Crowley S.D. The role of macrophages in hypertension and its complications. *Pflugers Arch.*, 2017, Vol. 469, no. 3-4, pp. 419-430.
15. Zhuang Y., Zhang J., Li Y., Gu H., Zhao J., Sun Y., Wang R., Zhang C., Chen W., Weng J., Qi L., Lu H., Zhang J., Liu Q., He Y., Xu X. B lymphocytes are predictors of insulin resistance in women with gestational diabetes mellitus. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, 2019, Vol. 19, no. 3, pp. 358-366.

Авторы:

Сумеркина В.А. — к.м.н., ведущий научный сотрудник ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

Телешева Л.Ф. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

Головнева Е.С. — д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии имени академика Ю.М. Захарова ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Sumerkina V.A., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Central Research Laboratory, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Telesheva L.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Golovneva E.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Yu. Zakharov Department of Normal Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 13.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 13.07.2022
Accepted 28.07.2022

ОСОБЕННОСТИ РЕАГИРОВАНИЯ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И ОСТРЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ ПОЧЕК ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА МЕТОДОМ АОРТОКОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ИСКУССТВЕННОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Фомина О.И.¹, Чагина Е.А.¹, Федянина Л.Н.², Красников В.Е.¹

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

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

Резюме. В XXI веке в связи с увеличением средней продолжительности жизни увеличилось число пациентов с хроническими заболеваниями. При этом сердечно-сосудистые заболевания до сих пор занимают одно из лидирующих мест в структуре заболеваемости и смертности. К сожалению, при неэффективности консервативной терапии, пациентам сердечно-сосудистого профиля показаны инвазивные методы лечения. Аортокоронарное шунтирование в условиях искусственного кровообращения является одним из самых распространенных методов лечения. Открытые операции на сердце имеют ряд потенциальных осложнений, возникающих в раннем послеоперационном периоде. Одним из часто встречающихся осложнений у пациентов кардиохирургического профиля является острое повреждение почек, которое приводит к резкому повышению продуктов азотистого обмена в сыворотке крови. Данный синдром встречается в 30% всех прооперированных случаев, а в 2% случаях требуется применение методов заместительной почечной терапии. Цель нашей работы – определить особенности реагирования факторов врожденного иммунитета на длительность искусственного кровообращения у пациентов после операций на открытом сердце. В наше исследование включены 100 пациентов после аортокоронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения в зависимости от его длительности. В результате, проанализировав данные о содержании про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови у пациентов с ОПП 1-й и 2-й стадии (KDIGO) в

Адрес для переписки:

Фомина Олеся Игоревна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный
медицинский университет»
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.
Тел.: 8 (423) 245-07-00.
E-mail: fomina.oi@mail.ru

Address for correspondence:

Fomina Olesya I.
Pacific State Medical University
690002, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakov ave., 2.
Phone: 7 (423) 245-07-00.
E-mail: fomina.oi@mail.ru

Образец цитирования:

О.И. Фомина, Е.А. Чагина, Л.Н. Федянина,
В.Е. Красников «Особенности реагирования факторов
врожденного иммунитета у пациентов с ишемической
болезнью сердца и острым повреждением почек
после операции ревааскуляризации миокарда методом
аортокоронарного шунтирования в зависимости
от длительности искусственного кровообращения»
// Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 4. С. 541-548. doi: 10.46235/1028-7221-1189-IIR
© Фомина О.И. и соавт., 2022

For citation:

O.I. Fomina, E.A. Chagina, L.N. Fedyanina, V.E. Krasnikov
“Innate immune response in the patients with heart disease
and acute kidney injury after coronary artery bypass grafting,
depending on the duration of extracorporeal circulation”,
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 541-548.
doi: 10.46235/1028-7221-1189-IIR
DOI: 10.46235/1028-7221-1189-IIR

зависимости от длительности искусственного кровообращения, мы установили, что динамика соответствовала стандартной картине изменений после аортокоронарного шунтирования, где отмечалась гиперпродукция про- и противовоспалительных цитокинов в группах, где продолжительность искусственного кровообращения была выше.

Ключевые слова: острое повреждение почек, аортокоронарное шунтирование, цитокины, врожденный иммунитет, ишемическая болезнь сердца

INNATE IMMUNE RESPONSE IN THE PATIENTS WITH HEART DISEASE AND ACUTE KIDNEY INJURY AFTER CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING, DEPENDING ON THE DURATION OF EXTRACORPOREAL CIRCULATION

Fomina O.I.^a, Chagina E.A.^a, Fedyanina L.N.^b, Krasnikov V.E.^a

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Incidence of chronic diseases is increased in the 21st century due to prolonged life expectancy. Cardiovascular disease is the most common disorder worldwide, complicated with high morbidity and mortality. Upon increased prevalence of this disease, cardiac surgery has become an essential strategy for patients that do not respond to medications and other therapeutic procedures. Some potential complications in cardiac surgery affect kidneys, lung, brain over the postoperative period. Acute kidney injury (AKI) is considered a serious complication of cardiac surgery characterized by rapid loss of kidney function leading to acute increase in the serum creatinine concentration. AKI occurs in up to 30% of patients after cardiac surgery and is observed in 2% of the cases with isolated coronary artery bypass grafting (CABG). There are literature data concerning the patients with coronary artery disease after CABG in the presence of evolving atherosclerosis. Development of inflammation and dysadaptation of innate immunity was established in this work. An imbalance in the cytokine system contributes to the progression of endothelial dysfunction and may promote development of renal injury after CABG. Hypercytokinemia in AKI patients suggests involvement of innate immunity factors in the development of acute inflammatory response. The purpose of this article was to assess the innate immune response in the patients subjected to CABG with different duration of extracorporeal circulation. In the present study, 100 patients underwent CABG, all of whom were in the on-pump group. General clinical, functional, biochemical, instrumental, immunological and statistical methods were used in the work. After analyzing the data on the content of pro- and anti-inflammatory cytokines in blood serum of the patients with stage 1 and 2 AKI (KDIGO), depending on the duration of cardiopulmonary bypass surgery, we found that their dynamics corresponded to the standard pattern of changes after CABG groups and hyperproduction of pro- and anti-inflammatory cytokines in the groups with higher duration of cardiopulmonary bypass. The pathogenetic role of pro- and anti-inflammatory mediators remains unclear. We support the view that the clinical prognosis after cardiopulmonary bypass depends on the balance of pro- and anti-inflammatory cytokines.

Keywords: acute kidney injury, coronary bypass, cytokines, innate immunity, cardiac ischemia

Введение

Острое повреждение почек (ОПП) — это синдром, который характеризуется резкой дисфункцией органа с повышением уровня сывороточного креатинина и снижением темпа диуреза [1]. У пациентов, перенесших аортокоронарное шунтирование (АКШ) в условиях искусственного кровообращения (ИК), синдром ОПП встречается

более чем в 30% всех прооперированных случаев, при этом более чем в 2% случаях требуется применение экстракорпоральных методов очистки крови — заместительной почечной терапии (ЗПТ) [12]. ОПП, развившийся после АКШ, сопряжен с неблагоприятным прогнозом в раннем послеоперационном периоде, с ухудшением прогноза и качества жизни после выписки из стационара, а также высокой летальностью [5].

Применение ИК во время операций на открытом сердце является фактором риска развития ОПП, поскольку его использование ассоциировано с развитием воспалительной реакции, почечной гипоперфузией, гипотермией, гемодилюцией, а также с отсутствием пульсирующего кровотока [14]. В настоящее время остается открытым вопрос, может ли техника проведения ИК улучшить результаты АКШ. Однако факт проведения коронарного шунтирования в условиях ИК, нежели способом «на работающем сердце» (“off pump”), достоверно увеличивает риски развития ранних послеоперационных осложнений, в том числе почечных, легочных, церебральных, но при этом не увеличивает процент смертности [15].

Изучая физиологические и патофизиологические особенности развития синдрома полиорганной недостаточности (СПОН) у кардиохирургических пациентов, в частности ОПП, острое повреждение легких (ОПЛ), шок, нельзя не упомянуть синдром системного воспалительного ответа (ССВО или SIRS), который является неспецифическим генерализованным воспалительным ответом организма на травм [7]. Факторы, которые могут влиять на частоту, тяжесть и клинический исход, усугубляющие течение периоперационного периода, у данной категории пациентов, не достаточно изучены в настоящее время. Однако с патофизиологической точки зрения — ССВО является результатом запуска воспалительного цитокинового каскада, активации системы комплемента, привлечение с инфильтрацией лейкоцитами, выделяющих вазоактивные вещества [6]. К неспецифическим активаторам воспалительной реакции также относится интраоперационная кровопотеря, переливание крови. Но в литературе встречаются данные, где обсуждается вопросы об «иммунном воспалении», о влиянии про- и противовоспалительных факторов на клиническую картину и течение SIRS, при этом баланс, уровень и характер продукции этих цитокинов после ИК может способствовать различной степени выраженности воспалительной реакции, а также определять клиническое течение после операций на открытом сердце. Наиболее значимыми механизмами SIRS традиционно принято считать «контактную активацию» иммунной системы при взаимодействии крови с поверхностью аппарата искусственного кровообращения, а восстановление перфузии после снятия зажима с аорты напрямую связано с активацией ключевых показателей воспалительной реакции [8]. Генерализованная иммунносупрессия, индуцированная SIRS, играет значимую роль в развитии инфекционных осложнений в послеоперационном

периоде. Однако провоспалительное состояние, SIRS могут являться лишь одним из аспектов многогранной реакции организма. Обратная реакция — синдром компенсаторной противовоспалительной реакции (CARS). В совокупности SIRS и CARS представляют попытку организма восстановить гомеостаз, при этом клинически могут проявляться как провоспалительными, противовоспалительными, так и смешанными реакциями [7]. В литературе остается недостаточно исследований посвященных изучению динамики маркеров воспаления в сыворотке крови у пациентов после АКШ, перенесших операцию в условиях ИК, в зависимости от длительности экстракорпорального кровообращения и развития мультиорганных поражений, в частности ОПП [2]. Таким образом, целью данного исследования было изучить динамику факторов врожденного иммунитета у пациентов с ОПП после реваскуляризации миокарда методом АКШ, выполненную в условиях искусственного кровообращения, в зависимости от времени ИК.

Материалы и методы

В наше исследование включены 100 пациентов с ИБС до операции АКШ и в динамике после вмешательства с осложненным и гладким течением послеоперационного периода. К критериям включения относились пациенты с ИБС обоего пола в возрасте 45-74 лет и с подтвержденным по клинико-лабораторным данным острым повреждением почек. К критериям исключения относили пациентов с ИБС и ХБП С4-5 обоего пола или с терминальной почечной недостаточностью, проходящие программный гемодиализ, и проведением заместительной почечной терапии после реваскуляризации миокарда методом аортокоронарного шунтирования. Клинические и лабораторные данные пациентов кардиохирургического профиля после АКШ получены на базе Медицинский центр ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» за период с 2016 по 2020 годы. Исследование иммунологических показателей проводилось на базе научно-исследовательской лаборатории патофизиологии кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России и Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России. Все клинические и лабораторные исследования с участием пациентов были выполнены после получения положительного решения и соответствовали основным этическим требованиям

Междисциплинарного комитета по биомедицинской этике ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (протокол № 4, от 26.12.2016 г.). Все пациенты подписали информированное согласие для участия в исследовании. Пациенты были ретроспективно распределены на группы в зависимости от течения раннего послеоперационного периода после АКШ, в зависимости от стадии ОПП (согласно критериям KDIGO) и в зависимости от длительности ИК (менее 90 минут (1) и более 90 минут (2)). Операции на сердце проводились в условиях комбинированной эндотрахеальной анестезии. ИК проводили аппаратом Stockert, с использованием мембранных оксигенаторов Terumo CAPiox FX. Всем пациентам выполняли операции реваскуляризации миокарда методом АКШ с использованием антеградной кровяной кардиopleгии. ИК осуществлялось в условиях нормотермии (ректальная температура 35-37 °С). Отключение от аппарата ИК осуществляли после восстановления адекватного самостоятельного кровообращения. После окончания операции пациенты были переведены в отделение ОАРИТ на ИВЛ, экстубация трахеи, а перевод на самостоятельную вентиляцию легких (СВЛ) в плановом порядке проводился в течение 8 ± 2 часов. Всем пациентам после АКШ был выполнен клиническо-лабораторный минимум, контроль КЩС, тромбоэластография, Риссо-мониторинг, ЭКГ, Эхо КГ в динамике. Среднее нахождение пациентов в условиях ОАРИТ, включенных в исследование, составляло $2,1 \pm 0,7$ суток. Забор материала проводился: перед операцией, на 1-е сутки, 2-е сутки, на 7-е сутки после оперативного вмешательства. У здоровых добровольцев — однократно. Определение уровней цитокинов в сыворотке крови IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , TGF- β 1 производился методом сэндвич-варианта твердофазного ИФА с использованием реактивов R&D Diagnostic Inc (США). Для анализа были использованы непараметрические методы статистической обработки.

Результаты и обсуждение

Цитокины представляют из себя растворимые белки и полипептиды, продуцируются большим количеством различных клеток, включая активированные моноциты, лимфоциты и макрофаги и эндотелиальные клетки. Некоторые цитокины могут оказывать как про-, так и противовоспалительный эффект. Они необходимы для поддержания как иммунного, физиологического гомеостаза и в норме подлежат жесткому гомеостатическому контролю, вырабатываются в ответ на различные физиологические и патологические стимулы.

Проанализировав данные о содержании про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови у пациентов с ОПП 1-й и 2-й стадии (KDIGO) в зависимости от длительности искусственного кровообращения, мы установили, что динамика соответствовала стандартной картине изменений после АКШ (табл. 1, 2). При оценке уровня провоспалительных цитокинов: IL-1 β , IL-6, IL-8 в сыворотке крови у пациентов в группах Ia и Ib, не определено достоверной разницы в зависимости от продолжительности ИК ($p > 0,05$) (табл. 1). Но задокументированы изменения сывороточного содержания TNF α у пациентов группы с ОПП 1-й и 2-й стадии и группы с гладким течением на 1-е и 2-е сутки после АКШ, при этом его уровень был выше, где время ИК превышало 90 минут ($p < 0,05$).

Провоспалительные цитокины играют ключевую роль в стимуляции воспалительного процесса, при этом высокие концентрации в сыворотке крови таких цитокинов, как IL-1 β , IL-6 определяют неблагоприятный исход у пациентов в критическом состоянии [9]. Воспалительный ответ на ИК характеризуется состоянием распространенной эндотелиальной активацией и эндотелиальной дисфункцией. Медиаторы воспаления, IL-1 β и TNF α , связываются с специфическими рецепторами на эндотелии, инициируя различные пути передачи сигнала, активируя NF- κ B [3]. Активированные эндотелиальные клетки играют ключевую роль в регуляции воспалительной и коагуляционной систем, экспрессируя белки, играющие центральную роль в активации воспаления. Воспалительная реакция лежит в основе развития сердечно-сосудистой недостаточности у пациентов после АКШ в условиях ИК [4]. Нестабильность гемодинамики во время операции может быть результатом гиперпродукции провоспалительных цитокинов (IL-6) [11]. В литературе описаны данные о вовлеченности IL-1 β , IL-6, TNF α в резистентность кардиомиоцитов к адренергической стимуляции после ИК [13]. TNF α является мощным провоспалительным цитокином, продуцируемым моноцитами и макрофагами, а также В-, Т-клетками и фибробластами. Миокард, подвергнутый синдрому ишемии-реперфузии во время АКШ является основным источником продукции этого цитокина, особенно при дисфункции левого желудочка. Системный выброс TNF α ограничен во время пережатия аорты, но становится более выраженным после снятия зажима с аорты, а пиковые концентрации достигают своих значений в первые 24-48 часов [10].

При изучении особенностей содержания про- и противовоспалительных цитокинов мы установили,

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИБС С РАЗЛИЧНЫМ ТЕЧЕНИЕМ ДО И ПОСЛЕ АКШ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВРЕМЕНИ ИСКУССТВЕННОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONTENT OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE WITH DIFFERENT COURSE BEFORE AND AFTER CABG, DEPENDING ON THE TIME OF CARDIOPULMONARY BYPASS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели, пг/мл Parameters, pg/mL	Пациенты с ИБС и ОПП после АКШ I группа Group I – CABG and AKI n = 53				Пациенты с ИБС без ОПП после АКШ II группа Group II – CABG and AKI n = 47	
	Пациенты с ИБС и ОПП 1-й стадии (KDIGO) Ia группа Group Ia – CABG and AKI 1 stage n = 30		Пациенты с ИБС и ОПП 2-й стадии (KDIGO) Ib группа Group Ib – CABG and AKI 2 stage n = 23			
	ИК < 90 мин Cardiopulmonary bypass < 90 min n = 22 (1)	ИК > 90 мин Cardiopulmonary bypass > 90 min n = 8 (2)	ИК < 90 мин Cardiopulmonary bypass < 90 min n = 18 (3)	ИК > 90 мин Cardiopulmonary bypass > 90 min n = 5 (4)	ИК < 90 мин Cardiopulmonary bypass < 90 min n = 39 (5)	ИК > 90 мин Cardiopulmonary bypass > 90 min n = 8 (6)
IL-1β до операции IL-1β before surgery	1,76 (1,09-2,93)	1,65 (0,97-2,95)	1,2 (1,12-3,23)	1,1 (0,85-2,64)	1,43 (0,68-3,10)	1,66 (0,65-2,73)
1-е сутки 1 st after surgery	2,13 (0,95-3,20)	1,86 (1,27-2,96) [§]	2,11 (1,63-2,95) ^{§§}	1,98 (1,38-3,85)	1,67 (0,84-2,80)	1,81 (1,10-3,13)
2-е сутки 2 nd after surgery	1,55 (0,88-2,18)	1,76 (1,54-2,27)	1,72 (1,29-2,63)	1,54 (1,06-2,30)	1,17 (0,83-1,83)	1,25 (1,12-2,62)
7-е сутки 7 th after surgery	2,14 (1,99-2,42) ⁷	1,94 (1,39-2,16) [§]	1,44 (1,17-1,83) ^{§§ 7}	1,22 (0,74-1,55)	2,18 (1,24-2,54) ⁷	2,31 (1,43-3,01)
TNFα до операции TNFα before surgery	19,76 (15,31-35,50)	20,07 (17,48-43,08) [§]	25,02 (13,11-38,37) ^{§§}	21,07 (12,78-41,59)	11,13 (8,47-18,43)	10,48 (7,49-20,15)
1-е сутки 1 st after surgery	32,17 (21,85-51,43) [§]	43,1 (17,04-45,23) [§]	38,35 (20,04-46,54) ^{§§}	49,74 (31,42-57,21)	32,51 (24,63-39,23) [§]	34,58 (21,37-45,79)
2-е сутки 2 nd after surgery	17,45 (13,40-26,43) [§]	18,49 (13,58-31,43) [§]	14,75 (12,58-20,53) ^{§§}	21,52 (15,73-28,40)	10,12 (4,35-9,25) [§]	9,01 (7,1-13,9)
7-е сутки 7 th after surgery	31,3 (16,48-63,28) ⁷	41,42 (16,51-57,38) [§]	51,5 (21,38-74,12) ^{§§ 7}	55,43 (35,47-70,12)	15,37 (8,36-31,38) ⁷	14,89 (11,2-27,87)
IL-6 до операции IL-6 before surgery	1,76 (1,10-5,65)	1,81 (0,98-6,02)	1,67 (1,03-4,25)	1,73 (2,10-3,99)	3,2 (1,25-5,78)	2,88 (0,95-6,28)
1-е сутки 1 st after surgery	30,46 (16,07-85,39) [§]	28,48 (15,79-91,10)	34,76 (10,30-73,48) ^{§§}	41,39 (19,30-88,39)	36,28 (23,74-75,29)	44,72 (26,84-85,18)
2-е сутки 2 nd after surgery	5,89 (3,32-17,58)	7 (4,31-16,37) [§]	8,38 (4,28-18,49) ^{§§}	7,21 (7,39-17,83)	7,29 (5,11-15,39)	8,34 (3,91-13,82)

