

Том 26, № 2. С. 99-202

2023

Официальный журнал
Российского Научного Общества Иммунологов

**РОССИЙСКИЙ
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ**



**RUSSIAN JOURNAL
OF IMMUNOLOGY**

Official Journal
of Russian Society of Immunology

Volume 26
Number 2

2023

РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИММУНОЛОГОВ
(РНОИ)

РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

апрель-июнь

2023, том 26

№. 2

Основан в 1996 году

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

Купраш Дмитрий Владимирович – член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук, Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгарда 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

Полторах Александр – профессор, Школа биомедицинских наук имени Саклера, Университет Тафтса, 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 ФНКИ детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва, Россия

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

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

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

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

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

Стокингер Ганс – Венский медицинский университет, Центр патофизиологии, инфекциологии 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

Ответственные секретари:

Ризопулу А.П., д.б.н. (Москва)

Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)

E-mail: rusimmun@gmail.com

Редактор перевода:

Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)

Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

Редакция журнала «Российский иммунологический журнал»

197101, Санкт-Петербург, а/я 130

Электронная версия: www.rusimmun.ru

© Российский иммунологический журнал

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

Данный материал распространяется по лицензии

Creative Commons Attribution 4.0 License.

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

Шварц Герберт – Школа медицины Йонг Лу Лин Национального университета Сингапура

Редакционный совет

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

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

Глушков Андрей Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, директор Института экологии человека Федерального исследовательского Центра угля и углекислоты 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

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

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

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

Топтыгина Анна Павловна – доктор медицинских наук, НИИ эпидемиологии и микробиологии имени 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

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

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

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

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

Издательство «Человек»

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

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 30.06.2023 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 13. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.)

Заказ № 039

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

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

Тел.: (812) 950-10-99.

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

RUSSIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY
(RSI)

RUSSIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY

ROSSIYSKIY IMMUNOLOGICHESKIY ZHURNAL

April-June

2023, volume 26

No. 2

Published since 1996

Editor-in-chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

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

Editorial board

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

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

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

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

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

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

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

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

Musa R. Khaitov – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, State Scientific Center "Institute of Immunology", FMBA of Russia, 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. Nevinny – Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

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

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

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

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

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

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

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)

This material is distributed under the Creative Commons Attribution 4.0 License.

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

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

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

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

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

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

Konstantin V. Shmigel – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Professor, Department of Immunology, Perm State 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. Poptygina – MD, PhD, Professor, Chief, Laboratory of Cytokines, Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

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

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

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

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 30.06.2023. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 13. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

199178, Russian Federation, St. Petersburg, 8 line of Vasilievsky Island,

83/1-A

Phone: (812) 950-10-99

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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Хлыстова К.А., Саркисян Н.Г., Катаева Н.Н.
ПРИРОДНЫЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ В АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ 105

Оригинальные статьи

Костоломова Е.Г., Стрелин С.А., Суховой Ю.Г., Унгер И.Г., Акунеева Т.В., Марков А.А., Полянских Е.Д.
ФУНКЦИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В ЗАЖИВЛЕНИИ РАН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO* 115

Осиков М.В., Агеева А.А., Бойко М.С., Агеев Ю.И.
ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ЛОКАЛЬНОГО И СИСТЕМНОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕЛАТОНИНА
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ 123

Цинъю Ху, Хаоян Ванг
УЧАСТИЕ PAR2 В ВЫХОДЕ МЕДИАТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ ИЗ ЭОЗИНОФИЛОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА 129

Микрюкова Н.В., Калинина Н.М.
РОЛЬ SP В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЫ 141

Серебрякова М.К., Ильвес А.Г., Лебедев В.М., Новоселова О.М., Прахова Л.Н., Кудрявцев И.В.
СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ 149

Костарев С.Н., Середа Т.Г.
ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ В ПЕРИОД 2020-2021 гг. 161

Асфандиярова Н.С., Рубцова М.А.
МОЖЕТ ЛИ ДИСФУНКЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА РАССМАТРИВАТЬСЯ КАК ПРИЗНАК ПОСТКОВИДНОГО
СИНДРОМА? 173

Краткие сообщения

Гребенников Д.С., Желткова В.В., Савинков Р.С., Бочаров Г.А.
МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ: ПРОЦЕССЫ, МОДЕЛИ И УСВОЕНИЕ ДАННЫХ 181

Васильев Р.М., Васильева С.В.
ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ВАГИНАЛЬНОМ СЕКРЕТЕ БОЛЬНЫХ
ГЕНИТАЛЬНЫМ МИКОПЛАЗМОЗОМ КОРОВ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ ТУЛАТРОМИЦИНОМ 189

Юбилей 195

Правила для авторов 199

Авторский указатель 202

Предметный указатель 202

CONTENTS

Reviews

Khlystova K.A., Sarkisyan N.G., Kataeva N.N.

NATURAL AND SYNTHETIC PEPTIDES IN ANTIMICROBIAL THERAPY 105

Original articles

Kostolomova E.G., Strelin S.A., Sukhovei Yu.G., Unger I.G., Akuneeva T.V., Markov A.A., Polyanskikh E.D.

FUNCTION OF HUMAN SKIN T CELLS IN WOUND HEALING IN THE *IN VITRO* EXPERIMENTAL SETTING 115

Osikov M.V., Ageeva A.A., Boyko M.S., Ageev Yu.I.

IMMUNOREGULATORY EFFECTS OF LOCAL AND SYSTEMIC USE OF MELATONIN IN EXPERIMENTAL THERMAL TRAUMA 123

Xinyu Hu, Haoyang Wang

INVOLVEMENT OF PAR2 IN INFLAMMATORY MEDIATOR RELEASE FROM HUMAN BLOOD EOSINOPHILS 129

Mikryukova N.V., Kalinina N.M.

ROLE OF SUBSTANCE P IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC URTICARIA 141

Serebriakova M.K., Ilves A.G., Lebedev V.M., Novoselova O.M., Prakhova L.N., Kudryavtsev I.V.

CYTOTOXIC T CELL SUBSETS IN PERIPHERAL BLOOD AND CEREBROSPINAL FLUID FROM PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS 149

Kostarev S.N., Sereda T.G.

STUDIES OF IMMUNE PARAMETERS IN ADOLESCENTS OVER THE PERIOD OF 2020-2021 161

Asfandiyarova N.S., Rubtsova M.A.

MAY BE DYSFUNCTION OF CELLULAR IMMUNITY CONSIDERED A SIGN OF POST-COVID SYNDROME? 173

Short communications

Grebennikov D.S., Zheltkova V.V., Savinkov R.S., Bocharov G.A.

MATHEMATICAL IMMUNOLOGY: PROCESSES, MODELS AND DATA ASSIMILATION 181

Vasiliev R.M., Vasilieva S.V.

DYNAMICS OF THE CONTENT OF IMMUNOGLOBULINS IN THE BLOOD SERUM AND VAGINAL SECRETION OF COWS WITH GENITAL MYCOPLASMOSIS DURING TREATMENT WITH TULATHROMYCIN 189

Anniversaries 195

Instructions to Authors 199

Author index 202

Subject index 202

ПРИРОДНЫЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ В АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ

Хлыстова К.А.¹, Саркисян Н.Г.^{1,2}, Катаева Н.Н.²

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

² ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Антимикробная функция врожденного иммунитета реализуется с помощью низкомолекулярных пептидов, активных в отношении бактерий, грибов и некоторых вирусов. В обзоре представлены данные об исследованиях как природных, так и синтетических пептидов, касающиеся особенностей их строения и терапевтического эффекта. Как правило, молекулы таких пептидов заряжены положительно за счет радикалов аминокислот, способных к протонированию. В пространстве молекулы антимикробных пептидов организованы как α -спирали или β -слои в чистом или смешанном составе. При этом короткие цепочки, включающие до 18 аминокислотных остатков, существуют в линейной или циклической форме, оставаясь на уровне первичной пространственной структуры. Природные антимикробные пептиды преимущественно продуцируются нейтрофильными гранулоцитами и макрофагами, а также эпителиальными клетками барьерных органов. Наиболее изучены три семейства природных антимикробных пептидов: дефензины, кателицидины и гистатины. Дефензины активны в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусов и грибов, обладают противовоспалительной и иммуномодулирующей активностью. Кателицидины являются хемоаттрактантами и обладают антибактериальным, иммуномодулирующим, ранозаживляющим, противоопухолевым действием, при этом, могут способствовать развитию аутоиммунных заболеваний. Гистатины обладают выраженным фунгицидным действием, препятствуют биопленкообразованию бактерий. Подробное изучение строения и принципов действия природных антимикробных пептидов позволило применить эту информацию для синтеза пептидов *in vitro* и сделать возможным создание на их основе лекарственных препаратов разнонаправленного действия. Синтетические пептиды WR12 и D-1K8 за счет мембранной пермеабилзации обеспечивают доставку антибиотиков в инфицированные или опухолевые клетки. При этом синтетический пептид – аципенсин-1 способен сам проникать в опухолевые клетки человека без их повреждения. Иммуномодулирующий пептид глутоксим эффективно применяется при противотуберкулезной терапии. Пептид ZP2 активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора эффективен в отношении грамотрицательных бактерий *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, а также вируса Эпштейна–Барр.

Адрес для переписки:

Катаева Наталья Николаевна
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
620026, Россия, г. Екатеринбург, ул. Декабристов, 32.
Тел.: 8 (343) 214-85-11.
E-mail: kataeva.nn@mail.ru

Address for correspondence:

Natalia N. Kataeva
Ural State Medical University
32 Dekabristov St
Yekaterinburg
620026 Russian Federation
Phone: +7 (343) 214-85-11.
E-mail: kataeva.nn@mail.ru

Образец цитирования:

К.А. Хлыстова, Н.Г. Саркисян, Н.Н. Катаева
«Природные и синтетические пептиды
в антимикробной терапии» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 2. С. 105-114.
doi: 10.46235/1028-7221-12362-NAS

© Хлыстова К.А. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

K.A. Khlystova, N.G. Sarkisyan, N.N. Kataeva “Natural and
synthetic peptides in antimicrobial therapy”, *Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*, 2023,
Vol. 26, no. 2, pp. 105-114.
doi: 10.46235/1028-7221-12362-NAS

© Khlystova K.A. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-12362-NAS

Тимические иммунорегуляторные пептиды – бестим, гепон, тимоген и имунофан являются индукторами выработки эндогенных α - и β -интерферонов, тормозят развитие злокачественных новообразований, проявляют противовоспалительную активность. Гепон используют в лечении вирусных гепатитов, респираторных и оппортунистических инфекций, синдроме крупа и инфекций передающихся половым путем (в том числе генитального герпеса). Таким образом, синтетические антимикробные пептиды широко применяются в комплексных схемах лечения наряду с традиционными антибиотиками, противовирусными, противоопухолевыми препаратами, что позволяет достигать высокого терапевтического эффекта.

Ключевые слова: природные пептиды, синтетические пептиды, антимикробное действие, иммуномодулирующие свойства, противовоспалительная активность

NATURAL AND SYNTHETIC PEPTIDES IN ANTIMICROBIAL THERAPY

Khlystova K.A.^a, Sarkisyan N.G.^{a, b}, Kataeva N.N.^b

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

^b Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Antimicrobial function of innate immunity is mediated by the low-molecular weight peptides which are active against bacteria, fungi and some viruses. The review presents data on studies of both natural and synthetic peptides regarding the features of their structure and therapeutic effect. As a rule, the molecules of such peptides are positively charged, due to amino acid radicals capable of protonation. Spatially, antimicrobial peptide molecules are arranged as α -helices or β -layers in separate or compound assemblies. At the same time, short molecular chains, including up to 18 amino acid residues, exist as a linear or cyclic forms, remaining at the level of primary spatial structure. Natural antimicrobial peptides are predominantly produced by neutrophilic granulocytes and macrophages, as well as epithelial cells of the barrier organs. Three families of natural antimicrobial peptides have been most studied: defensins, cathelicidins, and histatins. Defensins are active against Gram-positive and Gram-negative bacteria, viruses and fungi, having anti-inflammatory and immunomodulatory activity. Cathelicidins are chemoattractants and exert antibacterial, immunomodulatory, wound healing, antitumor effects, potentially contributing to the development of autoimmune diseases. Histatins have a pronounced fungicidal effect and prevent the formation of bacterial biofilms. A detailed study on the structure and principles of action of natural antimicrobial peptides made it possible to apply this information for the *in vitro* synthesis of peptides thus making it possible to create multipurpose drugs based on them. E.g., synthetic peptides WR12 and D-IK8 ensure the delivery of antibiotics to infected or tumor cells, due to permeabilization of cellular membranes. At the same time, a synthetic peptide, acipensin 1, is capable of penetrating into human tumor cells without damaging them. The immunomodulatory peptide glutoxim is effectively used in anti-tuberculosis therapy. ZP2 peptide, the functional site of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is effective against Gram-negative bacteria (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii*) as well as Epstein–Barr virus. Thymic immunoregulatory peptides – bestim, hepon, thymogen and imunofan are inducers of endogenous α - and β -interferon production, inhibit the development of malignant neoplasms, and possess anti-inflammatory activity. Gepon is used in the treatment of viral hepatitis, respiratory and opportunistic infections, croup syndrome and sexually transmitted infections (including genital herpes). Thus, the synthetic antimicrobial peptides are widely used in complex treatment regimens along with conventional antibiotics, antiviral, and antitumor drugs, thus making it possible to achieve higher therapeutic effect.

Keywords: natural peptides, synthetic peptides, antimicrobial activity, immunomodulatory properties, anti-inflammatory activity

Введение

За последнее десятилетие отношение к инфекции изменилось. Микроорганизмы, среди которых есть как патогенные, так и непатогенные, никуда не исчезнут из нашей жизни. Организм человека по природе своей имеет множество уровней защиты и факт развития того или иного заболевания, а также степень восприимчивости организма к лекарственным препаратам, зависит от иммунного статуса. С каждым годом все больше становится пациентов с первичным иммунодефицитом, которым требуется особый подход в диагностике и лечении. На сегодняшний день поиск безопасных и эффективных препаратов для лечения хронических заболеваний остается одной из актуальных тем. При изучении врожденного иммунитета ученых заинтересовали белки, обладающие иммуномодулирующими, противомикробными и противовоспалительными свойствами [31]. С 1931 года, когда впервые Dubos R.J. выделил белок, обладающий антимикробным действием против широкого спектра грамположительных бактерий [27], а Voman H.G. с коллегами в 1981 году проанализировали и внесли ясность в принцип действия антимикробного пептида [39], интерес к данной группе не угас. В 2009 году антимикробные пептиды (АМП) впервые были применены в терапии [33]. В обзоре представлены данные об исследованиях как природных, так и синтетических пептидов, касающиеся особенностей их строения и терапевтического эффекта.

Природные антимикробные пептиды: строение, терапевтическое действие

В своей основе антимикробные пептиды содержат положительно заряженные радикалы аминокислот (суммарный заряд которых может быть от +2 до +9), т. е. являются катионными структурными единицами, общее количество аминокислотных остатков колеблется от 12 до 100 [1, 6]. В пептидной цепочке имеются гидрофобные и гидрофильные функциональные группы, разбросанные в пространстве, что обуславливает амфифильность молекул [40]. На сегодняшний день существует множество электронных баз данных о природных и синтетических антимикробных пептидах, такие как Collection of Anti-Microbial Peptides (CAMPR3) [30], Protein Data Bank, The Antimicrobial Peptide Data Base (APD) и другие. Используя электронные каталоги, возможно предсказать биологические свойства АМП по известной первичной структуре молекулы.

АМП можно классифицировать по пространственной структуре белка: α -спиральные (LL-37); β -слои, стабилизированные дисульфидными связями (протегрин-1); содержащие как α -спираль, так и β -складчатые листы (β -дефензин-2 человека), циклические (θ -дефензин-1 макаки-резус), линейные (индолицидин, пирхорицин) [6]. Кроме того АМП можно разделить на рибосомально синтезирующиеся и нерибосомально синтезирующиеся (не требуют наличия мРНК матрицы) [14].

Катионные антимикробные пептиды, которые выделяют из тканей эпителиального происхождения и нейтрофилов, характеризуются широким спектром действия. Они оказывают антигрибковое, антимикробное, противовирусное и антипротозойное действие; стимулируют пролиферацию и миграцию клеток, а также продукцию цитокинов [19]. Ученые выдвинули несколько гипотез механизма действия антимикробных пептидов, такие как модель тороидальных пор, модель молекулярной электропорации, модель ствола и другие. Повышение проницаемости мембран микроорганизмов признается как общепринятый механизм действия катионных антимикробных пептидов, которые обычно обладают мембраносвязывающей активностью. Они разрушают мембранные структуры бактерий или раковых клеток, что приводит к высвобождению содержимого клеток и в конечном итоге приводит к гибели бактерий или раковых клеток [36]. Наиболее известными и хорошо изученными являются три крупных семейства природных антимикробных пептидов: дефензины, кателицидины и гистатины.