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатели, пг/мл Parameters, pg/mL	Пациенты с ИБС и ОПП после АКШ I группа Group I – CABG and AKI n = 53				Пациенты с ИБС без ОПП после АКШ II группа Group II – CABG and AKI n = 47	
	Пациенты с ИБС и ОПП 1-й стадии (KDIGO) Ia группа Group Ia – CABG and AKI 1 stage n = 30		Пациенты с ИБС и ОПП 2-й стадии (KDIGO) Ib группа Group Ib – CABG and AKI 2 stage n = 23			
	ИК < 90 мин Cardiopulmonary bypass < 90 min n = 22 (1)	ИК > 90 мин Cardiopulmonary bypass > 90 min n = 8 (2)	ИК < 90 мин Cardiopulmonary bypass < 90 min n = 18 (3)	ИК > 90 мин Cardiopulmonary bypass > 90 min n = 5 (4)	ИК < 90 мин Cardiopulmonary bypass < 90 min n = 39 (5)	ИК > 90 мин Cardiopulmonary bypass > 90 min n = 8 (6)
7е сутки 7 th after surgery	5,9 (3,74-13,97) ⁷	3,9 (1,93-13,02)	2,25 (1,74-10,45) ⁷	2,95 (1,59-14,90)	2,85 (1,50-10,74)	4,25 (2,05-10,90)
IL-8 до операции IL-8 before surgery	6,37 (4,38-10,11) [§]	5,28 (3,99-9,10)	4,57 (2,48-9,06) ^{§§}	3,97 (2,49-8,94)	5,38 (2,15-15,89)	8,02 (3,28-12,96)
1-е сутки 1 st after surgery	11,84 (6,99-21,73) [§]	13,89 (8,28-23,03)	12,9 (6,58-25,38) ^{§§}	10,49 (7,49-26,90)	15,29 (10,39-31,49)	13,28 (9,21-27,22)
2-е сутки 2 nd after surgery	6,83 (4,93-12,39)	7,29 (5,29-11,37)	7,37 (5,31-12,48)	8,9 (6,79-14,39)	5,12 (2,69-12,37)	4,45 (3,5-11,74)
7-е сутки 7 th after surgery	9,29 (5,01-17,49) ⁷	11,38 (6,1-18,7)	9,37 (5,28-17,29) ⁷	7,17 (4,25-15,04)	13,38 (4,79-19,02) ⁷	14,39 (5,52-18,10)

Примечание. Статистическая достоверность различий показателей между Ia и II группами: [§] – $p < 0,05$; Ib и II группами: ^{§§} – $p < 0,05$. Статистическая достоверность различий показателей в каждой исследуемой подгруппе 1 и 2; 3 и 4: [§] – $p < 0,05$. Статистическая достоверность различий показателей в динамике: ⁷ (1-7-е сутки) $< 0,05$.

Note. The statistical significance of the differences $p < 0.05$ in the dynamics in the groups Ia and II: [§], $p < 0.05$; Ib and II: ^{§§}, $p < 0.05$. The statistical significance of the differences $p < 0.05$ in the dynamics in the groups 1 and 2; 3 and 4: [§], $p < 0.05$. The statistical significance of the differences $p < 0.05$ in the dynamics in the groups: ⁷ (1-7).

что уровень IL-10 в сыворотке крови также был более высоким в подгруппах с ОПП 1-й и 2-й стадии, а также в подгруппе с гладким течением, где ИК было более 90 минут на 1-е и 2-е сутки после реваскуляризации миокарда ($p < 0,05$) (табл. 2). Значимых изменений в содержании в сыворотке крови в группах Ia и Ib в зависимости от продолжительности искусственного кровообращения не было определено ($p > 0,05$) (табл. 2). Провоспалительный ответ на операционный стресс уравновешивался противовоспалительным цитокиновым ответом. IL-10 является ключевым противовоспалительным цитокином является IL-10, он служит мощным ингибитором продукции IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α [10].

Заключение

В группе с ОПП 2-й стадии (KDIGO) регистрировалось более высокое содержание IL-10 до операции и на 1-е сутки ($p < 0,05$) и высокая концентрация TNF α на протяжении всей динамики ($p < 0,05$). Установлена сопряженность между более высоким уровнем TNF α , IL-10 в группах с ОПП 1-й и 2-й стадии по KDIGO и длительностью ИК свыше 90 минут и риском более тяжелого течения послеоперационного течения на 1-е, 2-е, 7-е сутки ($p < 0,05$).

Патогенетическая роль противовоспалительных медиаторов остается не доказанной. Мы поддерживаем мнение, что клинический прогноз после искусственного кровообращения зависит от баланса про- и противовоспалительных цитокинов.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИБС С РАЗЛИЧНЫМ ТЕЧЕНИЕМ ДО И ПОСЛЕ АКШ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВРЕМЕНИ ИСКУССТВЕННОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CONTENT OF ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE WITH DIFFERENT COURSE BEFORE AND AFTER CABG, DEPENDING ON THE TIME OF CARDIOPULMONARY BYPASS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели, пг/мл Parameters, pg/mL	Пациенты с ИБС и ОПП после АКШ I группа Group I – CABG and AKI n = 53				Пациенты с ИБС без ОПП после АКШ II группа Group II – CABG and AKI n = 47	
	Пациенты с ИБС и ОПП 1-й стадии (KDIGO) Ia группа Group Ia – CABG and AKI 1 stage n = 30		Пациенты с ИБС и ОПП 2-й стадии (KDIGO) Ib группа Group Ib – CABG and AKI 2 stage n = 23		ИК < 90 мин Cardiopulmonary by- pass < 90 min n = 39 (5)	ИК > 90 мин Cardiopulmonary by- pass > 90 min n = 8 (6)
	ИК < 90 мин Cardiopulmonary by- pass < 90 min n = 22 (1)	ИК > 90 мин Cardiopulmonary by- pass > 90 min n = 8 (2)	ИК < 90 мин Cardiopulmonary by- pass < 90 min n = 18 (3)	ИК > 90 мин Cardiopulmonary by- pass > 90 min n = 5 (4)		
IL-10 до операции IL-10 before surgery	7,36 (1,99-10,11) [§]	7,15 (2,48-11,30)	9,28 (5,01-10,72) ^{§§}	8,42 (4,27-11,59)	4,26 (1,50-11,34)	3,79 (2,77-10,04)
1-е сутки 1st after surgery	378,21 (281,28- 527,79) ^{§&}	469,14 (301,52- 620,24)	402,5 (299,52- 581,38) ^{§§&}	490,26 (375,29- 720,43)	304,79 (200,34- 529,49) ^{&}	451,82 (361,90- 603,73)
2-е сутки 2nd after surgery	20,28 (15,21-25,35) ^{&}	29,48 (17,31-31,72) [§]	26,52 (19,35-55,28) ^{§§&}	36,02 (35,76-66,52)	22,39 (13,40-30,39)	20,79 (13,45-27,49)
7-е сутки 7th after surgery	9,36 (6,03-21,30) ^{§7}	12,95 (7,92-30,01)	9,23 (5,97-22,34) ^{§§7}	9,36 (6,90-25,45)	3,39 (2,36-12,54) ⁷	3,29 (1,94-11,39)
TGF-β1 до операции TGF-β1 before surgery	25,28 (14,29-30,18) [§]	19,49 (10,35-28,48)	22,71 (17,06-37,38) ^{§§}	25,31 (15,36-36,28)	21,59 (10,47-30,41)	19,73 (8,05-29,49)
1-е сутки 1st after surgery	16,49 (13,31-32,29) [§]	15,81 (10,49-24,79)	17,59 (15,29-30,20) ^{§§}	19,63 (11,27-28,37)	29,37 (10,95-35,10)	32,48 (13,7-37,5)
2-е сутки 2nd after surgery	19,37 (13,38-37,29)	12,24 (10,28-32,9)	19,24 (11,39-30,49)	22,08 (10,25-31,46)	19,73 (7,38-31,48)	7,38 (3,48-31,38)
7-е сутки 7th after surgery	34,37 (23,31-39,60) ⁷	30,95 (28,75-43,09)	29,38 (23,34-44,79) ⁷	31,38 (25,38-43,36)	37,48 (25,49-47,29) ⁷	34,53 (25,39-48,70)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Благодарности

Авторы выражают признательность ректору ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России Шуматову Валентину Борисовичу, проректору по медицинским вопросам ФГАОУ ВО ДВФУ Пак Олегу

Игоревичу, руководителю кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России Маркеловой Елене Владимировне, а также благодарности всем пациентам, принявшим участие в исследовании.

Список литературы / References

1. Filardo G., Hamman B.L., Graca B. Efficacy and effectiveness of on-versus off-pump coronary artery bypass grafting: a meta-analysis of mortality and survival. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2018, Vol. 155, no. 1, pp. 172-179.
2. Gu Y.J., Mariani M.A., Oeveren W., Grandjean J.G., Boonstra P.W. Reduction of the inflammatory response in patients undergoing minimally invasive coronary artery bypass grafting. *Ann. Thorac. Surg.*, 1998, Vol. 65, no. 2, pp. 420-444.
3. Guven G., Hilty M.P., Ince C. Microcirculation: physiology, pathophysiology, and clinical application. *Blood Purif.*, 2020, Vol. 49, no. 1-2, pp. 143-150.
4. Journois D., Israel-Biet D., Pouard P., Rolland B., Silvester W., Vouhe P., Safran D. High volume, zero balanced hemofiltration to reduce delayed inflammatory response to cardiopulmonary bypass in children. *Anesthesiology*, 1996, Vol. 85, no. 5, pp. 965-976.
5. Kellum J.A., Lameire N. KDIGO AKI Guideline Work Group. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). *Crit. Care.*, 2013, Vol. 17, no. 1, 204. doi: 10.1186/cc11454.
6. Laffey J.G., Boylan J.F., Cheng D. The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology*, 2002, Vol. 97, no. 1, pp. 215-252.
7. Lannemyr L., Bragadottir G., Krumbholz V. Effects of cardiopulmonary bypass on renal perfusion, filtration, and oxygenation in patients undergoing cardiac surgery. *Anesthesiology*, 2017, Vol. 126, no. 2, pp. 205-213.
8. Massoudy P., Zahler S., Tassani P., Becker B.F., Richter J.A., Pfaunder M., Lange R., Meisner H. Reduction of pro-inflammatory cytokine levels and cellular adhesion in CABG procedures with separated pulmonary and systemic extracorporeal circulation without an oxygenator. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2000, Vol. 17, no. 16, pp. 729-736.
9. Meduri G.U., Headley S., Kohler G., Stentz F. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. *Chest*, 1995, Vol. 107, no. 4, pp. 1062-1073.
10. Oddis C.V., Finkel M.S. Cytokines and nitric oxide synthase inhibitor as mediators of adrenergic refractoriness in cardiac myocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 1997, Vol. 320, no. 2-3, pp. 167-174.
11. Ronco C., Bellomo R., Kellum J.A. Acute kidney injury. *Lancet*, 2019, Vol. 394, no. 10212, pp. 1949-1964.
12. Rosner M.H., Okusa M.D. Acute kidney injury associated with cardiac surgery. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2006, Vol. 1, no. 1, pp. 19-32.
13. Roytblat L., Talmor D., Rachinsky M., Ketamine attenuates the interleukin-6 response after cardiopulmonary bypass. *Anesth. Analg.*, 1998, Vol. 87, no. 2, pp. 266-271.
14. Wang X., Zhu Y., Chen W. The impact of mild renal dysfunction on isolated cardiopulmonary coronary artery bypass grafting: a retrospective propensity score matching analysis. *J. Cardiothorac. Surg.*, 2019, Vol. 14, no. 1, 191. doi: 10.1186/s13019-019-0998-4.
15. Zakkar M., Angelini G.D. Preoperative renal impairment and off-pump coronary artery bypass grafting: the jury is still out. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2018, Vol. 156, no. 3, pp. 974-985.

Авторы:

Фомина О.И. — врач — анестезиолог-реаниматолог ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», г. Владивосток, Россия

Чагина Е.А. — к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», г. Владивосток, Россия

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

Красников В.Е. — к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», г. Владивосток, Россия

Authors:

Fomina O.I., Anesthesiologist-Resuscitator, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

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

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

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

Поступила 15.07.2022

Отправлена на доработку 27.07.2022

Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022

Revision received 27.07.2022

Accepted 28.07.2022

МУКОЗАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ В ПЕРИОДЕ РЕАБИЛИТАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Хасанова А.А.¹, Костинов М.П.^{2,3}, Соловьева И.Л.¹

¹ ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

³ ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. После перенесенной коронавирусной инфекции длительно могут сохраняться разнообразные симптомы. Следовательно, важным направлением дальнейших исследований является изучение состояния и реагирования защитных иммунных механизмов в постковидном периоде. Цель исследования — оценить в динамике изменения параметров мукозального иммунитета в образцах слюны (sIgA) и назальных смывах (sIgA, лактоферрин) и эффективность применения интерферона-альфа-2b (IFN α 2b) у лиц, после перенесенной коронавирусной инфекции.

Проведено исследование пациентов в возрасте от 18 до 60 лет ($n = 130$) с давностью после перенесенной коронавирусной инфекции от 1 до 9 месяцев и условно здоровых лиц ($n = 15$). Диагностику постковидных проявлений проводили при сборе жалоб, данных анамнеза, физикального осмотра и анкетирования. Состояние мукозального иммунитета в образцах слюны и соскобов со слизистой носоглотки оценено в динамике на основании определения концентрации sIgA и лактоферрина методом иммуноферментного анализа до применения местной профилактической терапии рекомбинантным IFN α 2b и через месяц после нее (гель «ВИФЕРОН®») интраназально 2 раза в день в течение 30 дней).

В группе исследования определены симптомы постковидного синдрома: боль в суставах и мышцах, одышка, кашель, усталость и слабость, головная боль и головокружение, тревожность. В группе больных на профилактической терапии во временном интервале 1-3 месяца после коронавирусной инфекции статистически значимо отмечено повышение уровня sIgA слюны: $1,84 \pm 0,28$ до $5,78 \pm 1,96$ мг/мл. По результатам анализа соскобов со слизистой носоглотки определено достоверное повышение уровня sIgA в группе на терапии до 3 месяцев после перенесенной COVID-19 инфекции: $28,61 \pm 3,0$ до $39,83 \pm 3,85$ мг/мл. В группе больных без профилактической терапии установлено стойкое сохранение сниженных параметров мукозального иммунитета во всех временных интервалах в период реконвалесценции. У всех наблюдаемых пациентов независимо от группы выявлено снижение уровня лактоферрина в 2 раза ниже условной нормы. Статистически достоверно установлена частота возникновения респираторных вирусных инфекций в группе без профилактической терапии в 9,2% случаев.

Адрес для переписки:

Хасанова Альбина Альбертовна
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»
432049, Россия, г. Ульяновск, ул. Аблукова, 89.
Тел.: 8 (983) 169-18-54.
E-mail: albinafeizer@yandex.ru

Address for correspondence:

Khasanova Albina A.
Ulyanovsk State University
432049, Russian Federation, Ulyanovsk, Ablukov str., 89.
Phone: 7 (983) 169-18-54.
E-mail: albinafeizer@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Хасанова, М.П. Костинов, И.Л. Соловьева
«Мукозальный иммунитет в периоде реабилитации у пациентов после перенесенной коронавирусной инфекции» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 549-554.
doi: 10.46235/1028-7221-1190-MID

© Хасанова А.А. и соавт., 2022

For citation:

A.A. Khasanova, M.P. Kostinov, I.L. Soloveva "Mucosal immunity during rehabilitation in the patients after coronavirus infection", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 549-554.
doi: 10.46235/1028-7221-1190-MID

DOI: 10.46235/1028-7221-1190-MID

Пациенты, перенесшие COVID-19, имеют стойкое снижение показателей мукозального иммунитета. При применении IFN α 2b отмечена иммунологическая эффективность, что делает возможным рекомендовать его для реабилитации данной группы в периоде реконвалесценции.

Ключевые слова: IFN α 2b, COVID-19, мукозальный иммунитет, постковидный период, секреторный иммуноглобулин А, лактоферрин

MUCOSAL IMMUNITY DURING REHABILITATION IN THE PATIENTS AFTER CORONAVIRUS INFECTION

Khasanova A.A.^a, Kostinov M.P.^{b, c}, Soloveva I.L.^a

^a Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

^b I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^c I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Following the coronavirus infection, a variety of symptoms may persist for a long time. Therefore, an important area of further research is to study the state and response of protective immune mechanisms in the post-COVID period. Our aim was to evaluate the dynamics of mucosal immunity by measuring sIgA in the saliva samples and nasal swabs (sIgA, lactoferrin), as well as efficiency of interferon-alpha-2b (IFN α 2b) treatment in the patients after coronavirus infection.

A study was conducted in the patients aged 18 to 60 years (n = 130) at the terms of 1 to 9 months after a coronavirus infection. A control group consisted of conditionally healthy individuals (n = 15). Diagnosis of post-COVID manifestations was carried out by collecting complaints, anamnestic data, physical examination and questionnaire. The state of mucosal immunity in saliva samples and nasopharyngeal mucosal scrapings was evaluated in dynamics as based on determination of sIgA and lactoferrin concentrations by means of enzyme immunoassay techniques prior to administration of local preventive therapy with recombinant IFN α 2b, and 1 month after the treatment ("VIFERON"[®] gel applied intranasally twice a day for 30 days).

The following symptoms of post-COVID syndrome were documented in the study group: joint and muscular pain, shortness of breath, cough, fatigue and weakness, headache and dizziness, anxiety. In the group of patients who received preventive therapy during 1 to 3 months after coronavirus infection, a significantly increased level of saliva sIgA was noted, respectively, 1.84 ± 0.28 to 5.78 ± 1.96 mg/mL. As based on the data obtained with scrapings from nasopharyngeal mucosa, a significant increase in the level of sIgA was revealed in the group subjected to therapy up to 3 months after COVID-19 infection, i.e., from 28.61 ± 3.0 to 39.83 ± 3.85 mg/mL. In the group of patients devoid of preventive therapy, a stable maintenance of the reduced mucosal immunity parameters was found in all time intervals during the period of convalescence. In all observed patients, regardless of the group, a decreased lactoferrin level was found, being two-fold lower than the normal reference values. The incidence of respiratory viral infections in the group without preventive therapy was statistically significant, being registered in 9.2% of cases.