Дефензины имеют молекулярную массу от 3,5 до 4,5 кДа, состоят из 30 аминокислотных остатков [6] и подразделяются на три основных семейства – α , β , θ . Различаются по характеру дисульфидных связей (α -дефензины образуют мосты между 1-6, 2-4, 3-5 цистеинами, β -дефензины между 1-5, 2-4, 3-6 цистеинами, θ -дефензины являются циклическими молекулами, в их сигнальной последовательности присутствует стоп-кодон, который препятствует их трансляции), они активны в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусов и грибов [25, 38, 42]. В условиях *in vitro* дефензины способны увеличивать адгезию Т-клеток через индукцию $IFN\gamma$, IL-10 и IL-6 к эпителиоцитам легочного эпителия [44]. Дефензины, полученные из тромбоцитов человека и животных, обладают цитолитической и иммуномодулирующей активностью. Они оказывают влияние на течение

воспалительных и фагоцитарных процессов. Также отмечают, что данные соединения обладают низкой токсичностью к собственным клеткам макроорганизма [19].

Кателицидины – катионные анфипатические пептиды по структуре могут быть α -спиральными, β -шпилькообразными, линейными и продуцируются в основном в нейтрофилах, клетках красного костного мозга и эпителиальных клетках [47]. Кателицидины являются хемоаттрактантами и обладают антибактериальным, иммуномодулирующим, ранозаживляющим и противоопухолевым действием [25, 35, 42]. Человеческий кателицидин LL-37 усиливает синтез IgG и активность макрофагов [45] и увеличивает эндоцитотическую активность, регулируя экспрессию генов [26]. Помимо своих антимикробных свойств он обладает многочисленными свойствами, модулирующими иммунную систему, которые могут способствовать развитию аутоиммунных заболеваний, таких как псориаз, системная красная волчанка, ревматоидный артрит [32]. Выявили повышение уровня LL-37 в десневой жидкости у пациентов с хроническими пародонтитом при ревматоидном артрите [37]. У больных атопическим дерматитом уровень LL-37 ниже, чем у детей без аллергических заболеваний. При наличии пищевой аллергии уровень LL-37 в слюне также снижен. Кроме того, на уровень АМП также влияет интенсивность кариеса и наличие гингивита [13].

Гистатины также являются катионными пептидами с высоким содержанием гистидина, присутствуют в секретах слюнных желез, обладают фунгицидным действием [38]. Гистатин проникает внутрь клетки за счет транслокации, где связывает ряд жизненно важных для клеток веществ [46]. Кроме фунгицидной активности, гистатины предупреждают агрегацию бактерий [22].

Синтетические антимикробные пептиды: строение, терапевтическое действие

В 1883 году был проведен первый пептидный синтез, немецким химиком-органиком Теодором Курциусом. В 1901 году другой немецкий химик Герман Эмиль Фишер получил первый свободный пептид глицил-глицин. Химический синтез пептидов позволяет оценить предполагаемую первичную структуру, изучить связь между структурой и активностью. Модификация структуры молекулы для изменения фармакологического действия экономически выгодней и дает модельный пептид для оценки антигенного действия [24]. Наиболее изучаемые на данный момент являются синтетические антимикробные пептиды, большинство из них получено методом

комбинаторной химии, с помощью которой можно расширить спектр действия антимикробных пептидов, снизить токсичность к собственным клеткам [9, 23]. На основе синтетических пептидов изготавливают вакцины, антибактериальные препараты, а также средства для профилактики инфекционных заболеваний различной этиологии [10, 17].

В обзорной статье Сергеев О.В., Баринский И.Ф. провели анализ результатов лабораторных испытаний синтетических пептидов в качестве вакцин против различных инфекционных заболеваний. Оказалось, что при экспериментальном заражении многие из них обладают иммуногенными свойствами и способствуют формированию специфических антител и защите от заболеваний, но этот эффект значительно ниже, чем у классических вакцин. Вероятней всего это связано с тем, что короткие синтетические пептиды не имеют необходимой конформационной организации [18].

В 2016 году Мохаммед М.Ф., Абдельхалек А. провели оценку коротких синтетических антимикробных пептидов на лечение лекарственно-устойчивых и внутриклеточных золотистых стафилококков. Объектами исследования стали короткие синтетические пептиды WR12 и D-1K8, а именно их антибактериальная активность в отношении полирезистентных стафилококков, таких как ванкомицин-резистентный *S. aureus*, линезолид-резистентный *S. aureus*, метициллин-резистентный *S. aureus*, метициллин-резистентный *S. epidermidis*. Оба пептида на модели *in vitro* значительно активней разрушали биопленки *S. aureus* и *S. epidermidis*, в сравнении с традиционными антибактериальными препаратами. Синергическое взаимодействие между пептидами и антибиотиками может быть результатом действия мембранной пермеабилитации пептидов, что приводит к активному проникновению антибиотиков внутрь бактериальных клеток и усилению их киллинга [29]. Это позволит сочетать АМП и антибиотики, при лечении устойчивой инфекции, для доставки лекарственных препаратов в инфицированные или опухолевые клетки.

Умнякова Е.С., Кудрявцев И.В., Грудина Н.А. с соавторами изучили способность антимикробного пептида аципенсина-1 проникать в опухолевые клетки человека *in vitro*. В ходе исследования было установлено, что аципенсин-1 может проникать в эукариотические клетки без их повреждения [21]. Аципенсин-1 (Ac1) – относится к группе проникающих в клетки пептидов (Cell Penetrating Peptides – CPP), был выделен из лей-

коцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*, является производным гистона H2A, имеет молекулярную массу 5336 kDa, включает 51 аминокислотный остаток, в том числе 13 положительно заряженных остатков аргинина и лизина (при отсутствии отрицательно заряженных), а также 10 остатков гидрофобных аминокислот (валина, лейцина, тирозина, фенилаланина) [43].

Иммуномодулирующий пептид глютоксим (NOV-002) – это трипептидное производное окисленного глутатиона. Глютоксим в настоящее время назначается в России как дополнительный препарат к традиционным методам лечения у пациентов с легочным и диссеминированным течением инфекции, вызванной *Mycobacterium tuberculosis*. В добавок к стандартной противотуберкулезной терапии глютоксим позволяет уменьшить время, необходимое для элиминации бактерий, положительно влияет на время разрешения легочного инфильтрата. По данному препарату были проведены доклинические исследования на нейтрофилах человека и цельной крови, в ходе которых был изучен иммуномодулирующий механизм действия. В настоящее время глютоксим находится на III фазе клинических исследований в США как адъювантный препарат при химиотерапии немелкоклеточного рака легких. Первые результаты представляются многообещающими и говорят о снижении миелосупрессии и модулировании подгрупп лимфоцитов после химиотерапии, что позволяет предположить, что глютоксим может играть роль и иммуномодулятора при лечении онкологических заболеваний [28].

Даптомицин является одним из циклических липопептидов, обладает выраженным бактерицидным действием в отношении широкого спектра грамположительных возбудителей (MRSA, *S. aureus* с промежуточной чувствительностью к ванкомицину, ванкомицинорезистентный *S. aureus* и ванкомицинорезистентные энтерококки). В клинических испытаниях даптомицин демонстрировал высокую активность в отношении бактерий как в стадии роста, так и в стационарной фазе. Возможность возникновения устойчивости к этому пептиду среди бактерий достаточно низкая, это связано с уникальным механизмом действия препарата. Даптомицин применялся в клинической практике в США с 2003 г., и в настоящее время одобрен для лечения осложнённых инфекций кожи и мягких тканей [41].