Patients after COVID-19 infection exhibit a persistent decrease in mucosal immunity. Immunological efficacy was observed when using IFN α 2b, thus making it possible to recommend it for rehabilitation in this group of patients over the period of convalescence.

Keywords: IFN α 2b, COVID-19, mucosal immunity, post-COVID period, secretory immunoglobulin A, lactoferrin

Введение

С конца 2019 года коронавирусная инфекция (COVID-19), вызванная вирусом SARS-CoV-2, продолжает распространяться по всему миру, представляя собой продолжающуюся пандемию. На текущий момент 2022 года более 500 миллионов человек были инфицированы во всем мире, и более 18 миллионов в России [8].

Известно, что исходы заболевания зависят от активации механизмов иммунного реагирования и после перенесенной инфекции могут сохраняться стойкие разнообразные симптомы в течение длительного времени [1, 6].

По данным литературы отмечено, что примерно через 60 дней после появления первых симптомов COVID-19 только у 13% ранее госпитализированных пациентов с COVID-19 не было

никаких симптомов, связанных с COVID-19, в то время как у 32% был один или два симптома, а у 55% – три или более [4]. Поэтому перспективным и важным направлением дальнейших исследований является изучение состояния и реагирования защитных иммунных механизмов в постковидном периоде.

Отмечена роль слизистых оболочек, как барьерной среды, в защите от инфекционных патогенов разнообразной природы. Хотя SARS-CoV-2 является респираторным вирусом, он обладает способностью поражать эпителиальные клетки вдоль всего слизистого тракта, начиная от ротовой полости до кишечника. Помимо многообразия иммунных клеток, слизистая оболочка также является богатым резервуаром плазматических клеток, которые выделяют антитела различных изотипов. Одним из таких значимых факторов является секреторный иммуноглобулин А, играющий ключевую защитную роль на поверхностях слизистых оболочек [5, 9].

Кроме гуморальной защиты следует подчеркнуть роль антимикробных пептидов, действующих на противовирусную защиту дыхательных путей. К примеру, лактоферрин – гликопротеин, который взаимодействует с иммунными клетками, действуя на врожденные и адаптивные механизмы, оказывает широкий спектр противовирусной активности как на РНК, так и на ДНК-вирусы. В результате данного взаимодействия проявляется мощный иммуномодулирующий эффект [7].

Наряду с факторами местной защиты необходимо отметить роль интерферонов, действующих как активаторы определенных клеточных белков, блокирующих процесс репликации вирусных агентов. Согласно данным о патогенезе, вирус SARS-CoV-2 ингибирует индукцию интерферонов, следовательно, возможным и необходимым вариантом терапии COVID-19 инфекции является экзогенная стимуляция данного звена. Одним

из ключевых интерферонов в терапевтической группе является рекомбинантный IFN α 2b, обладающий специфической противовирусной активностью [2, 3].

Цель настоящего исследования – оценить в динамике изменения параметров мукозального иммунитета в образцах слюны (sIgA) и назальных смывах (sIgA, лактоферрин) и эффективность применения IFN α 2b у лиц, после перенесенной коронавирусной инфекции.

Материалы и методы

Проведено исследование пациентов в возрасте от 18 до 60 лет после перенесенной коронавирусной инфекции с давностью от 1 до 9 месяцев (группа после COVID-19, n = 130, среди них женского пола – 102, мужского – 28) и условно здоровые лица без случаев данного заболевания в анамнезе (группа контроля, n = 15, женский пол – 13, мужской – 2). Средний возраст в группе пациентов после коронавирусной инфекции – 48 \pm 1,61 лет, в группе контроля – 32 \pm 5,66. Диагностику постковидных проявлений проводили при сборе жалоб, на основании данных анамнеза, физического осмотра и анкетирования.

С целью изучения особенностей мукозального иммунитета пациенты после COVID-19 были ранжированы на группы, в зависимости от проведения профилактической терапии IFN α 2b и времени, прошедшего после коронавирусной инфекции: группа на терапии (n = 65) и группа без терапии (n = 65) (табл. 1).

Для оценки состояния мукозального иммунитета осуществляли забор образцов слюны и соскобов эпителиальных клеток со слизистой носоглотки, собранные в одноразовые пробирки. Определение концентрации sIgA и лактоферрина проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа до применения местной профилактической терапии рекомбинантным

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ, ВКЛЮЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ, n (%)

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS INCLUDED IN THE STUDY, n (%)

Временной интервал после COVID-19 инфекции Time interval after COVID-19 infection	Группа на терапии Group on the therapy n = 65	Группа без терапии Group without therapy n = 65
I (1-3 месяца) I (1-3 months)	27 (41,6%)	25 (38,4%)
II (3-6 месяцев) II (3-6 months)	21 (32,3%)	24 (37%)
III (6-9 месяцев) III (6-9 months)	17 (26,1%)	16 (24,6%)

Примечание. n (%) – абсолютные и относительные показатели данных у обследованных больных.

Note. n (%), absolute and relative values of data in the examined patients.

IFN α 2b и через месяц после ее окончания. В качестве терапии использовали препарат «ВИ-ФЕРОН®» (курсовая дозировка 36000 МЕ/г), который назначался в виде геля с нанесением на поверхность слизистой оболочки носовой полости 2 раза в сутки в течение 30 дней. Исследования осуществлялись в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Забор материалов для исследования и все испытания были проведены после получения информированного письменного согласия. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет».

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica для Windows 10.0 и Microsoft Excel, 2007. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Среди всех наблюдаемых после COVID-19 ($n = 130$) определены клинические проявления, которые наиболее часто отмечались в период реконвалесценции. Как при первом визите, так и через месяц при втором посещении наиболее распространенными симптомами установлены боль в суставах и мышцах в 66,2% ($n = 86$) и 27% ($n = 35$) случаев соответственно; одышка – 66,2% ($n = 86$) и 27,7% ($n = 36$); кашель – 45,4% ($n = 59$) и 12,3% ($n = 16$); астенический синдром в виде усталости и слабости – 61,5% ($n = 80$) и 47,7% ($n = 62$); головной боли и головокружения – 42,3% ($n = 55$) и 11,5% ($n = 15$); тревожности – 37,7% ($n = 49$) и 19,2% ($n = 25$). Таким образом, тщательно собранный анамнез, физикальный осмотр и проведенное анкетирование позволили установить проявления постковидного синдрома

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ МУКОЗАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА В ГРУППАХ ИССЛЕДОВАНИЯ, мг/мл

TABLE 2. INDICATORS OF MUCOSAL IMMUNITY IN THE STUDY GROUPS, mg/mL

Параметр Parameter		Группа на терапии Group on therapy		Группа без терапии Group without therapy		Группа контроля Control group
		Исходно Before	Через 30 дней After 30 days	Исходно Before	Через 30 дней After 30 days	
sIgA слюны sIgA saliva	I	1,84±0,28	5,78±1,96*	3,080±0,735	2,36±0,56	6,45±1,81
	II	2,83±0,71	3,33±1,78	2,80±0,53	2,13±0,43	
	III	3,53±0,45	4,76±2,30	2,08±0,86	2,16±0,66	
sIgA назальный sIgA nasal	I	28,61±3,00	39,83±3,85*	28,33±2,44	15,66±1,32	13,43±3,24
	II	31,22±3,91	31,76±2,97	16,12±1,62	10,58±1,03	
	III	37,06±5,74	36,89±4,33	27,11±2,61	10,23±1,07	
Лактоферрин Lactoferrin	I	16,08±1,20	13,87±1,15	15,40±1,35	11,73±0,97	22,74±0,53
	II	23,72±1,61	10,01±1,18	17,22±1,28	9,68±0,63	
	III	23,69±1,85	13,96±1,50	14,34±1,22	9,53±1,21	

Примечание. Статистически достоверные различия в сравнении до и после профилактической терапии внутри группы: * – $p < 0,05$.

Note. Statistically significant differences in comparison before and after prophylactic therapy within the group: *, $p < 0.05$.

в период реабилитации пациентов после перенесенной инфекции.

При оценке иммунологических параметров мукозального иммунитета определены условные нормы каждого изучаемого показателя и выявлено особенности в группе на профилактической терапии и без нее в зависимости от времени после перенесенной COVID-19 инфекции (табл. 2).

Так, при исследовании sIgA в образцах слюны в группе больных на профилактической терапии во временном интервале 1-3 месяца после коронавирусной инфекции статистически значимо отмечено повышение уровня sIgA слюны в сравнении с исходным уровнем: $1,84 \pm 0,28$ и $5,78 \pm 1,96$ мг/мл соответственно, $p = 0,001$. У пациентов в отсроченный период, охватывающий от 6 до 9 месяцев после перенесенной инфекции, также находившихся на терапии, определено незначительное повышение показателей sIgA слюны, при этом достоверно значимых отличий выявлено не было.

Анализ соскобов со слизистой носоглотки показал, что лица, получавшие с профилактической целью IFN α 2b, имели достоверное повышение (практически в 1,5 раза) уровня sIgA в группе до 3 месяцев после перенесенной COVID-19 инфекции: $28,61 \pm 3,0$ и $39,83 \pm 3,85$ мг/мл соответственно, $p = 0,007$.

В группе больных без профилактической терапии аналогично была произведена оценка показателей. Установлено, что во всех временных интервалах на протяжении 9 месяцев наблюдения в период реконвалесценции после коронавирусной инфекции зарегистрировано стойко сохранение сниженных параметров мукозального иммунитета.

Характеризуя содержание уровня лактоферрина, следует отметить общую тенденцию. У всех наблю-

даемых пациентов независимо от группы выявлено снижение этого показателя в течение периода наблюдения в сравнении с исходным уровнем, что в 2 раза ниже условной нормы, без достоверных различий по группам сравнения.

При оценке возникновения частоты респираторных вирусных инфекций за время наблюдения в группе на терапии эпизодов не выявлено, тогда как в группе без терапии данный показатель достоверно определен в 9,2% случаев ($6/65$), $\chi^2 = 6,29$, $p = 0,013$.

Заключение

Особенностью периода реконвалесценции у пациентов, перенесших COVID-19, является стойкое снижение показателей мукозального иммунитета на протяжении 9 месяцев после инфекции.

Включение IFN α 2b в программу реабилитации пациентов после коронавирусной инфекции позволяет восстановить уровень sIgA в слюне и назальных смывах до нормальных значений.

Использование IFN α 2b в форме геля в курсовой дозировке 36000 МЕ/г в постковидном периоде в сроке до 9 месяцев после заболевания предупреждает развитие респираторных инфекций.

В группах сравнения у лиц, перенесших COVID-19 и не получавших профилактическую терапию, на этапе реабилитации установлено снижение параметров мукозального иммунитета, что проявилось развитием респираторных заболеваний.

Применение IFN α 2b у пациентов после коронавирусной инфекции с учетом выявленной иммунологической эффективности позволяет рекомендовать его для реабилитации данной группы в периоде реконвалесценции.

Список литературы / References

1. Костинов М.П. Иммунопатогенные свойства SARS-CoV-2 как основа для выбора патогенетической терапии // Иммунология, 2020. Т.41, № 1. С. 83-91. [Kostinov M.P. Immunopathogenic properties of SARS-COV-2 as a basis for the choice of pathogenetic therapy. *Immunologiya = Immunologiya*, 2020, Vol. 41, no. 1, pp. 83-91. (In Russ.)]
2. Костинов М.П. Основы иммунореабилитации при новой коронавирусной инфекции (COVID-19): пособие для врачей. М.: МДВ, 2020. 112 с. [Kostinov M.P. Fundamentals of immunorehabilitation in new coronavirus infection (COVID-19). The allowance for doctors]. Moscow: MDV, 2020. 112 p.
3. Костинов М.П., Свитич О.А., Маркелова Е.В. Потенциальная иммунопрофилактика COVID-19 у групп высокого риска инфицирования. Временное пособие для врачей. М.: МДВ, 2020. [Kostinov M.P., Svitich O.A., Markelova E.V. Potential COVID-19 immunization in high-risk groups. Temporary allowance for doctors]. Moscow: MDV, 2020.
4. Goërtz Y.M.J., van Herck M., Delbressine J.M., Vaes A.W., Meys R., Machado F.V.C., Houben-Wilke S., Burtin C., Posthuma R., Franssen F.M.E., van Loon N., Hajian B., Spies Y., Vijlbrief H., van 't Hul A.J., Janssen D.J.A., Spruit M.A. Persistent symptoms 3 months after a SARS-CoV-2 infection: the post-COVID-19 syndrome? *ERJ Open Res.*, 2020. Vol. 6, no. 4, 00542-2020. doi: 10.1183/23120541.00542-2020.
5. Isho B., Florescu A., Wang A.A., Gommerman J.L. Fantastic IgA plasma cells and where to find them. *Immunol. Rev.*, 2021, Vol. 303, no. 1, pp. 119-137.

6. Jung Y.H., Ha E.H., Choe K.W., Lee S., Jo D.H., Lee W.J. Persistent symptoms after acute COVID-19 infection in omicron era. *J. Korean Med. Sci.*, 2022, Vol. 37, no. 27, e213. doi: 10.3346/jkms.2022.37.e213.
7. Legrand D. Overview of lactoferrin as a natural immune modulator. *J. Pediatr.*, 2016, Vol. 173 Suppl., pp. S10-S15.
8. Rahman S., Montero M.T.V., Rowe K., Kirton R., Kunik F. Jr. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, 2021, Vol. 14, no. 5, pp. 601-621.
9. Russell M.W., Moldoveanu Z., Ogra P.L., Mestecky J. Mucosal immunity in COVID-19: A neglected but critical aspect of SARSCoV-2 infection. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 6113. doi: 10.3389/fimmu.2020.611337.

Авторы:

Хасанова А.А. — аспирант кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Костинов М.П. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий лабораторией вакцинопрофилактики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; заведующий кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Соловьева И.Л. — д.м.н., профессор кафедры педиатрии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Authors:

Khasanova A.A., Postgraduate Student, Department of Infectious Diseases, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Kostinov M.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of Russia, Head, Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Head, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, First Moscow I. Sechenov State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Soloveva I.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pediatrics, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Поступила 15.07.2022
Принята к печати 28.07.2022

Received 15.07.2022
Accepted 28.07.2022

РОЛЬ ВРОЖДЕННЫХ ОШИБОК ИММУНИТЕТА В ГРУППЕ ДЕТЕЙ С ЛЕТАЛЬНЫМИ ИСХОДАМИ НА ПЕРВОМ ГОДУ ЖИЗНИ

Черемохин Д.А.^{1,2}, Тузанкина И.А.^{2,3,4}, Черешнев В.А.^{2,3},
Болков М.А.^{2,3}, Шинвари Х.³

¹ ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр “Охрана здоровья матери и ребенка”», г. Екатеринбург, Россия

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

³ ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

⁴ ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. В современном мире врожденные ошибки иммунитета (ВОИ), или первичные иммунодефициты (ПИД), являются одной из основных причин детской инвалидности и смертности, отражающих демографическое состояние человечества не только в настоящее время, но и в перспективе. В Свердловской области за последние 5 лет детей, погибших от тяжелого комбинированного первичного иммунодефицита, было около 30%. Настоящее ретроспективное исследование посвящено изучению нозологического спектра в структуре смертности детей с иммунозависимой патологией в Свердловской области, также оценке информативности анализа внехромосомных кольцевых молекул ДНК – TREC и KREC. В пользу предполагаемого диагноза первичных иммунодефицитов выступали некоторые анамнестические данные о течении пренатального периода настоящей и предшествующих беременностей – наличие угрозы прерывания на ранних сроках, наличие случаев ранней детской смерти, персистирующие вирусные и бактериальные инфекции у матери, наличие осложнений течения беременности у матери, а также клинические проявления, включающие грибково-бактериальный сепсис, генерализованную вирусную инфекцию, нарушения репарации, сниженную физиологическую толерантность, которая сопровождается аутоиммунным поражением органов и неконтролируемым системным воспалением. Проведенное исследование продемонстрировало широкий спектр нозологических форм врожденных ошибок иммунитета в структуре ранней детской смертности, среди которых встречались как классические формы первичных иммунодефицитов, так и нозологии, не относящиеся непосредственно к врожденным ошибкам иммунитета, но в фенотипе которых наблюдается явный иммунодефицит, и их непосредственную роль в статистических девиациях. Одним из основных критериев, способных отметить возможное наличие иммунозависимой патологии в раннем неонатальном периоде, оказались маркеры наивных Т- и В-клеток (TREC и KREC соответственно), в 70% изучаемых случаев почти хотя бы один этих показателей был снижен. Важно понимать, что первичные иммунодефициты уже не на столько редкая патология, как считалось прежде, и необходимо проводить своевременную и качественную диагностику во избежание непредотвратимых летальных исходов.

Ключевые слова: первичные иммунодефициты, врожденные ошибки иммунитета, молекулярно-генетическая диагностика, ретроспективный анализ, TREC, KREC

Адрес для переписки:

Черемохин Дмитрий Андреевич
ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр “Охрана здоровья матери и ребенка”»
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Флотская, 52.
Тел.: 8 (923) 417-04-68.
E-mail: dimacheremokhin@gmail.com

Address for correspondence:

Cheremokhin Dmitrii A.
Medical Center “Health Care of Mother and Child”
620049, Russian Federation, Ekaterinburg, Flotskaya str., 52.
Phone: 7 (923) 417-04-68.
E-mail: dimacheremokhin@gmail.com

Образец цитирования:

Д.А. Черемохин, И.А. Тузанкина, В.А. Черешнев, М.А. Болков, Х. Шинвари «Роль врожденных ошибок иммунитета в группе детей с летальными исходами на первом году жизни» // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 555-560.
doi: 10.46235/1028-7221-1185-ROI

© Черемохин Д.А. и соавт., 2022

For citation:

D.A. Cheremokhin, I.A. Tuzankina, V.A. Chereshev, M.A. Bolkov, K. Shinvary “Role of innate errors of immunity in the group of children with fatal outcomes during the first year of life”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 555-560.
doi: 10.46235/1028-7221-1185-ROI

DOI: 10.46235/1028-7221-1185-ROI

ROLE OF INNATE ERRORS OF IMMUNITY IN THE GROUP OF CHILDREN WITH FATAL OUTCOMES DURING THE FIRST YEAR OF LIFE

Cheremokhin D.A.^{a, b}, Tuzankina I.A.^{b, c, d}, Chereshev V.A.^{b, c},
Bolkov M.A.^{b, c}, Shinvary K.^c

^a Medical Center "Health Care of Mother and Child", Ekaterinburg, Russian Federation

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

^c B. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

^d Sverdlovsk Regional Children Clinical Hospital, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. In the modern world, inborn errors of immunity (IEIs), or primary immunodeficiencies (PIDs), are among of the main causes of childhood disability and mortality, determining the demographic state of mankind not only at present, but also in the future. In the Sverdlovsk Region over the past 5 years, there were about 30% of children who died from severe combined primary immunodeficiency. This retrospective study is devoted to the study of the nosological profile of mortality in the children with immune-dependent disorders in the Sverdlovsk Region, as well as to assess information significance of extrachromosomal circular DNA molecules (TREC and KREC) analysis. Some anamnestic data on the course of prenatal period in the current and previous pregnancies were considered the signs of suggested diagnosis of primary immunodeficiencies, i.e., threats of pregnancy loss at the early terms, documented cases of early childhood death, persistent viral and bacterial infections in the mother, complicated course of pregnancy in the mother, as well as some clinical manifestations, including fungal-bacterial sepsis, generalized viral infection, repair disorders, reduced physiological tolerance accompanied by autoimmune organ damage and uncontrolled systemic inflammation. The study demonstrated a wide range of nosological entities of innate errors of immunity in the structure of early childhood mortality, including both classical forms of primary immunodeficiencies and the disorders not directly related to innate errors of immunity, but those showing phenotypically pronounced immunodeficiency and their immediate role in statistical deviations. Among the main criteria that may presume possible presence of an immune-dependent pathology in the early neonatal period we considered the molecular markers of naive T and B cells (TREC and KREC, respectively) revealed in 70% of the cases studied, with, at least, one of these indexes found to be reduced. It is important to understand that primary immunodeficiencies are not as rare as previously thought. Therefore, it is necessary to carry out timely and high-quality diagnostics, in order to avoid unavoidable deaths.

Keywords: primary immunodeficiency, innate errors of immunity, molecular diagnostics, retrospective analysis, TREC, KREC

Введение

Частота ПИД при правильной организации службы клинической иммунологии оказывается гораздо большей, чем это принято считать. Например, частота выявленных случаев ПИД во Франции – 1:13 000 населения (база данных ESID) [5].

Учитывая, что, по данным ведущих специалистов мира, разные формы ПИД могут встречаться у 1–2% населения [5], то надо предполагать, что большая часть пациентов продолжают наблюдаться под другими диагнозами, что приводит к удлинению времени диагностики и несвоевременности применения патогенетически обусловленной терапии, безвозвратно упускается период «окна возможностей» для сохранения качества и продолжительности жизни. При этом тяжелые формы комбинированных иммунодефицитов, при которых дети редко доживают до года, со-

ставляют значительную часть в структуре детской смертности [2, 3].

Следует особо отметить возможность выявления таких пациентов еще до манифестации болезни и появления первых клинических признаков при проведении используемого уже во всем мире неонатального тестирования на врожденные ошибки иммунитета. Учитывая столь значительную долю детей с первичными иммунодефицитами в структуре младенческой смертности и наличия на рынке РФ сертифицированных диагностических систем для исследования, важнейшей задачей на сегодняшний день является внедрение этого метода на территории всей страны. Кроме того, в регионах существуют профессиональные службы клинической иммунологии, способные реализовывать задачи диспансеризации, курирования и реабилитации детей с врожденными ошибками иммунитета. Это позволит сократить значительные экономические затра-

ты на выхаживание и медицинское обеспечение таких детей, для лечения которых используются высокотратные технологии, тем не менее не исключая летальный исход, поскольку они не являются патогенетически обоснованными.

Материалы и методы

В настоящий ретроспективный анализ включены результаты клинических и лабораторных исследований 135 детей, у которых постмортально были выявлены признаки иммунозависимой патологии. Для исследования использовалась медицинская документация: медицинская карта стационарного больного форма № 003/у, протокол патолого-анатомического вскрытия форма № 013/у, медицинская карта амбулаторного пациента форма № 025/у, выписка из амбулаторной карты форма № 027/у, медицинская карта беременной форма № 096/у, история развития новорожденного форма № 097/у, индивидуальная карта беременной и родильницы форма № 111/у.

Количественное определение маркеров наивных Т- и В-клеток – TREC и KREC, было проведено с помощью отечественной тест-системы «Иммуно-БиТ» (АБВ-тест, Россия). ДНК выделяли из образцов сухой крови детей, взятой для рутинного неонатального скрининга на 4-е сутки для доношенных новорожденных и на 7-е сутки для недоношенных.

Результаты и обсуждение

Следует обратить внимание на тот факт, что с 2015 по 2021 год среди пациентов с иммунологическими расстройствами в 135 случаев диагноз констатирован уже постмортально. Проанализировав соотношение детей с нозологическими проявлениями врожденных ошибок иммунитета относительно их гестационного возраста, получили результаты, продемонстрированные на рисунке 1.

Дети из анализируемой группы случаев летальных исходов на первом году жизни в 61%

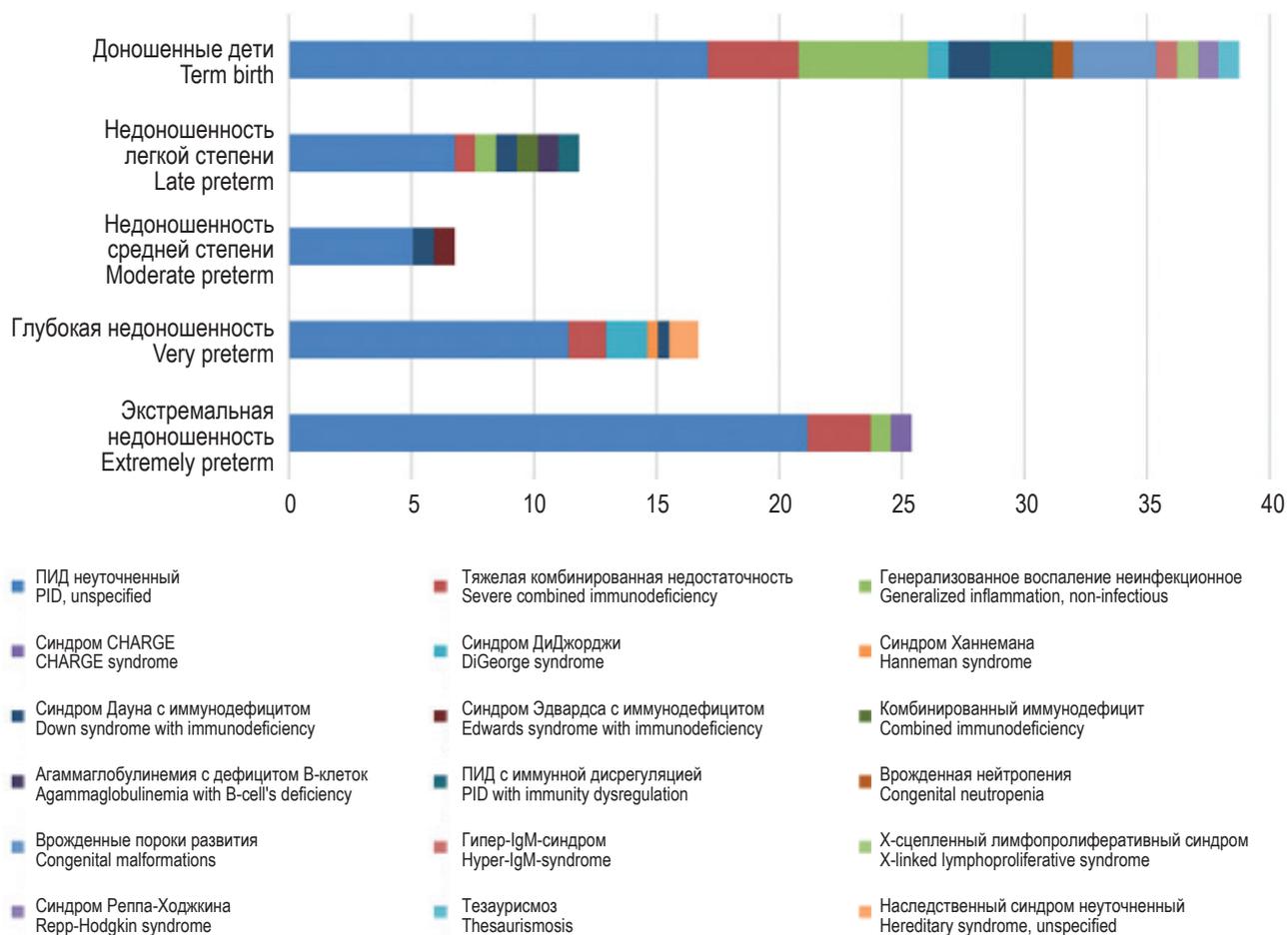


Рисунок 1. Спектр нозологических форм врожденных ошибок иммунитета в исследуемой группе детей с летальными исходами на первом году жизни относительно степени гестации

Figure 1. Spectrum of nosological forms of inborn errors of immunity in the general group of children with a fatal outcome in the first year of life in relation to the degree of gestation

родились раньше срока: с экстремально низкой массой (гестационный возраст от 22 до 28 недель гестации) – 25,4% детей, родившихся с 29 по 32 недели гестации – 16,1%, родившихся в сроке 33–35 недель гестации – 6,8%, с 36 по 38 недели гестации – 12,7% детей исследуемой группы. Также необходимо отметить, что в 31,5% случаев постмортальной диагностики выявлены структурные изменения тканей тимуса.

Данный факт отражает важность понимания того, что первично: врожденные ошибки иммунитета или незрелость систем организма.

Согласно теории эмбриогенеза, развитие одного из центральных органов иммунной системы – тимуса, претерпевает несколько критических периодов, однако одними из главных являются периоды с 4-й по 7-ю неделю, когда происходит закладка органа из мигрированных из III и IV пар жаберных карманов эпителиальных тяжей, их пролиферация и васкуляризация, с 8-й по 10-ю неделю в связи с заселением первых дифференцированных лимфоцитов CD2⁺, и с 13-й по 15-ю неделю в момент активного роста органа [6].

Вероятно, функциональная несостоятельность иммунной системы плода приводит к преждевременным родам, рассматривая данный аспект как эволюционную элиминацию организма, неспособного к продуктивной жизнедеятельности. Однако, благодаря современным техноло-

гиям и жизнесберегающим протоколам ведения таких беременностей, в настоящее время возможно выхаживать таких детей и обеспечить им качественно лучший уровень жизни.

При проведении нашего исследования также был проанализирован спектр нозологий, выявленных в группе детей с летальными исходами.

В 97% летальных случаев с экстремально низкой массой после детального изучения анамнеза жизни и заболевания постмортальной комиссией был выставлен диагноз «первичный иммунодефицит». При этом в 1 случае была яркая картина синдрома CHARGE (подтвержденного выявлением генетического дефекта), проявляющаяся многочисленными пороками развития, и 3 случая тяжелой комбинированной иммунной недостаточности, характеризовавшиеся диспластическими изменениями тимуса (микроксистоз, гипоплазия, несвоевременный жировой патоморфоз), лимфоклеточным опустошением селезенки и костного мозга, нарушениями репарации, приводящими к незаживлению послеоперационных ран. У данных детей описывались случаи бронхо-легочной дисплазии, а также высев грибковых инфекций (*Candida*), являющихся клиническими маркерами ПИД.

Среди детей, рожденных с 28 по 32 неделю гестации, наблюдался более широкий спектр заболеваний, ассоциированных с иммунодефицитом.

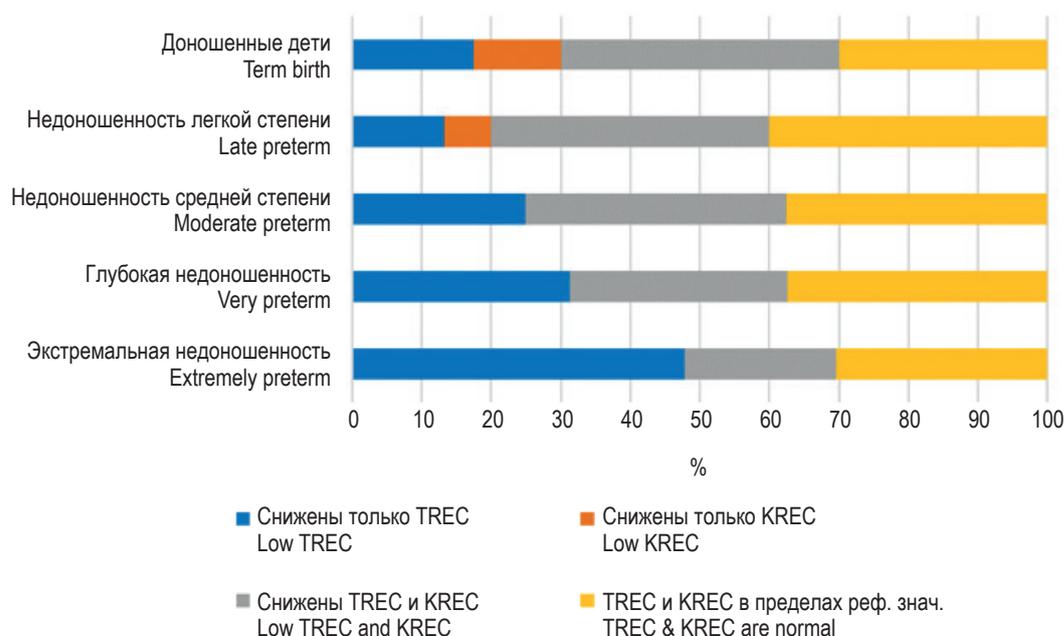


Рисунок 2. Показатели TREC и KREC в образцах крови пациентов с врожденными ошибками иммунитета относительно степени гестации

Figure 2. TREC and KREC in blood samples of patients with congenital immune errors in relation to the degree of gestation

Среди случаев летальных исходов встретилось 3 случая тяжелой комбинированной иммунной недостаточности, 2 случая синдрома ДиДжорджи, 2 случая с проявлениями первичного иммунодефицита в виде гипоплазии тимуса, 1 случай трисомии 21-й хромосомы, рассматриваемой в качестве иммунозависимой патологии с нарушением Т-клеточного звена иммунитета. А также одно из орфанных заболеваний – синдром Ханнемана, сопровождаемое врожденным пороком лимфатической системы, гипопластической дисплазией тимуса с очагами несвоевременной жировой трансформации и тотальным лимфоклеточным опустошением селезенки, относящихся к группе синдромальных ПИД, согласно классификации врожденных ошибок иммунитета IUIS 2019 [4].

В числе нозологий, встречаемых у детей, родившихся с 32-й по 35-ю недели гестации – синдром Эдвардса и синдром Дауна с тяжелым иммунодефицитом, а также 6 случаев ПИД неуточненных.

В группе пациентов, родившихся на 35-37-й неделе гестации спектр верифицированных патологий был еще шире, однако в преобладающими были неуточненные врожденные ошибки иммунитета, имевшие в симптомокомплексе убедительные признаки иммунодефицита, такие как: диспластический тимус с микрокистозными изменениями, его несвоевременный жировой патоморфоз и лимфоклеточное опустошение, анемические состояния, тромбоцитопении и генерализованные инфекционные процессы.

В самой многочисленной группе постмортальных случаев – дети, рожденные в срок 38-40 недель гестации, наблюдался самый широкий спектр нозологических форм, верификация которых была возможна, поскольку фенотипические признаки нозологических форм иммунодефицитов были достаточно выражены. Так, наблюдались следующие признаки: атрофия или дисплазия тимуса, лимфоклеточное опустошение лимфоидных органов (тимуса, селезенки, лимфоузлов), генерализованное воспаление неинфекционное или грибково-бактериальное, лимфатическая конституция, БЦЖит, гипогаммаглобулинемия, лимфопении и тромбоцитопении.

В качестве одного из подтверждающих тестов при диагностировании иммунодефицита, у этих пациентов ретроспективно были оценены клеточные параметры иммунитета посредством измерения количества молекул TREC и KREC в образцах сухой крови, взятой у них для массового неонатального скрининга (рис. 2).

Как видно из диаграммы, в 66,7% всех постмортально анализируемых случаев еще прижиз-

ненно в первые дни после рождения можно было заподозрить наличие иммунных нарушений при проведении массового неонатального скрининга. Данный факт является серьезным обоснованием необходимости скринингования новорожденных на первичные иммунодефициты, что в конечном итоге позволило бы значительно снизить младенческую смертность населения.

Однако не только данные объективной диагностики послужили поводом для верификации диагноза в постмортальных случаях. В пользу предполагаемого диагноза также выступали следующие факты, которые обнаруживались в различных комбинациях у детей исследуемой группы:

Анамнестические данные о течении антенатального периода и предшествующих беременностях

Течение беременности с угрозой прерывания на первых неделях беременности, наличие в разных поколениях случаев ранней и поздней детской смерти, инфекционные процессы бактериальной природы и персистирующие вирусные инфекционные заболевания у матери, наличие признаков патологии плода, выявленных антенатально (врожденные пороки сердца, продолжительная гипоксия), наличие осложнений беременности у матери (анемия, фетоплацентарная недостаточность, артериальная гипертензия).

Клинические данные о развитии патологии у детей

Комбинированный характер фенотипических проявлений болезней, ранняя манифестация, наличие множественных микроаномалий и пороков развития, формирование осложнений, которые связаны с нарушениями процессов репарации при оперативных вмешательствах, атипичное течение острых воспалительных процессов, что выражается неадекватным развитием каскада каталитических изменений (молниеносное течение, развитие васкулитов и геморрагических отклонений неинфекционного генеза, полнотность поражений, выраженные изменения иммунокомпетентных органов).

Заключение

Исходя из полученных данных, первичные иммунодефициты – нередкая патология, проявляющаяся характерной клиникой, зачастую развивающейся отсроченно и молниеносно. Существует множество предупреждающих знаков и методов диагностики, которые позволяют заподозрить патологию и не упустить окно возможностей для продуктивной патогенетически обоснованной терапии.

Список литературы / References

1. Медицинский портал: <https://www.immunologia.org/images/site/grupos/inmunodeficiencias/1443.pdf> (Дата обращения: 11.04.2021). Medical Portal: <https://www.immunologia.org/images/site/grupos/inmunodeficiencias/1443.pdf> (Date of application April 11, 2021).
2. Тузанкина И.А., Дерябина С.С., Болков М.А., Власова Е.В., Крохалева Я.М., Черемохин Д.А., Арипова Т.У., Мусаходжаева Д.А., Камалов З.С. Первичные иммунодефициты (врожденные ошибки иммунитета) в раннем возрасте: монография. Ташкент: Adast-poligraf, 2022. 232 с. [Tuzankina I.A., Deryabina S.S., Bolkov M.A., Vlasova E.V., Krokhalova Ya.M., Cheremokhin D.A., Aripova T.U., Musakhodzhaeva D.A., Kamalov Z.S. Primary immunodeficiency (innate errors of immunity) in early age]. Tashkent: Adast-poligraf, 2022. 232 p.
3. Щербина А.Ю. Первичные иммунодефициты – реалии XXI века // Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2016. Т. 15, № 1. С 8-9. [Shcherbina A.Yu. Primary immunodeficiencies: Realities of the 21st century. *Voprosy gematologii, onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology, Oncology and Immunopathology*, 2016, Vol. 15, no. 1, pp. 8-9. (In Russ.)]
4. Bousfiha A., Jeddane L., Picard C, al-Herz W., Ailal F., Chatila T., Cunningham-Rundles C., Etzioni A., Franco J.L., Holland S.M., Klein C., Morio T., Ochs H.D., Oksenhendler E., Puck J., Torgerson T.R., Casanova J.L., Sullivan K.E., Tangye S.G. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *J. Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 40, no. 1, pp. 66-81.
5. CEREDIH: The French PID study group. The French national registry of primary immunodeficiency diseases. *Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 135, no. 2, pp. 264-272.
6. Park J.E., Jardine L., Gottgens B., Teichmann S.A., Haniffa M. Prenatal development of human immunity. *Science*, 2020, Vol. 368, no. 6491, pp. 600-603.