Синтезированный пептид ZP2 активного центра Гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), помимо основного эффекта, стимуляция костно-

мозгового кроветворения, обладает иммуномодулирующей, антибактериальной и репарационной активностью [8]. Последние исследования подтвердили его выраженное противовирусное действие за счет блокировки размножения ДНК- и РНК-содержащих вирусов [3]. На основе пептида ZP2 было создано косметическое средство в форме спрея, которое показало выраженный терапевтический эффект при лечении хронического генерализованного парадонтита по сравнению с традиционной антибиотикотерапией [15, 16]. Несмотря на то, что на сегодняшний день данный препарат имеет статус косметического средства, была доказана его антибактериальная активность в отношении грамотрицательных бактерий *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii* [4, 34]. Коллективом авторов проведена оценка эффективности комплексной этиопатогенетической терапии инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр, с использованием косметического средства на основе ZP2-ГМ-КСФ. Пациенты получали комплексную терапию (циклы терапии составляли – валацикловир («Валтрекс») в дозе 500 мкг 2 раза в день в течение 10 дней, глюкозаминилмурамилдипептид («Липоквид») в дозе 10 мг 2 раза в день в течение 10 дней – перорально, пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (в форме спрея) 3 раза в день орошение слизистых в течение 10 дней – местно. Затем методом ПЦР определили эффективность разработанной схемы лечения и у 78,6% хронических больных показало полную элиминацию вируса Эпштейна–Барр из основного эпитопа [7].

Тимические иммунорегуляторные пептиды – бестим, гепон, тимоген и имунофан (аналоги гормонов тимуса), имиквимод (производное имидазола). Пептиды тимического происхождения являются индукторами выработки эндогенного интерферона, преимущественно α - и β -фракций. «Цитовир-3» – комплексный препарат, включающий в свой состав тимоген, в экспериментах на мышцах показал повышение уровня противовирусной резистентности. Также введение тимогена стимулирует дифференцировку Т-лимфоцитов, опосредующих гиперчувствительность замедленного типа. При введении данного пептида крысам наблюдается торможение развития злокачественной опухоли (аденокарциномы молочной железы). Кроме того, показана его противовоспалительная активность [5].

Имунофан является синтетическим производным гормона тимопоэтина. Он активизирует пролиферацию и дифференцировку Т-клеток

благодаря усилению продукции ИЛ-2 лимфоцитами. Также наблюдается иммуномодулирующий эффект на синтез фактора некроза опухоли- α (TNF α) макрофагами. Таким образом, происходит повышение пониженного и понижение повышенного образования [20]. Данный пептид применяют в лечении хронических респираторных инфекций. Исследование проводили на 28 больных. Назначали по 1 мл 0,005%-ного раствора внутримышечно по 10 инъекций на курс. Эффект действия препарата наблюдался в исчезновении гнойной мокроты и улучшении самочувствия. После прохождения курса лечения у 70% больных увеличилась продукция интерферона- α и митогенстимулированная продукция интерферона- γ . Кроме того, препарат показывает высокую противовоспалительную активность (быстрая нормализация симптомов респираторных оппортунистических инфекций) [11]. Благодаря выраженной клинической эффективности при бактериальных и вирусных инфекциях, имунофан применяют в лечении послеоперационных осложнений, что позволяет сократить летальность [20].

Действие препаратов, в состав которых включен бестим, более эффективно для лечения вторичных иммунодефицитов, развивающихся, например, у больных с хирургической инфекцией и онкологических больных. Под влиянием препарата наблюдается усиление продукции интерлейкина-2 лимфоцитами и увеличение содержания CD3 и CD4-лимфоцитов. Кроме того, отмечается, что данный препарат не токсичен при превышении терапевтической дозы [12].

Гефон – синтетический тетрадекапептид, обладает противовирусной активностью, противовоспалительными свойствами и способностью к активации местного иммунитета, а также способствует повышению устойчивости слизистой оболочки к инфекциям. Используют данный пептид в лечении вирусных гепатитов, респираторных инфекций, оппортунистических инфекций, синдроме крупа и инфекций передающихся половым путем. Кроме того, гефон способен подавлять в клетках человека *in vitro* репликацию вируса гепатита С. Проведенные исследования по лечению рецидивов генитального герпеса показали (участвовали 71 человек), что монотерапия гефоном позволяет снизить интенсивность симптоматики и в короткие сроки купировать клинические проявления герпетической инфекции у 94,37% пациентов [2].

Заключение

На сегодняшний день пептиды уже заняли свое место среди лекарственных средств, применяемых для лечения широкого спектра заболеваний. Они позволяют уменьшить число осложнений и рецидивов, улучшить результаты лечения. Препараты показывают выраженное действие на течение инфекционного процесса. Большое число заболеваний сопровождаются нарушением гуморального и клеточного звеньев иммунитета. Именно поэтому изучение иммуностимулирующих свойств пептидов особенно интересно. Однако весь потенциал все еще остается не раскрытым. Проведение новых исследований и испытаний позволит включить пептиды в лечение еще большего количества заболеваний.

Список литературы / References

1. Артамонов А.Ю., Рыбакин Е.Г., Орлов Д.С., Корнева Е.А. Биологическая активность и молекулярно-клеточные механизмы действия антимикробных пептидов человека и животных // Вестник Санкт-Петербургского университета, 2014. № 1. С. 5-25. [Artamonov A.Yu., Rybakina E.G., Orlov D.S., Korneva E.A. Biological activity and molecular-cellular mechanisms of action of human and animal antimicrobial peptides. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta = Bulletin of St. Petersburg University*, 2014, no. 1, pp. 5-25. (In Russ.)]
2. Бибичева Т.В., Лукашов М.И. Клиническая эффективность монотерапии рецидивирующей герпетической инфекции половых органов мочеполового тракта иммуномодулятором «Гефон» // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2009. № 3. С. 47-54. [Bibicheva T.V., Lukashov M.I. Clinical effect of monotherapy with immunomodulator “Hepon” in patient with recurrent genital herpes infection. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik “Chelovek i ego zdorovye” = Kursk Scientific and Practical Bulletin “Man and his Health”*, 2009, no. 3, pp. 47-54. (In Russ.)]
3. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П., Гриценко В.А. Оценка влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фак-

тора – ZP2 на рост и биопленкообразование клинических изолятов энтеробактерий *in vitro* // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2018. № 4. 17 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-4/Articles/MAD-2018-4.pdf>. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Tyapaeva Ya.V., Belozertseva Yu.P., Gritsenko V.A. Evaluation of the effect of the synthetic peptide of the active center of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – ZP2 on the growth and biofilm formation of enterobacteria clinical isolates *in vitro*. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2018, no. 4, 17 p. [Electronic resource]. Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-4/Articles/MAD-2018-4.pdf>. (In Russ.)]

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

5. Долгов Г.В., Куликов С.В., Легеза В.И., Малинин В.В., Морозов В.Г., Смирнов В.С., Сосюкин А.Е. Клиническая фармакология Тимогена // Под ред. В.С. Смирнова. СПб., 2003. 103 с. [Dolgov G.V., Kulikov S.V., Legeza V.I., Malinin V.V., Morozov V.G., Smirnov V.S., Sosyukin A.E. Clinical pharmacology of Thymogen / Ed. V.S. Smirnov]. St. Petersburg, 2003. 103 p.

6. Жаркова М.С., Орлов Д.С., Кокряков В.Н., Шамова О.В. Антимикробные пептиды млекопитающих: классификация, биологическая роль, перспективы практического применения // Вестник СПбГУ, 2014. № 1. С. 98-114. [Zarkova M.S., Orlov D.S., Kokryakov V.N., Shamova O.V. Mammalian antimicrobial peptides: classification, biological role, perspectives of practical use. *Vesnik SPbGU = Bulletin of St. Petersburg University*, 2014, no. 1, pp. 98-114. (In Russ.)]

7. Забков О.И., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Гриценко В.А., Зурочка А.В. Клинико-диагностические критерии эффективности комплексной этиопатогенетической терапии хронической Эпштейна–Барр вирусной инфекции // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2018. № 3. 13 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-3/Articles/ZOI-2018-3.pdf>. [Zabkov O.I., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A., Zurochka A.V. Clinical diagnostic criteria of efficiency of complex etiopathogenetic therapy of chronic Epstein–Barr viral infection. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2018, no. 3, 13 p. [Electronic resource]. Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-3/Articles/ZOI-2018-3.pdf>. (In Russ.)]

8. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Дукарт В.В., Гриценко В.А. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (гм-ксф) как основа для создания косметических средств нового поколения с комбинированными эффектами – ацеграм-гель и ацеграм-спрей // Российский иммунологический журнал, 2016. Т. 10, № 3. С. 269-272. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Zueva E.B., Dobrynina M.A., Dukardt V.V., Gritsenko V.A. Synthetic peptide of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (gm-csf) as the basis for creation of cosmetics of new generation with the combined effects – atsegram-gel and atsegram-sprey. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2016, Vol. 10, no. 3, pp. 269-272. (In Russ.)]

9. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Дукардт В.В., Лаврентьева И.Н., Сухобаевская Л.П., Гриценко В.А. Исследование спектра иммунобиологической активности синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) как основа для расширения возможностей создания косметических средств нового поколения с комбинированными эффектами // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 3. С. 377-380. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Zueva E.B., Dobrynina M.A., Dukardt V.V., Lavrentyeva I.N., Sukhobayevskaya L.P., Gritsenko V.A. Research of the spectrum of immunological activity of synthetic peptid the active centre of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) as a basis for the empowerment of creating cosmetics with a new generation of combined effects. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 3, pp. 377-380. (In Russ.)]

10. Зурочка В.А., Зурочка А.В., Фомина Л.О., Добрынина М.А., Забков О.И., Гриценко В.А. Киноцидины – цитокины, обладающие антибактериальной и противовирусной активностью // Российский иммуно-

логический журнал, 2019. Т. 13, № 2. С. 781-783. [Zurochka V.A., Zurochka A.V., Fomina L.O., Dobrynina M.A., Zabkov O.I., Gritsenko V.A. Cinetidine – cytokines, antibacterial and antiviral activity. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 2, pp. 781-783. (In Russ.)]

11. Караулов А.В., Сокуренок С.И. Имунофан: непосредственные и отдаленные результаты лечения больных хроническим бронхитом // Медикал Маркет, 2000. Т. 34. С. 21-24. [Karaulov A.V., Sokurenko S.I. Imunofan: Immediate and long-term results of the treatment of chronic bronchitis. *Medikal Market = Medical Market*, 2000, Vol. 34, pp. 21-24. (In Russ.)]

12. Кауров О.А., Кетлинский С.А., Колобов А.А., Симбирцев А.С. Иммуностимулятор и препарат на его основе. 1998. Номер патента: RU 2120298 C1. [Kaurov O.A., Ketlinskij S.A., Kolobov A.A., Simbirtsev A.S. Immunostimulating agent and a preparation based on thereof. 1998. Patent No. RU 2120298 C1].

13. Кулакова Е.В. Изучение уровня концентрации LL-37 слюны у детей с atopическим дерматитом при различных видах сенсибилизации организма // Dental Forum, 2012. № 3. С. 61. [Kulakova E.V. The study of the level of LL-37 saliva concentration in children with atopic dermatitis with various types of body sensitization. *Dental Forum = Dental Forum*, 2012, no. 3, p. 61. (In Russ.)]

14. Мусин Х.Г. Антимикробные пептиды – потенциальная замена традиционным антибиотикам // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 3. С. 295-308. [Musin Kh.G. Antimicrobial peptides – a potential replacement for traditional antibiotics. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 3, pp. 295-308. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-295-308.

15. Саркисян Н.Г., Катаева Н.Н., Тузанкина И.А., Меликян С.Г. Антимикробные пептиды в терапии слизистой полости рта // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13, № 2. С. 524-526. [Sarkisyan N.G., Kataev N.N., Tuzankina I.A., Melikyan S.G. Antimicrobial peptides in the treatment of muscular oral cavity. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 2, pp. 524-526. (In Russ.)]

16. Саркисян Н.Г., Катаева Н.Н., Тузанкина И.А., Меликян С.Г., Зурочка В.А., Зурочка А.В. Оценка эффективности спрея на основе синтетического пептида в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита // Инфекция и иммунитет, 2019. Т. 9, №3-4. С. 549-558. [Sarkisian N.G., Kataeva N.N., Tuzankina I.A., Melikyan S.G., Zurochka V.A., Zurochka A.V. Assessing efficiency of synthetic peptide-containing spray in combination therapy of chronic generalized periodontitis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, Vol. 9, no. 3-4, pp. 549-558. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-549-558.

17. Саркисян Н.Г., Катаева Н.Н., Юффа Е.П., Хлыстова К.А., Пермикина В.Н., Меликян С.Г. Влияние бальзамов ополаскивателей с пептидами на физико-химические свойства смешанной слюны // Врач, 2020. Т. 31, № 5. С. 77-79. [Sarkisyan N.G., Kataeva N.N., Yuffa E.P., Khlystova K.A., Permikina V.N., Melikyan S.G. The effect of oral balms/rinses containing peptides on the physicochemical properties of mixed saliva. *Vrach = Doctor*, 2020, Vol. 31, no. 5, pp. 77-79. (In Russ.)]

18. Сергеев О.В., Баринский И.Ф. Синтетические пептидные вакцины // Вопросы вирусологии, 2016. Т. 61, № 1. С. 5-8. [Sergeev O.V., Barinsky I.F. Synthetic peptide vaccines. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2016, Vol. 61, no. 1, pp. 5-8. (In Russ.)]

19. Сипайлова О.Ю., Нестеров Д.В. Антимикробные низкомолекулярные пептиды: факторы неспецифической защиты организма животных // Вестник ОГУ, 2013. № 12. С. 169-172. [Sipaylova O.Yu., Nesterov D.V. Antimicrobial low molecular weight peptides – factors of nonspecific protection animal organism. *Bulletin of OSU*, 2013, no. 12, pp. 169-172. (In Russ.)]

20. Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н., Мухаммад З. Т-зависимые иммунорегуляторные эффекты полиоксидония и имунофана (обзор литературы) // Вестник Чувашского университета, 2010. № 3. С. 140-145. [Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Mikhailova M.N., Muhammad Z. T cell dependent immunoregulatory effects of polyoxidonium and imunofan (review). *Vestnik Chuvashskogo universiteta = Bulletin of the Chuvash University*, 2010, no. 3, pp. 140-145. (In Russ.)]

21. Умнякова Е.С., Кудрявцев И.В., Грудинина Н.А., Баландин С.В., Болосов И.А., Пантелеев П.В., Филатенкова Т.А., Орлов Д.С., Цветкова Е.В., Овчинникова Т.В., Кокряков В.Н., Шамова О.В. Интернализация антимикробного пептида Аципенсина 1 в опухолевые клетки человека // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 575-582. [Umnyakova E.S., Kudryavtsev I.V., Grudinina N.A., Balandin S.V., Bolosov I.A., Panteleev P.V., Filatenkova T.A., Orlov D.S., Tsvetkova E.V., Ovchinnikova T.V., Kokryakov V.N., Shamova O.V. Internalization of antimicrobial peptide Acipensin 1 into human tumor cells. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 575-582. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-575-582.

22. Царев В.Н., Давыдова М.М., Николаева Е.Н., Покровский В.Н., Пожарская В.О., Плахтий Л.Я., Спиранде И.В., Ушаков Р.В., Ипполитов Е.В. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 576 с. [Tsarev V.N., Davidova M.M., Nikolaeva E.N., Pokrovskiy V.N., Pozharskaya V.O.,

Plakhty L.Ya., Spirande I.V., Ushakov R.V., Ippolitov E.V. Microbiology, virology and immunology oral cavity]. Moscow: GEOTAR-Media, 2013. 576 p.

23. Шулятникова О.А., Рогожников Г.И., Косарева П.В., Даймонд Т.А., Кумаланина И.В., Рогожников А.Г. Влияние низкомолекулярного катионного пептида варнерина на показатели периферической крови экспериментальных животных В. (экспериментально-лабораторное исследование) // Уральский медицинский журнал, 2017. Т. 4, № 148. С. 150-154. [Shuliatnikova O.A., Rogoznikov G.I., Kosareva P.V., Daimond T.A., Kumalanina I.V., Rogoznikov A.G. Influence of low-molecular cationic peptide of a varnerin on indicators of peripheral blood of experimental animals (experimental and laboratory research). *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2017, Vol. 4, no. 148, pp. 150-154. (In Russ.)]

24. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки. М.: Мир, 1985. 456 с. [Jakubke H.D., Eshkayt H. Amino acids. Peptides. Squirrels]. Moscow: Mir, 1985. 456 p.

25. Bernard J.J., Gallo R.L. Protecting the boundary: the sentinel role of host defense peptides in the skin. *Cell Mol. Life Sci.*, 2011, Vol. 68, no. 13, pp. 2189-2199.

26. Davidson D.J., Currie A.J., Reid G.S., Bowdish D.M., Mac Donald K.L., Ma R.C., Hancock R.E., Speert D.P. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 2, pp. 1146-1156.