Авторы:

Черемохин Д.А. – врач клинической лабораторной диагностики ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка»; аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Тузанкина И.А. – д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; ведущий научный сотрудник кафедры иммунохимии ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина»; врач – аллерголог-иммунолог научного отдела ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», г. Екатеринбург, Россия

Черешнев В.А. – д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; заведующий кафедрой иммунохимии ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Болков М.А. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; научный сотрудник кафедры иммунохимии ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Шинвари Хайбр – аспирант кафедры иммунохимии ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный университет имени Первого президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Cheremokhin D.A., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Medical Center “Health Care of Mother and Child”; Postgraduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Tuzankina I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Chief Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Leading Research Associate, Department of Immunochemistry, B. Yeltsin Ural Federal University; Allergist-Immunologist, Scientific Department, Sverdlovsk Regional Children Clinical Hospital, Ekaterinburg, Russian Federation

Chereshnev V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Scientific Director, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Department of Immunochemistry, B. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Bolkov M.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Research Associate, Department of Immunochemistry, B. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

Shinwari Khyber, Postgraduate Student, Department of Immunochemistry, B. Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ У ПАЦИЕНТОК С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ В ПЕРИОД ПРЕГРАВИДАРНОЙ ПОДГОТОВКИ

Черникова М.А.¹, Маркелова Е.В.¹, Небезкина Т.А.¹,
Матюшкина Л.С.¹, Тулупова М.С.², Кныш С.В.¹, Шевченко К.Г.³

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

² ООО «Парацельс», г. Владивосток, Россия

³ КГБУ «Надеждинская центральная районная больница», г. Владивосток, Россия

Резюме. Вирус папилломы человека является одним из самых распространенных вирусов, передающихся преимущественно половым путем. Состояние иммунной системы является основополагающим фактором исхода инфекционного процесса вирусного и бактериального генеза, которое и определяет качество прегравидарной подготовки. Цель исследования – провести комплексный анализ про- и противовоспалительных цитокинов при папилломавирусной инфекции и дать иммунологическую оценку эффективности терапии у женщин.

Проведено обследование 137 пациенток с папилломавирусной инфекцией, средний возраст пациенток $31 \pm 2,5$ лет. Исследование состояло из 2 этапов: 1-й этап – анализ особенностей гуморальных факторов врожденного иммунитета у женщин основной группы, распределенных с учетом этиологического фактора (Г-I – с папилломавирусной инфекцией (ПВИ); Г-II – с папилломавирусной и герпетической инфекцией (ПВИ + ГВИ 1/2 тип); Г-III – с папилломавирусной и хламидийной инфекцией (ПВИ + Хлам.); 2-й этап – иммунологический анализ влияния схем терапии при ПВИ (Г-IA – с папилломавирусной инфекцией (ПВИ) – Inosine pranobex (n = 11), IB – Solanum tuberosum (n = 10); Г-II A – с папилломавирусной и герпетической инфекцией (ПВИ + ГВИ 1/2 тип) – Валацикловир + Inosine pranobex (n = 24), Г-II B – Валацикловир + Solanum tuberosum (n = 23); Г-III A – с папилломавирусной и хламидийной инфекцией (ПВИ + Хлам.) – Доксициклин + Inosine pranobex (n = 20), III B – Доксициклин + Solanum tuberosum (n = 19). Определение уровней IL-17A, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13 в сыворотке крови проводили с помощью специфических реактивов фирмы R&D Diagnostics Inc. (США).

В сыворотке крови пациенток до терапии наблюдается повышение IL-17 и IL-13 ($p < 0,05$) и выраженный дефицит IL-12 p40 и IL-12 p70 ($p < 0,001$). После применения терапии установлено снижение

Адрес для переписки:

Небезкина Татьяна Андреевна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
690033, Россия, г. Владивосток,
пр. 100 лет Владивостоку, 62, кв. 20.
Тел.: 8 (914) 672-89-45.
E-mail: www.tanya.ru9292@mail.ru

Address for correspondence:

Nevezhkina Tatiana A.
Pacific State Medical University
690033, Russian Federation, Vladivostok,
100 let Vladivostoku ave., 62, apt 20.
Phone: 7 (914) 672-89-45.
E-mail: www.tanya.ru9292@mail.ru

Образец цитирования:

М.А. Черникова, Е.В. Маркелова, Т.А. Небезкина,
Л.С. Матюшкина, М.С. Тулупова, С.В. Кныш,
К.Г. Шевченко «Динамика изменений цитокинового
профиля сыворотки крови у пациенток
с папилломавирусной инфекцией до и после терапии
в период прегравидарной подготовки» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 561-570.
doi: 10.46235/1028-7221-1161-COB
© Черникова М.А. и соавт., 2022

For citation:

M.A. Chernikova, E.V. Markelova, T.A. Nevezhkina,
L.S. Matyushkina, M.S. Tulupova, S.V. Knysh,
K.G. Shevchenko "Changes of blood serum cytokine profile
in the patients with papillomavirus infection before and
after therapeutic pregravid preparation", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,
Vol. 25, no. 4, pp. 561-570.
doi: 10.46235/1028-7221-1161-COB
DOI: 10.46235/1028-7221-1161-COB

IL-13 и увеличение IL-12 p40 и IL-12 p70. Уровень IL-17 остался без динамических изменений. Во всех исследуемых группах пациенток применение терапии оказало положительный эффект вне зависимости от препарата.

Ключевые слова: папилломавирусная инфекция, Inosine pranobex, Solanum tuberosum, провоспалительные цитокины, противовоспалительные цитокины

CHANGES OF BLOOD SERUM CYTOKINE PROFILE IN THE PATIENTS WITH PAPILLOMAVIRUS INFECTION BEFORE AND AFTER THERAPEUTIC PREGRAVID PREPARATION

Chernikova M.A.^a, Markelova E.V.^a, Nevezhkina T.A.^a,
Matyshkina L.S.^a, Tulupova M.S.^b, Knysh S.V.^a, Shevchenko K.G.^c

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Paracelsus LLC, Vladivostok, Russian Federation

^c Nadezhdinskaya Central District Hospital, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Human papillomavirus is one of the most common sexually transmitted viruses. The state of the immune system is fundamental to the outcome of infectious processes of viral and bacterial genesis, thus determining the quality of pre-gravidar preparation. The purpose of present study was to perform a comprehensive analysis of pro- and anti-inflammatory cytokines in papillomavirus infection and to provide immunological assessment of therapeutic efficiency in women. Materials and methods: 137 patients with papillomavirus infection were observed, at the average age of 31 ± 2.5 years old. The study consisted of 2 stages: stage 1 included analysis of humoral innate immunity in women of the main group, distributed according to etiological factor, i.e., G-I was with papillomavirus infection (PVI); G-II presented with papillomavirus and herpetic infection (PVI + HVI 1/2 type); G-III included the patients with papillomavirus and Chlamydia infection (PVI + Trash.). At Stage 2, we performed immunological analysis of the therapeutic efficiency for PVI: in G-IA group with papillomavirus infection (PVI) we used Inosine pranobex ($n = 11$); in the IB group, Solanum tuberosum was applied ($n = 10$); in G-II A group with papillomavirus and herpes infection (PVI+HVI 1/2 type), we used Valacyclovir + Inosine pranobex ($n = 24$); in G-IIB patients Valacyclovir + Solanum tuberosum were administered ($n = 23$); for G-IIIA group with papillomavirus and chlamydia infection (PVI + Trash.) Doxycycline + Inosine pranobex were used ($n = 20$); the patients from IIIB group were treated with Doxycycline + Solanum tuberosum ($n = 19$). Determination of levels of IL-17A, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13 in blood serum was carried out using specific reagents from R&D Diagnostics Inc. (USA). Results: Before therapy, an increase in IL-17 and IL-13 ($p < 0.05$), and a pronounced deficiency of IL-12 p40 and IL-12 p70 ($p < 0.001$) were observed in blood serum of the patients. After the course of therapy, a decrease in IL-13 and an increase in IL-12 p40 and IL-12 p 70 were found. The IL-17 level remained without dynamic changes. The applied therapeutic approaches had a positive effect in all studied groups of patients, regardless of the drug administered.

Keywords: papillomavirus infection, Inosine pranobex, Solanum tuberosum, proinflammatory cytokines, antiinflammatory cytokines

Введение

Папилломавирусная инфекция (ПВИ) занимает первое место по распространенности среди инфекций, передающихся половым путем. По данным Всемирной организации здравоохранения, ПВИ распространена среди всех географических и социально-экономических подгрупп по всему миру [1].

Ежегодно регистрируется более 6 млн случаев инфицирования вирусом папилломы человека (ВПЧ), но оценить истинные данные не представляется возможным, в связи с большим количеством случаев, протекающих в бессимптомной форме, при этом инфекция может в 30-50% случаев заканчиваться самоизлечением с элиминацией вируса из организма, однако данный механизм не установлен [1, 18].

Прегравидарная подготовка (ПП) является основным этапом для полноценного оплодотворения, пролонгации беременности и рождения здорового ребенка с минимальными рисками патологии плода. Качественная ПП способствует снижению рисков развития перинатальных, акушерских и неонатальных осложнений, от хромосомных нарушений, врожденных пороков развития плода, так и самопроизвольных выкидышей и преждевременных родов [10, 12].

Состояние системы иммунитета является решающим фактором, которое определяет тяжесть и продолжительность воспалительных заболеваний, особенностей течения латентных вирусных инфекций, в том числе и ПВИ. Действие иммунной системы организма направлено на предотвращение персистенции и развития клинической симптоматики ПВИ. В настоящее время отсутствуют комплексные исследования системы про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови у пациенток с ПВИ инфекцией, в том числе в ассоциациях с герпетической и хламидийной инфекцией в период подготовки к беременности [2, 6, 13].

Отсутствуют единые стандарты терапии ПВИ у женщин. Методические рекомендации и согласительные документы не позволяют однозначно ответить на вопрос о принципах выбора и эффективности противовирусной и иммуномодулирующей терапии. В научных исследованиях представлены разрозненные данные о влиянии препаратов синтетического (Inosine pranobex) и растительного (Solanum tuberosum) происхождения на показатели врожденного иммунитета [11, 19].

Цель исследования – провести комплексный анализ про- и противовоспалительных цитокинов при папилломавирусной инфекции и дать иммунологическую оценку эффективности терапии у женщин.

Материалы и методы

В исследование было включено 137 пациенток женского пола в возрасте от 19 до 44 лет (средний возраст пациенток $31 \pm 2,5$ лет). С учетом цели, исследование состояло из 2 этапов: 1-й этап – анализ особенностей гуморальных факторов врожденного иммунитета у женщин основной группы, распределенных с учетом этиологического фактора (Г-I – с папилломавирусной инфекцией (ПВИ); Г-II – с папилломавирусной и герпетической инфекцией (ПВИ + ГВИ 1/2 тип); Г-III – с папилломавирусной и хламидийной инфекцией (ПВИ + Хлам.); 2-й этап – иммунологический анализ влияния схем терапии при ПВИ (Г-IA – с папилломавирусной инфекцией (ПВИ) – Inosine pranobex (n = 11), IB – Solanum tuberosum (n = 10);

Г-II А – с папилломавирусной и герпетической инфекцией (ПВИ + ГВИ 1/2 тип) – Валацикловир + Inosine pranobex (n = 24), Г-IIВ – Валацикловир + Solanum tuberosum (n = 23); Г-IIIА – с папилломавирусной и хламидийной инфекцией (ПВИ + Хлам.) – Доксициклин + Inosine pranobex (n = 20), IIIВ – Доксициклин + Solanum tuberosum (n = 19). Комплексное клинико-лабораторное исследование проводили дважды, исходно – до терапии и через один месяц после терапии, в амбулаторных условиях по единой программе, включающей клинико-функциональное, биохимическое и иммунологическое обследование с целью детализации иммунологических механизмов хронического воспаления, ассоциированного с вирусным или вирусно-бактериальным фактором урогенитального тракта женщин в прегравидарный период.

Определение в сыворотке крови уровня про- и противовоспалительных цитокинов (IL-17A, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13) проведено методом твердофазного ИФА с использованием специфических реактивов фирмы R&D Diagnostic Inc. (США).

Для оценки степени иммунных расстройств (СИР) до терапии и СИР через один месяц после терапии применялся метод оценки степени иммунных расстройств использовалась формула для каждой группы пациенток с ПВИ [6].

Статистическая обработка данных проведена с использованием программ IBM SPSS® v. 22. Внутри и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Для проверки взаимосвязи или независимости между величинами определяли коэффициент корреляции Спирмена. Ассоциативная связь показателей с признаками оценивалась с помощью отношения шансов и их 95% доверительных интервалов. Статистически достоверным считали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты анализа уровня исследованных про- и противовоспалительных цитокинов представлены в таблице 1.

Было установлено разнонаправленное изменение про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови пациенток в исследуемых группах до лечения.

Уровень IL-17A был повышен в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$) у пациенток всех основных групп. При этом не установлено статистически значимой разницы в его содержании в сыворотке крови между группами. В основных группах женщин было выявлено снижение IL-12 субтипа p70 при дефиците IL-12 p40 в сравнении с группой контроля. При этом у пациенток

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИНАМИКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОК РАЗНЫХ ГРУПП, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. COMPARATIVE RESULTS OF THE DYNAMICS OF THE CYTOKINE PROFILE OF BLOOD SERUM BEFORE AND AFTER THERAPY IN PATIENTS OF DIFFERENT GROUPS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа контроля Control group (n = 30)	Группа I ВПЧ Group I HPV (n = 21) 1	Группа II Group II ВПГ + ВПЧ HSV + HPV (n = 47) 2	Группа III ВПЧ + хлам. Group III HPV + chlamydia (n = 39) 3	Уровень достоверности (p) P-value
IL-17A до терапии, пг/мл IL-17A before therapy, pg/mL	2,8 (0,5-6,3)	7,39* (6,29-7,82) p _{до-IA} = 0,071 p _{до-IB} = 0,067	7,04 * (5,48-7,63) p _{до-IA} = 0,091 p _{до-IB} = 0,066	8,91* (7,04-10,14) p _{до-IIIА} = 0,12 p _{до-IIIВ} = 0,24	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ > 0,05
Inosine pranobex (A)		7,85* (7,15-8,54) p _{IA-IB} = 0,128	5,56* (5,06-6,60) p _{IIA-IB} = 0,085	9,24* (6,82-13,42) p _{IIIA-IIIВ} = 0,65	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ < 0,05
Solanum tuberosum (B)		6,11* (6,01-6,87)	6,93* (5,99-8,86)	7,82* (6,55-9,10)	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ > 0,05
IL-12 p70 до терапии, пг/мл IL-12 p70 before therapy, pg/mL	6,85 (2,86-20,59)	4,18* (3,27-11,56) p _{до-IA} = 0,045 p _{до-IB} < 0,001	1,03** (0,11-8,96) p _{до-IA} = 0,006 p _{до-IB} < 0,001	3,27* (1,94-3,43) p _{до-IIIА} = 0,008 p _{до-IIIВ} < 0,001	p ₁₋₂ = 0,002 p ₂₋₃ = 0,048 p ₁₋₃ > 0,05
Inosine pranobex (A)		9,18* (8,36-20,01) p _{IA-IB} = 0,021	14,36* (12,39-18,85) p _{IIA-IB} < 0,001	10,72* (8,67-18,43) p _{IIIA-IIIВ} < 0,001	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ > 0,05
Solanum tuberosum (B)		24,45** (10,66-28,10)	34,61** (11,79-37,45)	32,77** (19,15-36,40)	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ > 0,05
IL-12 p40 до терапии, пг/мл IL-12 p40, before therapy, pg/mL	106,0 (69,2-151,0)	12,92** (1,28-30,76) p _{до-IA} = 0,036 p _{до-IB} = 0,007	0,36*** (0,29-11,96) p _{до-IA} = 0,008 p _{до-IB} = 0,007	9,60*** (1,28-12,92) p _{до-IIIА} = 0,025 p _{до-IIIВ} = 0,045	p ₁₋₂ < 0,01 p ₂₋₃ = 0,002 p ₁₋₃ = 0,004
Inosine pranobex (A)		33,26** (26,43-40,12) p _{IA-IB} = 0,038	27,93** (18,71-34,97) p _{IIA-IB} = 0,027	14,22*** (1,04-16,40) p _{IIIA-IIIВ} = 0,028	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ < 0,01 p ₁₋₃ < 0,01
Solanum tuberosum (B)		50,10** (32,12-61,13)	22,68** (11,63-36,04)	12,43*** (1,41-13,45)	p ₁₋₂ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₃ < 0,001
IL-13 до терапии, пг/мл IL-13 before therapy, pg/mL	39,61 (11,36-72,45)	76,28* (50,40-77,55) p _{до-IA} = 0,047 p _{до-IB} = 0,028	73,17* (69,02-76,28) p _{до-IA} = 0,006 p _{до-IB} = 0,031	90,82** (69,02-141,83) p _{до-IIIА} = 0,007 p _{до-IIIВ} = 0,002	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ = 0,003 p ₁₋₃ = 0,002

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатели Indicators	Группа контроля Control group (n = 30)	Группа I ВПЧ Group I HPV (n = 21) 1	Группа II Group II ВПГ + ВПЧ HSV + HPV (n = 47) 2	Группа III ВПЧ + хлам. Group III HPV + chlamydia (n = 39) 3	Уровень достоверности (p) P-value
Inosine pranobex (A)		48,45* (39,30-56,80) $p_{IA-IB} = 0,45$	48,85* (43,31-54,53) $p_{IIA-IB} = 0,33$	46,21* (40,83-76,70) $p_{IIIA-IIIБ} = 0,017$	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$ $p_{1-3} > 0,05$
Solanum tuberosum (B)		48,62* (29,11-56,11)	53,45* (45,61-61,45)	71,8** (48,44-75,21)	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$

Примечание. 1. Статистическая достоверность различий с группой контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.
2. Статистическая достоверность между группами: p_{1-2} – I и II группы – с ВПЧ и ВПЧ + ВПГ; p_{2-3} – I и III группы – с ВПЧ + ВПГ и ВПЧ + хламидии; p_{1-3} – III и I группа – с ВПЧ + хламидии и ВПЧ.
3. Статистическая достоверность между подгруппами: $p_{до-IA}$ – до терапии и I подгруппа с Inosine pranobex (IA) – с ПВИ; $p_{до-IB}$ – до терапии и II подгруппа с Solanum tuberosum (IB) – с ПВИ; p_{IA-IB} – IA и IB подгруппы – с ПВИ; $p_{до-IIA}$ – до терапии и I подгруппа с Inosine pranobex (IIA) – с ПВИ + ГВИ; $p_{до-IIB}$ – до терапии и II подгруппа с Solanum tuberosum (IIB) – с ПВИ; $p_{IIA-IIB}$ – IIA и IIB подгруппы – с ПВИ + ГВИ; $p_{до-IIIA}$ – до терапии и III подгруппа с Inosine pranobex (IIIA) – с ПВИ + хламидийная инфекция; $p_{до-IIIB}$ – до терапии и III подгруппа с Solanum tuberosum (IIIB) – с ПВИ + хламидийная инфекция; $p_{IIIA-IIIB}$ – IIIA и IIIB подгруппы – с ПВИ + хламидийная инфекция.

Note. 1. Statistical significance of differences with the control group: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

2. Statistical significance between groups: p_{1-2} , groups I and II – with HPV and HPV + HSV; p_{2-3} , groups I and III – with HPV + HSV and HPV + chlamydia; p_{1-3} , group III and I – with HPV + chlamydia and HPV.

3. Statistical significance between subgroups: $p_{до-IA}$, before therapy and subgroup I with Inosine pranobex (IA) – with PVI; $p_{до-IB}$, before therapy and subgroup II with Solanum tuberosum (IB) – with PVI; p_{IA-IB} , IA and IB subgroups – with PVI; $p_{до-IIA}$, before therapy and subgroup I with Inosine pranobex (IIA) – with PVI + GVI; $p_{до-IIB}$, before therapy and subgroup II with Solanum tuberosum (IIB) – with PVI; $p_{IIA-IIB}$, IIA and IIB subgroups – with PVI + GVI; $p_{до-IIIA}$, before therapy and subgroup III with Inosine pranobex (IIIA) – with PVI + chlamydia infection; $p_{до-IIIB}$, before therapy and subgroup III with Solanum tuberosum (IIIB) – with PVI + chlamydia infection; $p_{IIIA-IIIB}$, IIIA and IIIB subgroups – with PVI + chlamydia infection.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ КОЭФФИЦИЕНТА IL-12 p70 / IL-12 p40 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ

TABLE 2. INDICATORS OF THE IL-12 p70 / IL-12 p40 COEFFICIENT IN BLOOD SERUM BEFORE AND AFTER THERAPY

	Группа контроля Control group (n = 30)	Г-I G-I (n = 21) 1	Г-II G-II (n = 47) 2	Г-III G-III (n = 39) 3	Уровень достоверности (p) P-value
До терапии Before therapy		0,32** (0,16-0,41)	2,86*** (1,34-3,20)	0,3* (0,05-0,41)	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$ $p_{1-3} > 0,05$
Inosine pranobex (A)	0,06 (0,04-0,16)	0,27** (0,09-0,33)	0,4* (0,02-0,52)	0,75** (0,44-1,20)	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,01$
Solanum tuberosum (B)		0,4* (0,10-0,72)	1,5*** (1,1-1,9)	2,6*** (1,7-3,3)	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,01$ $p_{1-3} < 0,001$

Примечание. 1. Статистическая достоверность различий с группой контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

2. Статистическая достоверность между группами: p_{1-2} – I и II группы – с ВПЧ и ВПЧ + ВПГ; p_{2-3} – II и III группы – с ВПЧ + ВПГ и ВПЧ + хламидии; p_{1-3} – III и I группа – с ВПЧ + хламидии и ВПЧ.

Note. 1. Statistical significance of differences with the control group: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

2. Statistical significance between groups: p_{1-2} , I and II groups – with HPV and HPV + HSV; p_{2-3} , II and III groups – with HPV + HSV and HPV + chlamydia; p_{1-3} , III and I groups – with HPV + chlamydia and HPV.

II группы (с ПВИ и ГВИ) определен дефицит IL-12 p70 ($p < 0,01$) как в сравнении с группой контроля, так и с группами с бактериальной инфекцией ($p_{2-3} = 0,003$) и моноинфекцией ($p_{1-2} = 0,002$). IL-12 p40 во II группе так же наиболее низким по отношению к контрольной группе ($p < 0,001$) и к группе с хламидийной инфекцией ($p_{2-3} = 0,002$), и I группе ($p_{1-2} = 0,004$).

Значения IL-13 были повышены в сыворотке крови во всех группах пациенток в сравнении с группой контроля ($p < 0,05-0,01$). Наиболее высокие показатели зарегистрированы в группе с вирусной и бактериальной ассоциацией в сравнении с I ($p_{1-3} = 0,002$) и II ($p_{2-3} = 0,003$) группами пациенток. Межгрупповых различий между I и II группами выявлено не было.

При анализе про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови, через один месяц после терапии у пациенток, продемонстрирован ряд закономерностей и различий. Данные представлены в таблице 1.

В группе I при анализе содержания в сыворотке крови исследуемых цитокинов в целом выявлена тенденция к восстановлению, однако без достижения контрольных значений. При терапии Inosine pranobex (подгруппа IA) было выявлено увеличение уровней IL-12 p70 в среднем в 2 раза, IL-12 p40 – в 2,5 раза и снижение IL-13 – в 1,5 раза, относительно значений до терапии. В сыворотке крови пациенток подгруппы IB отмечена аналогичная тенденция, однако более выраженная и отличающаяся от подгруппы IA по значениям субтипов IL-12: IL-12 p70 – в 5 раз, IL-12 p40 – в 3 раза. IL-13 в среднем стал ниже в сравнении со значениями до терапии в 1,5 раза, в той же мере и без достоверных отличий от результатов подгруппы IA. Контрольные значения IL-12 p40, IL-13 не были достигнуты в обеих подгруппах, значения IL-12 p70 стали достоверно выше, как в подгруппе IA, так и в подгруппе IB по сравнению с референсными величинами.

В группе II была установлена практически идентичная картина динамики всех исследуемых цитокинов в сыворотке крови. В подгруппе IIA было задокументировано существенное увеличение IL-12 p70 в среднем в 13 раз, IL-12 p40 – в 77 раз. Уровень IL-13 в сыворотке крови, напротив, снизился и стал в 1,4 раза ниже, в сравнении с показателями до терапии. В подгруппе IIB у пациенток, получавших терапию Solanum tuberosum, также были зарегистрированы подобные изменения уровня цитокинов в виде повышения в среднем – IL-12 p70 в 33 раза, IL-12 p40 – в 63 раза, и снижения IL-13 в среднем в 1,3 раза. Достоверные отличия между подгруппами были выявлены лишь в содержании IL-12 p70 и IL-12 p40 (табл. 1). Уровни цитокинов, соответ-

ствующие значениям контрольной группы, достигнуты не были.

В группе III изменения содержания цитокинов в сыворотке крови были несколько иными, а также были выявлены различия между подгруппами. В сыворотке крови подгруппы IIIA после терапии Inosine pranobex было зафиксировано увеличение содержания IL-12 p70 в среднем в 3,2 раза, IL-12 p40 – 1,4 раза, IL-13 понизился в среднем в 1,9 раз. В то время как в сыворотке пациенток из подгруппы IIIB увеличивался уровень IL-12 p70 в среднем в 10 раз, IL-12 p40 – 1,2 раза и снижались значения IL-13 – в 1,2 раза. При сравнении подгрупп между собой, выявлено большее повышение IL-12 p70 в подгруппе IIIB и IL-12 p40 – в подгруппе IIIA, и снижение содержания IL-13 в подгруппе IIIA (табл. 1).

Оценивая содержание IL-17A в сыворотке крови пациенток всех групп, не было выявлено существенных динамических изменений: цитокин сохранялся на повышенном уровне, относительно контрольных значений, вне зависимости от проведенной терапии и характера инфекции (табл. 1).

При расчете коэффициента IL-12 p70 к IL-12 p40, в сыворотке крови, были выявлены выраженные изменения (табл. 2).

Повышенный коэффициент IL-12 p70 к p40 в сыворотке крови отражает поляризацию иммунного ответа по T1 типу [16]. Особенно высокий коэффициент определен во II группе женщин до применения терапии. Данный эффект возможен за счет активности каталазы при ВПГ инфекции [14]. Каталаза должна оказывать защитный эффект на клетку, но ассоциация вирусных инфекций приводит к дефекту защитной функции и способствует патологическим изменениям. При применении терапии выявлено снижение данного коэффициента, что свидетельствует об эффективности терапии, но в подгруппе II В коэффициент был выше в сравнении с подгруппой IIA.

В III группе женщин после терапии этот коэффициент повысился как в подгруппе IIIA, так и в IIIB по сравнению с исходными данными. Это может свидетельствовать о выраженной поляризации иммунного ответа по T1 типу, что необходимо для элиминации внутриклеточных патогенов [14, 17, 20]. При применении комбинированной терапии с доксициклином, за счет прямого антимикробного действия, усиливается бактерицидный эффект и усиливает окислительный стресс [14, 17, 20]. Однако после приема курса лечения и устранения патогена, вызвавшего воспалительный процесс, окислительный стресс, возможно, снизится. Так же как и в подгруппе IIB, подгруппа IIIB имеет более высокие показате-

тели в сравнении с подгруппой IIIA, что так же можно объяснить эффектом ST.

При анализе степени иммунных расстройств было установлено, что до терапии в целом наблюдалась гиперпродукция исследуемых цитокинов, за исключением выявленного дефицита IL-12 p70 и IL-12 p40 во всех группах. В результате терапии в большей степени происходила индукция продукции IL-12 p70 во всех исследуемых подгруппах основных групп.

Полученные результаты до применения терапии показывают, что статистически значимое увеличение в сыворотке крови уровня IL-17A у женщин в основных исследуемых группах может говорить об обширной тканевой реакции, приводящей, в том числе к миграции нейтрофилов в воспалительную зону и о важной роли этих клеток в патогенезе ПВИ, не исключено также и включение аутоиммунного компонента [5, 9, 13, 15].

IL-12 секретируется, прежде всего, активированными макрофагами и влияет на иммунные клеточные реакции. Гликозилированные субъединицы p40 и p35 кодируются двумя различными, независимыми друг от друга генами. Наибольшей биологической активностью обладает гетеродимер IL-12 p70, однако клетки, продуцирующие IL-12, секретируют в большом количестве субъединицу p40, которая в свою очередь не является биологически активной. Субъединица p40 секретируется с наибольшим избытком в сравнении с p35. p40 участвует в связывании с рецептором, но p35 способствует трансдукции сигнала. Снижение уровня обоих субтипов p35 и p40 IL-12 свидетельствует о дисфункции и истощении моноцитов-макрофагов, нарушении способности стимулировать цитотоксические лимфоциты (NK и T) и индуцировать дифференцировку как T1-клеток, которые способствуют запуску клеточных механизмов защиты против внутриклеточных патогенов, так и T2-лимфоцитов, регулирующих гуморальный иммунитет [16].

Повышенный уровень IL-13 способствует ингибированию продукции других цитокинов, стимулирующих воспалительный процесс, что вероятно, свидетельствует об активации компонентов иммунной системы, направленных на элиминацию вируса и снижение воспалительного процесса в организме. Однако, учитывая плеiotропность действия этого цитокина, он так же может вызывать и пролонгировать воспалительный процесс [3]. Гиперактивации Th17 иммунного ответа ассоциируются с хронизацией воспалительного процесса и фиброзом с дисбалансом регуляторных T-лимфоцитов и T-хелперов, что приводит к экспрессии профибриногенных цитокинов в том числе IL-13 [16]. Таким образом,

участвуя в фиброгенезе, IL-13 проявляют прямую фиброгенную активность.

Повышение IL-13 и IL-17A, по нашим результатам, сопряжено с инфекционным процессом вирусно-хламидийной природы и может приводит к активации фиброгенеза, способствующего бесплодию по трубному фактору. Также повышение IL-13 отражает активацию T2 типа иммунного ответа, который патогенетически не целесообразен при внутриклеточных инфекциях [4, 8, 13]. Увеличение содержания IL-17A в сыворотке крови у пациенток всех основных групп может свидетельствовать о выраженном воспалительном процессе, тканевой реакции, при этом индуцируя хемотаксис и активацию нейтрофилов в зоне воспаления, что играет важное значение при ПВИ.

Проанализировав полученные результаты исследования после проведения, терапии установлено, что наибольшие изменения после терапии показали IL-12 p70 и IL-12 p40. В I группе пациенток IL-12 p70 и IL-12 p40 более выражено повышались при применении терапии терапии ST. Результаты II группы пациенток зарегистрировали иные данные, так терапия IP способствовала повышению уровня IL-12 p40, в то время как ST, напротив, индуцировала повышение IL-12 p70. В группе с ассоциацией вирусной и бактериальной инфекций выражено повысился IL-12 p70 при терапии ST.

При анализе результатов коэффициента IL-12 p70 / IL-12 p40 выявлено, что при применении терапии в комбинации с ST в подгруппах IIВ и IIВВ продемонстрировано его повышение в сравнении с терапией IP в подгруппах IIIA и IIIA, что свидетельствует о большей поляризации иммунного ответа по T1 типу, что предполагает возможную элиминацию внутриклеточных патогенов.

Заключение

Избыточная продукция IL-12 p40 способствует преобладанию T2-ответа за счет увеличения продукции гомодимеров IL-12 p40, которые могут служить антагонистом T1-индуцирующего цитокина IL-12 p70.

Изменение уровня субтипов IL-12 p40 в сыворотке крови приводило к увеличению молекулярного отношения IL-12 p70 к p40, как выявило наше исследование. Мономерные субъединицы IL-12 p40 могут образовывать более стабильные гомодимеры IL-12 p40, которые, как известно, связываются с рецептором IL-12β1 и служат антагонистами для IL-12 p70. Субъединицы IL-12 p40 также связываются с p19, образуя гетеродимер p40 / p19, известного как IL-23, который имеет биоактивность, аналогичную IL-12, но он не анализировался в нашем исследовании. По-

сколькo известно, что IL-23 связывает рецептор IL-12 β 1, возможно, что усиленная продукция гомодимеров IL-12 p40, вызванная окислительным стрессом, приводит к ингибированию активности этого цитокина [16].

Во всех исследуемых группах пациенток применение терапии оказало положительный эффект вне зависимости от препарата. Таким образом, во всех группах установлено повышение IL-12 и его субтипов p70 и p40, а так же снижение IL-13. Уровень IL-17A оставался высоким после терапии без статистически значимой разницы между подгруппами.

Анализ коэффициента IL-12 p70/IL-12 p40 показал, что при применении терапии в комбинации с ST, в группах с вирусными и бактери-

альной ассоциациями (ПВ и ППВ), коэффициент повышался более существенно. Выявлена поляризация иммунного ответа по T1 типу.

Благодарности

Авторы выражают признательность ректору ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России Шуматову Валентину Борисовичу, первому проректору ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России Транковской Лидии Викторовне, проректору ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России Елисеевой Екатерине Валерьевне, а также научному отделу ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России в лице руководителя Поддубного Евгения Александровича, за поддержку исследования в рамках программы кадрового резерва.

Список литературы / References

1. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Таточенко В.К., Вишнева Е.А., Федосеенко М.В., Селимзянова Л.Р., Чемакина Д.С., Лобзин Ю.В., Харит С.М., Брико Н.И., Лопухов П.Д., Сухих Г.Т., Уварова Е.В., Прилепская В.Н., Поляков В.Г., Гомберг М.А., Краснополяский В.И., Зароченцева Н.В., Костинов М.П., Белоцерковцева Л.Д., Мельникова А.А., Батыршина Л.Р. Вакцинопрофилактика заболеваний, вызванных вирусом папилломы человека: позиции доказательной медицины. Обзор клинических рекомендаций // Вопросы современной педиатрии, 2017. Т. 16, № 2. С.107-117. [Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Tatochenko V.K., Vishneva E.A., Fedoseenko M.V., Selimzianova L.R., Chemakina D.S., Lobzin Yu.V., Kharit S.M., Briko N.I., Lopukhov P.D., Sukhikh G.T., Uvarova E.V., Prilepskaya V.N., Polyakov V.G., Gombert M.A., Krasnopolskiy V.I., Zarochentseva N.V., Kostinov M.P., Belotserkovtseva L.D., Melnikova A.A., Batyrshina L.R. Vaccinal Prevention of the Diseases Caused by Human Papillomavirus: Evidence-Based Medicine. Review of Clinical Guidelines. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Issues of Modern Pediatrics*, 2017, Vol. 16, no. 2, pp. 107-117. (In Russ.)]
2. Барановская Е.И. Генотипы вируса папилломы человека у беременных // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2012. № 3. С. 56-62. [Baranovskaya E.I. Human papillomavirus genotypes in pregnant women. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2012, no. 3, pp. 56-62. (In Russ.)]
3. Варламов Е.Е., Пампура Е.Е., Сухороков А.Н. Значение цитокинов в патогенезе атопического дерматита // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2018. Т. 63, № 1. С. 28-33. [Varlamov E.E., Pampura E.E., Sukhorukov A.N. The significance of cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2018, Vol. 63, no. 1, pp. 28-33. (In Russ.)]
4. Караулов А.В., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Воропаева Е.А., Афанасьев М.С., Несвижский Ю.В., Алешкин А.В., Метельская В.А., Гречишников О.Г., Байракова А.Л., Егорова Е.А., Урбан Ю.Н., Евсегнеева И.В., Микрофлора, колонизационная резистентность слизистых и мукозальный иммунитет // Иммунология, 2015. Т. 36, № 5. С. 290-295. [Karaulov A.V., Afanasyev S.S., Aleshkin V.A., Voropaeva E.A., Afanasyev M.S., Nesvizskiy Yu.V. Aleshkin A.V., Metel'skaya V.A., Grechishnikova O.G., Bayrakova A.L., Egorova E.A., Urban U.N., Evsegneeva I.V. Microflora, colonization resistance of mucous membranes and mucosal immunity. *Immunologiya = Immunology*, 2015, Vol. 36, no. 5, pp. 290-295. (In Russ.)]
5. Караулов А.В., Афанасьев М.С., Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Воропаева Е.А., Борисова О.Ю., Воропаев А.Д., Борисова А.Б. Микробные патогены при урогенитальной инфекции беременных // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2019. № 6. С. 13-20. [Karaulov A.V., Afanasyev M.S., Nesvizh Yu.V., Afanasyev S.S., Voropaeva E.A., Borisova O.Yu., Voropaev A.D., Borisova A.B. Microbial pathogens in urogenital infection of pregnant women. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 6, pp. 13-20. (In Russ.)]
6. Караулов А.В., Земсков А.М., Земсков В.М. Клиническая иммунология и аллергология. М.: МИА, 2002. 650 с. [Karaulov A.V., Zemskov A.M., Zemskov V.M. Clinical immunology and allergology. Moscow: MIA, 2002. 650 p.]