27. Dubos R.J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 1939, Vol. 70, no. 1, pp. 1-10.

28. Easton D.M., Nijnik A., Matthew L. Hancock Mayer and Robert E.W. Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. *Trends Biotechnol.*, 2009, Vol. 27, no. 10, pp. 582-590.

29. Flamm R.K., Rhomberg P.R., Simpson K.M., Farrell D.J., Sader H.S., Jones R.N. *In vitro* spectrum of pexiganan activity when tested against pathogens from diabetic foot infection and with selected resistance mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, Vol. 59, no. 3, pp. 1751-1754.

30. Gawde U., Chakraborty S., Waghv F.H., Barai R.S., Khanderkar A., Indraguru R., Shirsat T., Idicula-Thomas S. CAMPR4: a database of natural and synthetic antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.*, 2023, Vol. 51, no. D1, pp. D377-D383.

31. Guaní-Guerra E., Santos-Mendoza T., Lugo-Reyes S.O., Terán L.M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 135, no. 1, pp. 1-11.

32. Kahlenberg J.M., Kaplan M.J. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 10, pp. 4895-4901.

33. Kang H.K., Kim C., Seo C.H., Park Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J. Microbiol.*, 2017, Vol. 55, no. 1, pp. 1-12.

34. Kataeva N., Sarkisian N., Zurochka V., Zurochka A., Melikyan S. Study of the micelle forming ability of synthetic peptide as a part of the antibacterial drug. *AIP Conference Proceedings*, 2022, 030035. doi:10.1063/5.0069591.

35. Lai Y., Gallo R.L. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.*, 2009, Vol. 30, no. 3, pp. 131-141.

36. Lei J., Sun L., Huang S., Zhu C., Li P., He J., Mackey V., Coy D.H., He Q. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am. J. Transl. Res.*, 2019, Vol. 11, no. 7, pp. 3919-3931.

37. Matsumoto T., Kaneko T., Seto M., Wada H., Kobayashi T., Nakatani K., Tonomura H., Tono Y., Ohyabu M., Nobori T., Shiku H., Sudo A., Uchida A., Deborah J., Kurosawa S., Kurosawa S. The membrane proteinase 3 expression on neutrophils was downregulated after treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2008, Vol. 14, no. 2, pp. 186-192.

38. Nijnik A., Hancock REW. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg. Health Threats J.*, 2009, Vol. 2, e1. doi: 10.3134/ehthj.09.001.

39. Pütsep K., Faye I. Hans G. Boman (1924-2008): pioneer in peptide-mediated innate immune defence. *Scand. J. Immunol.*, 2009, Vol. 70, no. 3, pp. 317-319.

40. Rahnamaeian M. Antimicrobial peptides: Modes of mechanism, modulation of defense responses. *Plant Signal. Behav.*, 2011. Vol. 6, no. 9, pp. 1325-1332.

41. Raybak M.I. The efficacy and safety of daptomycin: first in a new class of antibiotics for Gram-positive bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2006, Vol. 12, pp. 24-32.

42. Schaubert J., Gallo R.L. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 122, no. 2, pp. 261-266.

43. Shamova O.V., Orlov D.S., Balandin S.V., Shramova E.I., Tsvetkova E.V., Panteleev P.V., Leonova Yu.F., Tagaev A.A., Kokryakov V.N. Ovchinnikova Acipensins – novel antimicrobial peptides from leukocytes of the Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*. *Acta Naturae*, 2014, Vol. 6, no. 4, pp. 99-109.

44. van Wetering S., Tjabringa S., Hiemstra P.S. Interaction between neutrophil-delivered antimicrobial peptides and airway epithelial cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, Vol. 77, no. 4, pp. 444-450.
45. Wan M., van der Does A.M., Tang X., Lindbom L., Agerberth B., Haeggstrom J.Z. Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 2014, Vol. 95, no. 6, pp. 971-981.
46. Wiesner J., Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence.*, 2010, Vol. 1, no. 5, pp. 440-464.
47. Zaiou M., Gallo R.L. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J. Mol. Med.* 2002, Vol. 80, no. 9, pp. 549-561.

Авторы:

Хлыстова К.А. — аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Саркисян Н.Г. — д.м.н., профессор отдела аспирантуры ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Катаева Н.Н. — к.х.н., доцент кафедры общей химии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Khlystova K.A., Postgraduate Student, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Sarkisyan N.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Postgraduate Department, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Therapeutic Dentistry and Propedeutics of Dental Diseases, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

Kataeva N.N., PhD (Chemistry), Associate Professor, Department of General Chemistry, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 16.06.2023
Принята к печати 19.06.2023

Received 16.06.2023
Accepted 19.06.2023

ФУНКЦИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В ЗАЖИВЛЕНИИ РАН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*

Костоломова Е.Г.^{1,2}, Стрелин С.А.³, Суховой Ю.Г.^{2,4},
Унгер И.Г.², Акунеева Т.В.², Марков А.А.¹, Полянских Е.Д.¹

¹ ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

² ООО «Тюменский филиал института фундаментальной и клинической иммунологии», г. Тюмень, Россия

³ «Ай Кью Пластик» Тимура Хайдарова, Москва, Россия

⁴ ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Тюмень, Россия

Резюме. Полученные результаты показывают роль резидентных Т-клеток кожи человека в патогенезе хронических ран. Изучены 20 образцов нормальной кожи человека, 10 от пациентов перенесших острую травму и 9 от пациентов с хроническими ранами, не заживающими в течение 2 месяцев. С использованием многоцветной проточной цитометрии нами выявлено, что резидентные Т-лимфоциты (CD3⁺αβ⁺ и CD3⁺γδ⁺) способны локально продуцировать биологически активные вещества, нормализовать гомеостаз кожи человека, что способствует заживлению ран. Полученные данные свидетельствуют о том, что в крови присутствуют в основном αβ⁺Т-лимфоциты (p < 0,001), γδ⁺Т-клетки, обнаруженные в ранах, являются популяцией кожи. Не обнаружено различий в соотношении резидентных Т-клеток при хронических и острых ранах и здоровым эпителием. Соответственно, незаживление ран и переход в хроническую форму могут быть вызваны нарушением функции Т-лимфоцитов. CD69 регулирует секрецию γδ Т-клетками факторов роста, IFNγ, IL-17 и IL-22. Относительное количество Т-клеток, экспрессирующих на своей поверхности CD69, полученных от пациентов с острой раной, достоверно увеличивалось по сравнению с нормальным эпидермисом и хронической раной (10,5%±2,3 и 7,6%±1,24 и 3,0%±1,05 соответственно (p < 0,001)). Количество клеток с фенотипом CD3⁺αβ⁺CD69⁺ достоверно не отличалось у всех трех групп сравнения. Дисрегуляция Т-клеточно-опосредованного заживления при хронических ранах вызвана сниженной продукцией IGF-1 резидентными Т-лимфоцитами CD3⁺αβ⁺ (1,7%±0,9 (p < 0,001) и CD3⁺γδ⁺ (0,44%±0,02 (p < 0,001)), по сравнению с Т-клетками, выделенными из острых ран CD3⁺αβ⁺ (13,6%±5,6) и CD3⁺γδ⁺ (8,9%±3,1). Как αβ⁺ так и γδ⁺Т-лимфоциты, выделенные из незаживающих хронических ран, практически не отвечали на стимуляцию митогенами, в отличие от клеток, полученных из острой раны и здоровой кожи. Анализ секреции исследуемых цитокинов CD69-дефицитными дермальными γδ Т-клетками *in vitro*

Адрес для переписки:

Костоломова Елена Геннадьевна
ООО «Тюменский филиал института
фундаментальной и клинической иммунологии»
625027, Россия, г. Тюмень, ул. Котовского, 5/2.
Тел.: 8 (904) 493-06-74.
E-mail: lenakost@mail.ru

Address for correspondence:

Elena G. Kostolomova
Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
Tyumen Branch
5/2 Kotovsky St
Tyumen
625027 Russian Federation
Phone: +7 (904) 493-06-74.
E-mail: lenakost@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Костоломова, С.А. Стрелин, Ю.Г. Суховой,
И.Г. Унгер, Т.В. Акунеева, А.А. Марков, Е.Д. Полянских
«Функция Т-лимфоцитов кожи человека в
заживлении ран в эксперименте *in vitro*» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 2. С. 115-122.
doi: 10.46235/1028-7221-12430-FOH

© Костоломова Е.Г. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.G. Kostolomova, S.A. Strelin, Yu.G. Sukhovei, I.G. Unger,
T.V. Akuneeva, A.A. Markov, E.D. Polyanskikh "Function
of human skin T cells in wound healing in the *in vitro*
experimental setting", Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 2,
pp. 115-122.
doi: 10.46235/1028-7221-12430-FOH

© Kostolomova E.G. et al., 2023

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-12430-FOH

показал более низкую спонтанную секрецию IL-22 ($4,56\% \pm 2,3$ и $23,9\% \pm 1,05$ и $10,6\% \pm 1,24$ соответственно ($p < 0,001$)) и IL-2 ($0,9\% \pm 0,08$ и $22,6\% \pm 2,5$ и $3,9\% \pm 1,0$ и соответственно ($p < 0,01$)). Количество $\gamma\delta$ Т-клеток кожи секретирующих IL-17: здоровая кожа ($1,4\% \pm 0,085$), острая рана ($11,3\% \pm 3,2$) хроническая рана ($31,7\% \pm 11,8$) ($p < 0,001$)). Т-лимфоциты в хронических ранах имеют функциональные нарушения и не способны продуцировать биологически активные вещества, способствующие физиологической регенерации ткани.