7. Маркелова Е.В., Здор В.В., Романчук А.Л., Бирко О.Н. Матриксные металлопротеиназы: их взаимосвязь с системой цитокинов, диагностический и прогностический потенциал // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2016. № 2. С. 11-22. [Markelova E.V., Zdor V.V., Romanchuk A.L., Birko O.N. Matrix metalloproteinases: their relationship with the cytokine system, diagnostic and prognostic potential. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2016, no. 2, pp. 11-22. (In Russ.)]
8. Маркелова Е.В., Тулупова М.С., Хамошина М.Б., Чепурнова Н.С., Невежжина Т.А. Роль мужского фактора при невынашивании беременности // Проблемы репродукции, 2020. Т. 26, № 4. С. 85-90. [Markelova E.V., Tulupova M.S., Khamoshina M.B., Chepurnova N.S., Nevezhkina T.A. The role of the male factor in miscarriage. *Problemy reproduktivnoy = Problems of Reproduction*, 2020, Vol. 26, no. 4, pp. 85-90. (In Russ.)]
9. Мельников В.Л., Митрофанова Л.В., Мельников Л.В. Аутоиммунные заболевания: учебное пособие. Пенза: Изд-во ПГУ, 2015. 68 с. [Melnikov V. L., Mitrofanova L.N., Melnikov L.V. Autoimmune diseases: textbook]. Penza: Publishing House of PSU, 2015. 68 p.
10. Радзинский В.Е. Прегравидарная подготовка: клинический протокол. М.: StatusPraesens, 2016. 80 с. [Radzinsky V.E. Pregravidar preparation: clinical protocol]. Moscow: StatusPraesens, 2016. 80 p.
11. Самощенко И.Ф., Гаранкина Р.Ю., Бобкова Е.А., Омелченко А.А. Изучение ассортимента противовирусных лекарственных препаратов с углубленным товароведческим анализом препарата «Нормомед» // Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова. Серия: Медицинские науки, 2021. № 1 (22). С. 41-51. [Samoshchenko I.F., Garankina R.Y., Bobkova E.A., Omelchenko A.A. The study of the assortment of antiviral drugs with an in-depth commodity analysis of the drug "Normomed". *Vestnik Severo-Vostochnogo federal'nogo universiteta im. M.K. Ammosova. Seriya: Meditsinskie nauki = M. Ammosov Bulletin of the Northeastern Federal University. Series: Medical Sciences*, 2021, no. 1 (22), pp. 41-51. (In Russ.)]
12. Соснова Е.А. Прегравидарная подготовка пациенток с вирусными инфекциями // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии, 2011. № 5 (10). С. 4-8. [Sosnova E.A. Pregravidar preparation of patients with viral infections. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii = Problems of Gynecology, Obstetrics and Perinatology*, 2011, no. 5 (10), pp. 4-8. (In Russ.)]
13. Хайтов Р.М., Гариб Ф.Ю. Иммунология: атлас. 2-е изд., обновленное. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 416 с. [Khaitov R.M., Garib F.Yu. Immunology: Atlas. 2nd ed., updated]. Moscow: GEOTAR-Media, 2020. 416 p.
14. Harpur C.M., Kato Yu., Dewi S.T., Stankovic S., Johnson D.N., Bedoui S., Whitney P.G., Lahoud M.H., Caminschi I., Heath W.R., Brooks A.G., Gebhardt T. Classical Type 1 Dendritic Cells Dominate Priming of Th1 Responses to Herpes Simplex Virus Type 1 Skin Infection. *J. Immunol.*, 2019, Vol. 20, no. 3, pp. 653-663.
15. Huang X.L., Zhang L., Duan Y., Wang Y.J., Wanga J. Association of pentraxin 3 with autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Med. Res.*, 2016, Vol. 47, no. 3, pp. 223-231.
16. Marks E., Naudin C., Nolan G., Goggins B.J., Burns G., Mateer S.W., Latimore J.K., Minahan K., Plank M., Foster P.S., Callister R., Veysey M., Walker M.M., Talley N.J., Radford-Smith G., Keely S. IL-12p40 by HIF controls Th1/Th17 responses to prevent mucosal inflammation. *Mucosal Immunol.*, 2017, Vol. 10, no. 5, pp. 1224-1236.
17. Mezouar S., Lepidi H., Osman O.I., Gorvel J-P, Raoult D., Mege J-L., Bechah Y. T-Bet Controls Susceptibility of Mice to *Coxiella burnetii* Infection. *Front. Microbiol.*, 2020, Vol. 11, 1546. doi: 10.3389/fmicb.2020.01546.
18. Pereira N., Kucharczyk K.M., Estes J.L., Gerber R.S., Lekovich J.P., Elias R.T., Spandorfer S.D. Human papillomavirus infection, infertility, and assisted reproductive outcomes. *J. Pathog.*, 2015, Vol. 2015, 578423. doi: 10.1155/2015/578423.
19. Sliva J., Pantartzis C.N., Votava M. Inosine pranobex: a key player in the game against a wide range of viral infections and non-infectious diseases. *Adv. Ther.*, 2019, Vol. 36, no. 8, pp. 1878-1905.
20. Zhu X., Zhu J. CD4 T helper cell subsets and related human immunological disorders. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 21, 8011. doi: 10.3390/ijms21218011.

Авторы:

Черникова М.А. — ассистент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток

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

Authors:

Chernikova M.A., Assistant Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

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

Невежкина Т.А. — ассистент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток

Матюшкина Л.С. — к.м.н., доцент, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии «Тихоокеанский государственный медицинский университет», г. Владивосток, Россия

Тулупова М.С. — к.м.н., главный врач ООО «Парацельс», г. Владивосток, Россия

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

Шевченко К.Г. — врач — акушер-гинеколог КГБУ «Надеждинская центральная районная больница», г. Владивосток, Россия

Nevezhkina T.A., Assistant Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Matyshkina L.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Obstetrics and Gynecology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Tulupova M.S., PhD (Medicine), Chief Physician, Paracelsus LLC, Vladivostok, Russian Federation

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

Shevchenko K.G., Obstetrician-Gynecologist, Nadezhdinsky Central District Hospital, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 01.07.2022

Отправлена на доработку 26.07.2022

Принята к печати 28.07.2022

Received 01.07.2022

Revision received 26.07.2022

Accepted 28.07.2022

МОДУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ГЕКСАПЕПТИДА НА ИЗМЕНЕННЫЙ ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ И CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Чудилова Г.А.¹, Тетерин Ю.В.¹, Чапурина В.Н.¹, Чичерев Е.А.¹,
Тараканов В.А.¹, Нестерова И.В.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Краснодар, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Резюме. Проблема острого остеомиелита у детей занимает одно из центральных мест среди воспалительных заболеваний костно-мышечной системы. Причинами являются возникшие в организме инфекционные процессы, распространившиеся на костную ткань при различных дисрегуляторных процессах иммунной системы, и в первую очередь нейтрофильных гранулоцитов. Представляет интерес изучение субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов, образующихся при включении клетки в воспалительный процесс, при остром остеомиелите у детей и определение возможности влияния на уровень экспрессии рецепторов для коррекции их функций. Целью исследования явилась оценка влияния гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на измененный фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ и CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺ детей с острым остеомиелитом в эксперименте *in vitro*. Исследованы образцы периферической крови детей 10-17 лет с острым остеомиелитом (гематогенным или посттравматическим, n = 12) при поступлении в стационар и условно здоровых детей (n = 7). Образцы крови детей с острым остеомиелитом инкубировали с гексапептидом (10⁻⁶ г/л) 60 мин, T 37 °C. Проводили определение содержания субпопуляций CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ и CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺ нейтрофильных гранулоцитов, оценку плотности экспрессии мембранных рецепторов (FC 500, Beckman Coulter, США); исследовали фагоцитарную функцию с учетом степени завершенности фагоцитарного акта в отношении *S. aureus*. Установлено, что при остром остеомиелите выявлено значительное увеличение в 8,5 раз доли активированной субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺НГ с фенотипом CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{dim}НГ, на фоне снижения субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻НГ и изменения ее фенотипа – CD16^{dim}CD62L^{bright}CD11b^{mid}CD63⁻НГ в сравнении с показателями условно здоровых детей. При этом отмечено увеличение количества активно фагоцитирующих клеток, но снижение показателей, характеризующих процессы захвата и переваривания бактериального анти-

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123, кв. 1.
Тел.: 8 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Address for correspondence:

Nesterova Irina V.
Peoples' Friendship University of Russia
117513, Russian Federation, Moscow,
Leninsky ave., 123, apt 1.
Phone: 7 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Образец цитирования:

Г.А. Чудилова, Ю.В. Тетерин, В.Н. Чапурина,
Е.А. Чичерев, В.А. Тараканов, И.В. Нестерова
«Модулирующие эффекты гексапептида
на измененный фенотип субпопуляций нейтрофильных
гранулоцитов CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻
и CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺ детей с острым
остеомиелитом в системе *in vitro*» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 571-576.
doi: 10.46235/1028-7221-1206-MEO

© Чудилова Г.А. и соавт., 2022

For citation:

G.A. Chudilova, Yu.V. Teterin, V.N. Chapurina,
E.A. Chicherev, V.A. Tarakanov, I.V. Nesterova
“Modulating effects of hexapeptide on the altered phenotype of
neutrophil granulocyte CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ and
CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺ subsets in children with
acute osteomyelitis in the *in vitro* system”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,
Vol. 25, no. 4, pp. 571-576.
doi: 10.46235/1028-7221-1206-MEO

DOI: 10.46235/1028-7221-1206-MEO

гена. Показано, что гексапептид в эксперименте *in vitro* модулирует фенотипы обеих изучаемых субпопуляций в CD16^{bright}CD62L^{mid}CD11b^{mid}CD63⁻ и CD16^{mid}CD62L^{mid}CD11b^{mid}CD63^{dim}НГ, способствуя восстановлению уровня экспрессии рецепторов до показателей группы сравнения и фагоцитарной активности как процессов захвата, так и переваривающей способности клеток. Таким образом, установлено значительное доминирование диагностически значимой активированной субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺НГ с фенотипом CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{dim}НГ при остром остеомиелите у детей. Показано, что гексапептид в системе *in vitro* модулирует фенотипы субпопуляций CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻НГ и CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺НГ, при этом восстанавливая фагоцитарную активность клеток. В перспективе полученные результаты могут послужить основой при разработке новых эффективных терапевтических схем лечения.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, фенотип субпопуляций, острого остеомиелит, гексапептид, дети

MODULATING EFFECTS OF HEXAPEPTIDE ON THE ALTERED PHENOTYPE OF NEUTROPHIL GRANULOCYTE CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ AND CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺ SUBSETS IN CHILDREN WITH ACUTE OSTEOMYELITIS IN THE *IN VITRO* SYSTEM

Chudilova G.A.^a, Teterin Yu.V.^a, Chapurina V.N.^a, Chicherev E.A.^a, Tarakanov V.A.^a, Nesterova I.V.^{a, b}

¹ Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. The problem of acute osteomyelitis in children is of special importance among the inflammatory diseases of musculoskeletal system, due to infectious conditions arising in the body and spreading to the bone tissue caused by impaired immune regulation, first of all, concerning neutrophilic granulocytes. Of interest is studying the subsets of neutrophilic granulocytes arising when the cells are involved into the inflammatory process in acute pediatric osteomyelitis, and determining the opportunity to influence the level of receptor expression aiming for correction of their functions. The purpose of our study was to evaluate the effect of hexapeptide arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine on the altered phenotype of neutrophilic granulocytes in children with acute osteomyelitis using an *in vitro* experimental model. We examined the peripheral blood samples from children with acute hematogenous or post-traumatic osteomyelitis at the age of 10 to 17 years (n = 12) upon their admission to the hospital, and from healthy children (n = 7). Blood samples from children with acute osteomyelitis were incubated with hexapeptide (10⁻⁶ g/L) for 60 min, at 37 °C. The content of neutrophilic granulocyte subsets (CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ and CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺), expression density of appropriate membrane receptors were assessed by flow cytometric technique (FC 500 "Beckman Coulter", USA). Phagocytic function was studied by assessing the degree of completed phagocytosis of *S. aureus*. It was found that, in acute osteomyelitis, a 8.5-fold increased proportion of activated CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺NG subset with the CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{dim}NG phenotype was revealed, along with a decrease in the CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻NG subset and changes in the CD16^{dim}CD62L^{bright}CD11b^{mid}CD63⁻NG phenotype as compared with reference indexes of healthy children. At the same time, an increased number of actively phagocytic cells was noted, however, with decreased indexes characterizing capture and digestion of the bacterial antigen. In the *in vitro* experiments, the tested hexapeptide was shown to modulate the phenotypes of both studied subsets (CD16^{bright}CD62L^{mid}CD11b^{mid}CD63⁻ and CD16^{mid}CD62L^{mid}CD11b^{mid}CD63^{dim}NG), thus promoting restoration of the receptor expression levels to the reference group values, as well as phagocytic activity, in terms of uptake and digestive capacity of microbial cells. Thus, the dominance of a diagnostically significant activated CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺ neutrophil subset with the CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{dim}NG phenotype was found in acute osteomyelitis in children. The results of *in vitro* studies have shown that the hexapeptide caused phenotypic modulation of the CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ neutrophils, and CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺NG subsets, along with recovery of their phagocytic activity. In the future, our results may provide a basis for the development of new effective therapeutic regimens.

Keywords: neutrophilic granulocytes, subset phenotypes, acute osteomyelitis, hexapeptide, children

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 121031000071-4.

Введение

Трудно поддающиеся лечению глубокие инфекции, такие как остеомиелит (ОМ), остаются серьезной проблемой здравоохранения во всем мире [1, 5, 8] ОМ у детей отмечается в период укрепления и формирования костей. Причинами являются инфекционные процессы, возникшие в организме и распространившиеся на костную ткань при различных дисрегуляторных процессах иммунной системы. *S. aureus* из-за уникальной способности внедряться, колонизировать и размножаться в костной ткани является высоко специфическим патогеном при ОМ [1].

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) хорошо известны своим вкладом в антимикробную защиту, эффективно уничтожая *S. aureus* посредством фагоцитоза, продукции антимикробных пептидов, активных форм кислорода, секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов и образования нейтрофильных внеклеточных ловушек [7]. При этом дисфункции НГ связаны с различными воспалительными сигналами в патогенезе инфекции. *S. aureus* может выживать в фагоцитирующих НГ и в непрофессиональных фагоцитах остеоцитах и остеобластах в костной нише [9]. Процесс интернализации внутрь этих клеток достигается с помощью MSCRAMMs FnBPA и FnBPB, связывающихся с фибриногеном и соединяющихся с интегринами $\alpha 5\beta 1$ на НГ или макрофагах [4]. Кроме того, MSCRAMM, такие как ClfA, ClfB, поверхностно-заякоренные белки (SdrC, SdrD и SdrE) и поверхностный белок SasG, способствуют агрегации бактерий и образованию биопленок на различных биологических поверхностях [4]. *S. aureus* препятствует комплемент-опосредованной опсонизации и фагоцитозу за счет секреции белков вирулентности — CHIPS, SCIN, CoA и внеклеточного фибриноген-связывающего белка (Efb) [4]. НГ, моноциты и, в меньшей степени, Т-клетки рекрутируются в зону инфекционного воспаления, где сформирована бактериальная биопленка [6]. В ответ на это вырабатываются и высвобождаются хемокины, такие как CXCL8, IL-1 β , или воспалительные белки макрофагов CXCL2 и CCL3, которые впоследствии привлекают и активируют еще большее количество НГ, создавая воспалительную микросреду, которая способствует образованию костно-резорбирующих остеокластов [6]. Основными гистопатологическими находками при ОМ являются нейтрофильные инфильтраты, определяемые в них живые микроорганизмы, тромбированные кровеносные сосуды, что свидетельствует о дефектном функционировании НГ. Способность НГ к роллингу,

хемотаксису и готовности включения микробного арсенала зависит от поверхностных мембранных рецепторов CD62L (селектин L, LAM), CD16 (Fc γ RIII), CD63 (тетраспанин LAMP-3), CD11b (Mac-1, CR3A). Рецептор адгезии CD62L необходим для перемещения НГ к очагу воспаления. CD63 — основной компонент мембраны лизосом и белок-посредник в передаче сигналов, влияющий на созревание и активацию НГ, оказывая регуляторное воздействие на адгезивную активность CD11/CD18. По уровню экспрессии CD63 можно судить об интенсивности активности миелопероксидазы [3]. CD11b (в присутствии субъединицы CD18) с миелопероксидазой индуцирует запуск каскада внутриклеточных сигнальных адаптерных структур, которые приводят к регулируемой дегрануляции НГ, активности NADPH-оксидаз и увеличению поверхностной экспрессии как CD11b, CD16 так и CD64 (Fc γ RI), CD32 (Fc γ RII), TLR, CD40, CD80, CD86, HLA-DR в аутокринной манере [3]. Учитывая высокую пластичность рецепторного аппарата НГ и появление разных субпопуляций НГ при включении клетки в воспалительный процесс, интерес представляет их определение при ОМ и оценка возможности влияния на уровень экспрессии молекул иммунотропными препаратами для корректировки их функций. В этой связи целью нашего исследования явилась оценка влияния гексапептида (ГП)-аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на измененный фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ и CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺ детей с острым остеомиелитом в эксперименте *in vitro*.

Материалы и методы

Исследованы образцы периферической крови (ПК) детей 10-17 лет (n = 12) с острым остеомиелитом гематогенным или посттравматическим (ОМ) в первый день поступления в хирургический стационар (группа 1) и 7 условно здоровых детей сопоставимых по возрасту (группа сравнения). ПК детей с ОМ инкубировали с ГП (в концентрации 10⁻⁶ г/л) в течение 60 мин при T 37 °C. ГП — синтетический аналог активного центра гормона тимуса — тимопоэтина, который обладает всеми биологическими активностями нативного гормона тимуса [2]. Известно, что ГП связывается с рецепторами на различных клетках иммунной системы, в том числе на НГ, обладает иммунорегуляторными свойствами, способен восстанавливать баланс окислительно-антиокислительных реакций, инактивировать свободно-радикальные и перекисные соединения.

Проводили цитофлуориметрическую оценку доли содержания в ПК НГ субпопуляций CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ и CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺ с учетом плотности экспрессии мембранных

рецепторов по показателю интенсивности флуоресценции (MFI) (FC 500, Beckman Coulter, США; МКАТ, Beckman Coulter International S.A., Франция). Параллельно исследовали фагоцитарные функции НГ: тестировали содержание активно-фагоцитирующих НГ (%ФАН); определяли объем захваченного бактериального материала (*S. aureus*, штамм 209) по показателям фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ); для оценки завершения фагоцитарного акта-переваривания определялся процент переваривания (%П), индекс переваривания (ИП).

Статистическую обработку данных осуществляли в компьютерных программах Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2010. После оценки нормальности распределения лабораторных показателей использовали непараметрические статистических критерии Вилкоксона–Манна–Уитни. Результаты представляли в виде медианы (верхний и нижний квартиль) – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Статистически значимые различия определяли при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

При тестировании НГ условно здоровых детей в ПК отмечалось наличие двух субпопуляций CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ и CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺. Доля субпопуляций CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ составляла 89,5 (81,5-96,8) %, а CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺НГ – 7,5 (0,3-8,7) %. Обе субпопуляции статистически значимо не отличались по уровню экспрессии поверхностных мембранных рецепторов CD16 и CD11b НГ (p > 0,05). При этом преобладающая субпопуляция имела более высокий уровень MFI CD62L – 7,1 (5,4-9,3) против 4,5 (3,5-8,8) на субпопуляции НГ дополнительно экспрессирующей CD63 с MFI 2,2 (1,7-3,2) (табл. 1).

При исследовании НГ ПК детей с ООМ выявлено значимое увеличение доли CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺НГ в 8,5 раз по сравнению с показателями определяемыми в группе сравнения (p < 0,05). Также на мембране НГ данной субпопуляции установлено усиление

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ГЕКСАПЕПТИДА НА ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИЙ CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ И CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. EFFECT OF HEXAPEPTIDE ON PHENOTYPE OF CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻ AND CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺ NEUTROPHIL GRANULOCYTES SUBPOPULATIONS OF CHILDREN WITH ACUTE OSTEOMYELITIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	Группа сравнения Comparison group	Группа 1 Group 1	Группа 1 + ГП Group 1 + HP
CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻НГ CD16 ⁺ CD62L ⁺ CD11b ⁺ CD63 ⁻ NG			
НГ, % NG, %	89,5 (81,5-96,8)	36,9* (20,8-52,0)	41,0* (30,3-45,5)
MFI CD16	129,5 (115,7-131,7)	115,0* (97,5-105,0)	127 [^] (106,0-159,5)
MFI CD62L	7,1 (5,4-9,3)	11,2* (10,9-13,5)	10,5 (9,1-12,0)
MFI CD11b	16,40 (9,6-20,9)	17,8 (16,2-27,5)	11,1 (9,3-14,5)
CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺НГ CD16 ⁺ CD62L ⁺ CD11b ⁺ CD63 ⁺ NG			
НГ, % NG, %	7,5 (0,3-8,7)	64,0* (48,6-82,5)	56,6* (51,7-68,4)
MFI CD16	127,0 (112,7-130,0)	137* (130,5-160,0)	122,5 [^] (109,5-128,8)
MFI CD62L	4,5 (3,5-8,8)	11,2* (9,8-13,1)	10,2 (9,7-12,0)
MFI CD11b	15,4 (14,9-15,9)	26,0* (17,2-39,8)	13,4 [^] (10,4-16,5)
MFI CD63	2,2 (1,7-3,2)	1,4 (1,3-1,7)	1,3 (1,2-1,4)

Примечание. * – различия между показателями группы 1 и группы сравнения, p < 0,05; ^ – различия между показателями группы 1 и группы 1 + ГП, p < 0,05.

Note. *, differences between the indicators of group 1 and the comparison group, p < 0.05; ^, differences between the indicators of group 1 and group 1 + HP, p < 0.05.

экспрессии поверхностных рецепторов CD16, CD62L, CD11b, на фоне неменяющегося MFI CD63, который значимо не отличался от показателей группы сравнения (табл. 1).

В группе 1 показано снижение доли субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻НГ ($p < 0,05$). Кроме того эта субпопуляция характеризовалась более низкой MFI CD16 ($p < 0,05$) и повышенными уровнями MFI CD62L ($p < 0,05$) и CD11b ($p > 0,05$) (табл. 1).

Таким образом, при ООМ отмечается увеличение количества НГ активированной субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺НГ с фенотипом CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{dim}НГ. Известно, что активированные НГ обладают высоким цитотоксическим и протеолитическим потенциалом, а также способностью повреждению тканей [3]. Кроме этого наблюдается негативное изменение рецепторного оснащения 2-й субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻НГ с формированием фенотипа CD16^{dim}CD62L^{bright}CD11b^{mid}CD63⁻НГ, который отличается повышенной способностью мигрировать в очаг воспаления, но обладает пониженным биоцидным потенциалом. Если предположить, однако, что бактерии организованы в виде биопленки и что инфильтрация в эту биопленку необходима для фагоцитоза бактерий, наши данные могут в некоторой степени объяснить, почему, несмотря на активацию, НГ не в состоянии контролировать инфекцию, но при этом высвобождают свой цитотоксический, протеолитический и коллагенолитический потенциал. Так обнаружено, что показатели фагоцитарной функции НГ в ПК детей с ООМ статистически значимо отличались от показателей группы сравнения, наблюдалось увеличение количества активно фагоцитирующих НГ (%ФАН) до 66 (58,5-71,1) % против 55 (50,0-57,0) %, что свидетельствовало об активации ответа на инфекционный процесс. Однако отмечалось снижение показателей, характеризующих процессы захвата бактериального антигена – ФЧ 3,8 (2,8-3,9) против 4,84 (4,1-7,05) $p < 0,05$; ФИ 2,3 (2,0-2,7) против 2,71 (2,2-3,73) в группе сравнения. На этом фоне показано снижение %П 47,8 (47,2-54,0) % против 62,64 (57,9-62,92) % и ИП

1,28 (1,02-1,31) против 1,57 (1,34-1,88) в группе сравнения ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$).

Инкубация ПК детей с ООМ в системе *in vitro* с ГП позволила выявить модулирующие эффекты на фенотип НГ изучаемых субпопуляций при ООМ.

Показано усиление экспрессии MFI CD16 ($p < 0,05$), на фоне снижения MFI CD62L ($p > 0,05$) и CD11b ($p > 0,05$) в субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻НГ – с приобретением фенотипа CD16^{bright}CD62L^{mid}CD11b^{mid}CD63⁻ (табл. 1). При этом эффекты влияния ГП на субпопуляцию CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺НГ проявлялись снижением MFI CD16 ($p < 0,05$) и MFI CD62L ($p > 0,05$) и CD11b ($p < 0,05$). Под действием ГП плотность экспрессии CD63 не менялась – CD16^{mid}CD62L^{mid}CD11b^{mid}CD63^{dim}НГ. Ожидается, что снижение способности к миграции НГ из кровеносного сосуда в инфицированный участок, снизит негативное влияние активированных при ООМ клеток. Интересно отметить, что на фоне перераспределения оснащенности рецепторами, снижения уровня молекул обеспечивающих хемотаксис, при анализе фагоцитарной функции НГ отмечалось восстановление функций переваривания (%П-57,4 (53,6-61,1); ИП-1,6 (1,3-1,8), на фоне интенсивного захвата *S. aureus* (%ФАН – 76 (70-77); ФЧ – 3,6 (3,3-3,9), ФИ – 2,7 (2,4-3,1).

Заключение

Таким образом, установлено значительное доминирование диагностически значимой активированной субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺НГ с фенотипом CD16^{bright}CD62L^{bright}CD11b^{bright}CD63^{dim}НГ. Показано, что гексапептид в эксперименте *in vitro* модулирует фенотипы субпопуляций CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁻НГ и CD16⁺CD62L⁺CD11b⁺CD63⁺НГ, приближая их к значениям группы сравнения при этом восстанавливая фагоцитарную активность клеток. В перспективе это даст возможность разработке наиболее эффективных терапевтических схем лечения, сократить продолжительность антибиотикотерапии, ускорить купирование воспалительного процесса, значительно снизив рост серьезных осложнений.

Список литературы / References

1. Гаврилюк В.П., Статина М.И., Северинов Д.А., Машошина Л.О. Иммуные и метаболические нарушения при остром гематогенном остеомиелите у детей // Вятский медицинский вестник, 2022. № 1 (73). С. 90-96. [Gavrilyuk V.P., Statina M.I., Severinov D.A., Mashoshina L.O. Immune and metabolic disorders in acute hematogenous osteomyelitis in children. *Vyatskiy meditsinskiy vestnik = Vyatka Medical Bulletin*, 2022, no. 1 (73), pp. 90-96. (In Russ.)]
2. Кологривова Е.Н., Плешко Р.И., Щербик Н.В., Староха А.В., Чичинская Э. Влияние интраназального применения Имунофана на активность фагоцитов при комплексной терапии экссудативного среднего отита у детей // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 741-750. [Kologrivova E.N., Pleshko R.I., Scherbik N.V., Starokha A.V., Chichinskaya E. Effects of intranasal Imunofan administration upon phagocytic activity in treatment of exudative otitis media in children. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2020, Vol. 22 (4), pp. 741-750. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-EOI-1720.

3. Нейтрофильные гранулоциты: отражение в зеркале современных представлений. Под ред. Нестеровой И.В., Чудиловой Г.А. UK, USA, Moscow: Capricorn Publishing, 2018. 338 с. [Neutrophil granulocytes: reflection in the mirror of modern ideas. Ed. Nesterova I.V., Chudilova G.A. UK, USA]. Moscow: Capricorn Publishing, 2018. 338 p.
4. Brandt S.L., Putnam N.E., Cassat J.E., Serezani C.H. Innate immunity to staphylococcus aureus: evolving paradigms in soft tissue and invasive infections. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, pp. 3871-3880.
5. Bryan A.J., Abdel M.P., Sanders T.L., Fitzgerald S.F., Hanssen A.D., Berry D.J. Irrigation and debridement with component retention for acute infection after hip arthroplasty: improved results with contemporary management. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 2017, Vol. 99, no. 23, pp. 2011-2018.
6. Dapunt U., Giese T., Maurer S., Stegmaier S., Prior B., Hänsch G.M., Gaida M.M. Neutrophil-derived MRP-14 is up-regulated in infectious osteomyelitis and stimulates osteoclast generation. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 98, no. 4, pp. 575-582.
7. Rigby K.M., DeLeo F.R. Neutrophils in innate host defense against Staphylococcus aureus infections. *Semin. Immunopathol.*, 2012, Vol. 34, pp. 237-259.
8. Tande A.J., Patel R. Prosthetic joint infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2014, Vol. 27, no. 2, pp. 302-345.
9. Yang D., Wijenayaka A.R., Solomon L.B., Pederson S.M., Findlay D.M., Kidd S.P., Atkins G.J. Novel insights into staphylococcus aureus deep bone infections: the involvement of osteocytes. *mBio*, 2018, Vol. 9, no. 2, e00415-18. doi: 10.1128/mBio.00415-18.

Авторы:

Чудилова Г.А. — д.б.н., доцент, заведующая отделом клинко-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Тетерин Ю.В. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чапурина В.Н. — ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чичерев Е.А. — аспирант кафедры хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Тараканов В.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинко-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; профессор кафедры аллергологии и иммунологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Authors:

Chudilova G.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Teterin Yu.V., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chapurina V.N., Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chicherev E.A., Postgraduate Student, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Tarakanov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Allergology and Immunology, Faculty of Continuing Medical Education, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

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

Абрамова Н.Д.485	Демченко Е.Н.423	Кузнецов Г.Л.411	Пашкова Т.М.477	Тулюпова М.С.561
Абрамовских О.С.363	Добрынина М.А.431	Купцова Д.Г.453, 491	Петричук С.В.453, 491	Федянина Л.Н.541
Актанова А.А.369	Егоренкова О.А.419	Курбатова О.В.453, 491	Пиктурно С.Н.445	Федяшев Г.А.515
Алексеева А.С.399	Еремеев В.В.505	Лазарев В.В.499	Пономарева Н.Ю.499	Фейзер А.А.379
Андреева И.И.529	Зверев В.В.485	Литвинова Л.С.411	Потапов А.С.453, 491	Филиппова Ю.Ю.399
Анушенко А.О.453	Зурочка А.В.431	Логонова Ю.В.363	Радаева О.А.505	Фисенко А.П.453, 491
Атажахова М.Г.375	Зурочка В.А.431	Ломтатидзе Л.В.445	Радыгина Т.В.453, 491	Фомина О.И.541
Барило А.А.379	Казо М.Е.399	Ло Ш.431	Ручкин М.П.515	Харитонов М.В.529
Барковская М.Ш.385	Карташова О.Л.477	Малиновская В.В.445	Рябова Л.В.431	Хасанова А.А.549
Безруканникова Л.М.453	Кириенкова Е.В.411	Маркелова Е.В.515, 561	Сарапульцев А.П.431	Ху Д.431
Бершвили М.Т.393	Кныш А.А.437	Материкин А.И.405	Сафиуллина Л.А.411	Чагина Е.А.437, 541
Бесшейнов Д.Д.505	Кныш С.В.437, 561	Матюшкина Л.С.561	Свитич О.А.405, 485	Чапурин В.Н.465, 571
Богданова Е.А.485	Ковалева С.В.445	Машнина С.В.505	Севастьянов П.В.385	Черемохин Д.А.555
Боева О.С.393	Коваленко Е.А.369	Мовсисян Г.Б.453	Семякина Е.Л.491	Черешнев В.А.555
Болков М.А.555	Коваленко С.Н.471	Монашенко Д.Н.471	Сенникова С.В.521	Черкасова Ю.С.437
Бурмистрова А.Л.399	Козлов В.А.385, 423	Москалец О.В.461	Серебрякова М.К.471	Черникова А.А.437
Быстрицкая Е.П.405	Комар А.А.411	Мурашкин Н.Н.405, 491	Сизиков А.Э.393	Черникова М.А.561
Вартанова Н.О.405, 485	Комарова А.Д.453	Наумова Е.А.405	Сизякина Л.П.529	Чичерев Е.А.571
Вольский Н.Н.423	Комелькова М.В.431	Невжекина Т.А.437, 561	Симбирцев А.С.505	Чудилова Г.А.375, 445, 465, 571
Воробьев С.В.471	Коробова З.Р.471	Негоднова Е.В.505	Скляр Л.Ф.437	Шевченко К.Г.561
Вульф М.А.411	Костина Ю.А.505	Нестерова И.В.375, 445, 465, 571	Смирнова С.В.379	Шинвари Х.555
Гаврилова Е.Д.423	Костин М.П.549	Норка А.О.471	Соловьева И.Л.549	Шуплецова В.В.419
Газатова Н.Д.411	Кочетков А.В.499	Пак А.В.485	Сумеркина В.А.535	Ющук В.Н.515
Гойман Е.В.423	Кошелев Р.В.499	Пашинина О.А.477	Тараканов В.А.465, 571	Яковлева И.В.405, 485
Головнева Е.С.535	Красников В.Е.541	Пашкина Е.А.369, 393	Телешева Л.Ф.535	
Гончаров А.Г.419	Крутова В.А.445	Пашков Е.А.485	Тетерин Ю.В.571	
Грищенко В.А.477	Кудрявцев И.В.471	Пашков Е.П.485	Топтыгина А.П.521	
Демина Д.В.385	Кузнецова Р.Н.471		Тузанкина И.А.555	

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адипокины 535	иммуномодулирующая терапия .. 521	острая деструктивная пневмония 466	ушиб головного мозга 472
адипонектин 506	иммунофенотипирование 472	острого остеомиелит 572	фагоцитоз 363
аллерген-специфическая иммунотерапия 386	инсулинорезистентность 535	острое повреждение почек 542	фенотип 446
аллергены 380	интерлейкины 370	папилломавирусная инфекция .. 562	фенотипическая гетерогенность .. 423
аллергический ринит 386	инфекция 380	первичные иммунодефициты .. 555	фенотипические особенности .. 394
аллергия 380	ишемическая болезнь сердца ... 542	персонализированный подход .. 500	фенотип субпопуляций 466, 572
антицитокиновая активность ... 478	Калининградская область 420	популяционный иммунитет 420	фиброз печени 454
аортокоронарное шунтирование 542	капиллярная кровь 521	постковид 506	функциональная активность нейтрофилов 363
атопический дерматит 406	кателицидин 406	постковидные пациенты 431	хронические воспалительные заболевания 446
болезнь Вильсона–Коновалова .. 454	клетки крови 370	постковидный период 376, 550	хроническое воспаление 399
бронхиальная астма 386	клиническое наблюдение 462	постковидный синдром 376, 500	цитокиноподобные вещества ... 478
вакцинация 420, 506	когнитивная недостаточность .. 399	провоспалительные цитокины .. 562	цитокины 370, 394, 438, 515, 535, 542
ВАНР 438	коморбидность 500	противовоспалительные цитокины 562	человеческий β-дефенсин 1 406
ВЗК 492	кукурбитурилы 370	противомикробные пептиды ... 406	черепно-мозговая травма 472
вирус гриппа 486	лактоферрин 550	проточная цитометрия 454	экспериментальная модель СКВ 423
вирусы гриппа 420	лейкоциты 399	проточная цитометрия с визуализацией 492	экспрессия 486
ВИЧ 438	лептин 506	проточная цитофлуориметрия .. 472	экспрессия генов 406
внуклеточная ДНК 423	лимфолиферация 462	псориаз 521	эпидемиологический процесс 420
воспаление 472	лимфоциты 454, 492	реабилитация 500	В-лимфоциты 386, 431, 529
врожденные лимфоидные клетки 394	ЛПС 423	ревматоидный артрит 394	CD46 431
врожденные ошибки иммунитета 555	матриксные металлопротеиназы .. 515	регуляторные Т-лимфоциты 386	COVID-19 376, 506, 529, 550
врожденный иммунитет .. 363, 406, 438, 542	местный иммунитет 363	рекомбинантный IFNα2b 446	Enterococcus 478
вульгарный псориаз 492	метаболический синдром .. 506, 535	ремоделирование 466	ERBB сигнальный путь 412
гамма-фракция белков 462	микроРНК 399	респираторные вирусные инфекции 486	Helicobacter pylori 380
гастроинтестинальные проявления 380	миРНК 486	ретроспективный анализ 555	IFNα2b 550
гексапептид 466, 572	молекулярная диагностика 500	РНК-интерференция 486	IL-1β 486
гипертоническая болезнь 412	молекулярно-генетическая диагностика 555	С-реактивный белок 376	IL-6 506
гормональная терапия 521	моноциты 521	СД 2-го типа 412	Inosine pranobex 562
гранулематозный некротизирующий лимфаденит 462	мукозальный иммунитет 550	секреторный иммуноглобулин А 550	KREC 555
гуморальное звено системы иммунитета 472	невываивание беременности .. 363	синдром Гийена–Барре 500	LIF 506
дети 380, 454, 492, 572	нейрегулин-4 412	синдром хронической усталости 376	NF-κB 492
диабетическая ретинопатия 515	нейродегенерация 515	синтетический аналог ГМ-КСФ – пептид ZP2 478	SARS-CoV-2-инфекция 431
диагностика 399	нейрокогнитивная дисфункция .. 438	сосудистая деменция 399	sIL-6 506
дисфункция висцеральной жировой ткани 535	нейропептиды 515	специфический иммунитет 529	Solanum tuberosum 562
иммунная система 431	нейтрофилы 363	старость 399	TNK-лимфоциты 431
иммунобезопасность 370	нейтрофильные гранулоциты 376, 446, 466, 572	субпопуляции лимфоцитов 521	TREC 555
иммуноглобулины 462	новая коронавирусная инфекция 500	субпопуляционный состав 394	T-клетки 431
	ОВИН 462, 529	тест Мюнстерберга 438	T-лимфоциты 431, 529
	ожирение 412	титры антител 420	T-хелперы 386
	органы малого таза 446		

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
ПРЕССА РОССИИ – 15590**

ISSN 1028-7221



9 771234 567898