Ключевые слова: проточная цитометрия, кожа, резидентные Т-клетки, заживление ран, IGF-1, IL-2, IL-22, IL-17

FUNCTION OF HUMAN SKIN T CELLS IN WOUND HEALING IN THE *IN VITRO* EXPERIMENTAL SETTING

Kostolomova E.G.^{a, b}, Strelin S.A.^c, Sukhovei Yu.G.^{b, d}, Unger I.G.^b, Akuneeva T.V.^b, Markov A.A.^a, Polyanskikh E.D.^a

^a Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

^b Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Tyumen Branch, Tyumen, Russian Federation

^c Timur Khidarov IQ Plastique, Moscow, Russian Federation

^d Tyumen Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russian Federation

Abstract. Currently, the treatment of persistent non-healing wounds is among the most difficult clinical issues. We studied 20 samples of normal human skin, 10 specimens from patients with acute trauma, and 9 samples from the patients with chronic wounds that did not heal within 2 months. Using multicolor flow cytometry, we found that the resident T lymphocytes ($CD3^+\alpha\beta^+$ and $CD3^+\gamma\delta^+$) are able to locally produce biologically active substances, normalize human skin homeostasis, thus promoting the wound healing. The data obtained indicate that the blood contains mainly $\alpha\beta^+$ T lymphocytes ($p < 0.001$), while the $\gamma\delta^+$ T cells detected in wounds represent a population similar to skin cells. We found no difference in the ratio of resident T cells in chronic and acute wounds, and healthy epithelium. Accordingly, non-healing of wounds and chronic clinical course may be caused by dysfunction of T cells. CD69 regulates $\gamma\delta$ T cell secretion of growth factors, IFN γ , IL-17 and IL-22. The relative number of CD69-expressing T cells from the patients with acute wounds was significantly increased, if compared with cells from normal epidermis and chronic wounds ($10.5\% \pm 2.3$, $7.6\% \pm 1.24$, and $3.0\% \pm 1.05$, respectively. $p < 0.001$). The number of cells with the $CD3^+\alpha\beta^+CD69^+$ phenotype did not differ significantly between all three groups under comparison. Dysregulation of T cell-mediated healing in chronic wounds is caused by reduced production of IGF-1 by resident $CD3^+\alpha\beta^+$ T lymphocytes ($1.7\% \pm 0.9$) ($p < 0.001$), and $CD3^+\gamma\delta^+$ ($0.44\% \pm 0.02$, $p < 0.001$) compared to $CD3^+\alpha\beta^+$ T cells derived from acute wounds ($13.6\% \pm 5.6$) and $CD3^+\gamma\delta^+$ ($8.9\% \pm 3.1$). The $\alpha\beta^+$ and $\gamma\delta^+$ T cells isolated from non-healing chronic wounds did not respond to mitogenic stimuli, unlike the cells obtained from acute wounds and healthy skin. *In vitro* analysis of cytokine secretion by the CD69-deficient dermal $\gamma\delta$ T cells showed a lower spontaneous secretion of IL-22 ($4.56\% \pm 2.3$ and $23.9\% \pm 1.05$ and $10.6\% \pm 1.24$, respectively; $p < 0.001$) and IL-2 ($0.9\% \pm 0.08$ and $22.6\% \pm 2.5$ and $3.9\% \pm 1.0$, and respectively; $p < 0.01$). When analyzing the number of resident $\gamma\delta$ skin T cells secreting IL-17, we obtained the following differences for healthy skin ($1.4\% \pm 0.08$), acute wounds ($11.3\% \pm 3.2$) and chronic wounds ($31.7\% \pm 11.8$), thus showing a significant intergroup difference ($p < 0.001$). T lymphocytes in chronic wounds exhibit some functional disorders and are not able to produce biologically active substances that promote physiological tissue regeneration. The results suggest a role of resident T cells in human skin in wound healing processes and provide new insights into the pathogenesis of chronic wounds.

Keywords: flow cytometry, skin, resident T cells, wound healing, IGF-1, IL-2, IL-22, IL-17

Введение

Длительно незаживающие раны — одна из проблем современной медицины. В процессе заживления кожной раны могут возникнуть осложнения, вследствие которых на месте острой раны может возникнуть хроническая рана или

чрезмерное рубцевание. Первоначальные представления об иммунологическом надзоре за кожей подчеркивали важность иммунных клеток, которые циркулируют между лимфатическими узлами, дренирующими кожу, периферическими тканями и тканями, которые могут быстро реагировать на проблемы с антигенами [22]. Одна-

ко недавно было предложено, что резидентные Т-клетки кожи, а не рекрутированные Т-клетки, играют главную роль в кожном иммунном гомеостазе и патологии [23]. Так, резидентные Т-клетки памяти кожи стратегически позиционируются как первая линия защиты от вторичной антигенной стимуляции [21] Т-клетки, которые экспрессируют гетеродимеры, состоящие из γ - и δ -цепей рецептора Т-клеток (TCR) обнаруживаются как в эпидермисе, так и в дерме кожи человека и животных [8]. Пул Т-клеток в эпидермисе мыши состоит исключительно из $\gamma\delta^+$ Т-клеток с инвариантными TCR, обозначенными как дендритные эпидермальные Т-клетки (DETC). В отличие от грызунов в эпидермисе человека существует также большая популяция эпидермальных $\alpha\beta^+$ Т-клеток [17]. Помимо анализа их присутствия, мало что известно об этих популяциях Т-клеток кожи человека. Исследование пула Т-лимфоцитов кожи человека и их функциональной активности позволит получить представление о патогенезе острых ран и хронических ран.

Цель данной работы — изучить роль Т-лимфоцитов кожи в заживлении острых и хроническими ран человека *in vitro*.

Материалы и методы

Образцы нормальной кожи человека ($n = 20$ (19 женщин и 1 мужчины)) возраст $56,8 \pm 8,2$ года были получены в результате блефаропластики. Образцы кожи пациентов ($n = 10$), перенесших недавнюю травму, были использованы для изучения острых ран. Ни один из пациентов не имел системного заболевания или не получал иммунодепрессивного лечения. Образцы ткани пациентов ($n = 9$) с хроническими ранами, которые не зажили в течение 2 месяцев, использовали для изучения хронических ран. Образцы ткани и периферической крови для исследования были доставлены из ГБУЗ ТО «Областная клиническая больница № 1» (отделение пластической и гнойной хирургии). Венозную кровь от 20 здоровых доноров получали путем пункции периферической вены и собрали в вакуумную пробирку с добавлением K_3 ЭДТА. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. В качестве источника клеток кожи использовали биоптаты кожи, полученные по ранее описанной методике [1]. Исследование фенотипического состава Т-лимфоцитов кожи проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с применением программного обеспечения СХР

2.0. Настройку проточного цитофлуориметра проводили с учетом рекомендаций Хайдукова и соавт. [4]. Для анализа использовали антитела к IGF-1 (G-17) и сопутствующие блокирующие пептиды (Santa Cruz Biotechnology (США)). Моноклональные антитела CD3, CD69, TCR $\alpha\beta$ и TCR $\gamma\delta$, меченные флуоресцирующими красителями (Beckman Coulter, США). В качестве негативного контроля использовались IgG (Beckman Coulter). Анализируемые клетки кожи в виде осадка ресуспендировали в 50 мкл PBS. После добавления антител образцы 20 минут инкубировали в холодильнике при $t +4^\circ\text{C}$ и отмывали от не связавшихся антител методом центрифугирования в течение 7 минут при 600 g PBS. Для каждого из образцов анализировали не менее 50000-75000 клеток. Удаление эритроцитов из образцов крови проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора Versa Lyze (Beckman Coulter, США).

Для изучения способности резидентными эпидермальными Т-клетками спонтанной продукции инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), IL-2, IL-22, IL-17 и при стимуляции *in vitro* резидентные Т-клетки выделяли из нормальной кожи и оценивали секрецию биологически активных веществ с помощью проточной цитометрии. Суспензию клеток кожи получали по ранее описанной методике [1], инкубировали с Брефелдином А в течение 24 часов в присутствии или в отсутствие с ФГА (при конечной концентрации вещества — 100 нг/мкл) и иономицина кальция (при конечной концентрации вещества — 1 мкг/мкл). После окончания культивирования обе клеточные культуры дважды отмывали PBS, инкубировали с моноклональными антителами, в течение 20 минут при $t +4^\circ\text{C}$ в темноте отмывали от несвязавшихся антител методом центрифугирования в течение 7 минут при 600 g PBS.

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistika 8.0 (StatSoft, США). Данные были проанализированы с использованием непарного t-критерия Стьюдента для определения значимых различий между двумя группами пациентов и парного t-критерия для определения значимых различий в одной и той же группе. Все результаты были признаны значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Ранее нами было установлено, что процессы апоптоза и пролиферации играют важную роль как в патогенезе образования рубцовой ткани, так и в поддержании гомеостаза здоровой кожи [2, 3, 5]. Прежде чем исследовать роль резидентных Т-клеток в заживлении ран и гомеостазе, мы определили наличие популяций Т-лимфоцитов в здоровой коже человека [7]. Т-лимфоциты кожи

сравнивали с периферическими Т-лимфоцитами крови здоровых доноров. Мы обнаружили значительное количество $\gamma\delta^+$ Т-клеток ($15,9\% \pm 2,7$ и $3,4 \pm 0,9$ соответственно) в коже по сравнению с кровью. Субпопуляция $\alpha\beta^+$ Т-клеток составила $0,9\% \pm 0,03$ и $69,9\% \pm 18,6$ соответственно. Мы не обнаружили достоверных различий в соотношении субпопуляций $CD3^+\alpha\beta^+$ и $CD3^+\gamma\delta^+$ при острых и хронических незаживающих ранах и здоровым эпителием. Мы предположили, что незаживление ран и хронизация вызваны нарушением функциональной активности $\alpha\beta^+$ и/или $\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитов. В нашем исследовании относительное количество Т-клеток, экспрессирующих на своей поверхности CD69, полученных от пациентов с острой раны, достоверно увеличивалось по сравнению с нормальным эпидермисом и хронической раной ($10,5\% \pm 2,3$ и $7,6\% \pm 1,24$ и $3,0\% \pm 1,05$ соответственно ($p < 0,001$)). Количество клеток с фенотипом $CD3^+\alpha\beta^+CD69^+$ достоверно не отличалось у всех трех групп сравнения.

Чтобы исследовать способность Т-лимфоцитов кожи участвовать в заживлении раны, мы оценили продукцию IGF-1 клетками здоровой кожи с помощью проточной цитометрии. Обнаружено, что эпидермальные Т-лимфоциты спонтанно (*in vitro*) продуцируют IGF-1 на низких уровнях $CD3^+\alpha\beta^+$ ($3,9 \pm 1,3\%$) и $CD3^+\gamma\delta^+$ ($1,9 \pm 0,6\%$), как и описано для DETC мыши [17]. Продукция IGF-1 кожными резидентными Т-клетками, окрашенными анти-IGF-1, увеличивается при стимуляции ФГА (100 нг/мкл) и иономицином кальция (1 мкг/мкл) в пуле $CD3^+\alpha\beta^+$ до $10,8 \pm 2,1\%$ ($p < 0,001$), а в субпопуляции $CD3^+\gamma\delta^+$ до $7,3 \pm 1,9\%$; ($p < 0,001$) относительно базального уровня.

Резидентные Т-клетки кожи реагируют на ее повреждение, инфицирование, стресс секрецией цитокинов и факторов роста, которые стимулируют клеточную пролиферацию, вызывают цитоллиз и активируют другие клетки для инфильтрации пораженной области.

По данным нашего исследования, резидентные Т-лимфоциты, выделенные из незаживающих хронических кожных ран, не секретируют IGF-1 по сравнению с Т-клетками, выделенными из острых ран и здоровой кожи (табл. 1).

Одним из признаков ранней стадии заживления раны является увеличение IGF-1 в месте раны, было показано, что уровни IGF-1 снижаются в незаживающих ранах от пациентов с диабетом [14]. Поэтому мы выдвинули гипотезу, что резидентные Т-клетки кожи активируются при повреждении *in vivo* с образованием IGF-1. Так, уровни IGF-1, продуцируемые как $\alpha\beta^+$ ($25,7\% \pm 5,1$ и $10,8\% \pm 2,1$ соответственно), так и $\gamma\delta^+$ Т-клетки ($19,2\% \pm 3,7$ и $7,3\% \pm 1,9$ соответственно), стимулированные ФГА и иономицином, полученными из биоптата острой раны, были

выше уровня инсулиноподобного фактора роста 1 в Т-клетках здоровой кожи. Т-лимфоциты, выделенные из незаживающих хронических ран, практически не отвечали на стимуляцию митогенами $CD3^+\alpha\beta^+$ ($1,7 \pm 0,9$ спонтанная и $2,3 \pm 0,2$ стимулированная секреция), $CD3^+\gamma\delta^+$ ($0,44 \pm 0,02$ и $3,1 \pm 1,4$ соответственно). Чтобы определить, является ли это уникальным ответом резидентных Т-клеток кожи во время повреждения, $\alpha\beta^+$ и $\gamma\delta^+$ Т-клетки были выделены из крови как здоровых доноров, так и от пациентов с острыми и хроническими ранами. Спонтанные уровни Т-клеток, продуцирующие IGF-1, выделенные у пациентов с ранами и здоровых доноров, статистически недостоверно отличались. Базальный уровень IGF-1, секретируемый субпопуляцией резидентных $CD3^+\alpha\beta^+$ клеток в исследуемых группах, составил: хроническая незаживающая рана ($3,5\% \pm 0,9$); острая рана ($7,2\% \pm 2,8$) и здоровая кожа ($5,0\% \pm 1,6$) ($p = 0,12$) и пулом $CD3^+\gamma\delta^+$ лимфоцитов ($2,9\% \pm 1,0$; $6,7\% \pm 3,1$ и $3,3\% \pm 0,8$ соответственно ($p = 0,11$)). При стимуляции *in vitro* митогенами секреция IGF-1 тремя пулами Т-лимфоцитов крови достоверно значимо увеличивались ($p < 0,001$). Возможно, повышенная продукция $\alpha\beta^+\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитами IGF-1 во время заживления раны ограничена локальной средой. В совокупности наши результаты демонстрируют, что Т-клетки кожи человека являются локальным источником IGF-1, обладая способностью усиливать экспрессию фактора роста при активации, влияя на процессы регенерации раны.

Далее мы исследовали способность $\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитов здоровой и поврежденной кожи синтезировать цитокины. Чтобы проанализировать функцию CD69 в секреции IL-22, IL-2 и IL-17 дермальными $\gamma\delta^+$ Т-клетками *in vitro*, мы приготовили суспензии клеток кожи [1], полученных от трех исследуемых групп. Анализ методом проточной цитометрии показал более низкую спонтанную секрецию IL-22 в CD69-дефицитных дермальных $\gamma\delta^+$ Т-клетках по сравнению с клетками, полученными из острой раны и здоровой кожи ($4,56\% \pm 2,3$ и $23,9\% \pm 1,05$ и $10,6\% \pm 1,24$ соответственно ($p < 0,001$)). Резидентные Т-лимфоциты, полученные из хронической раны, не ответили на стимуляцию *in vitro* ФГА и иономицином кальция в течение 24 часов в отличие от групп сравнения ($5,6\% \pm 2,3$ и $55,4\% \pm 1,05$ и $21,8\% \pm 1,24$ соответственно ($p < 0,001$)). $CD3^+\gamma\delta^+$ клетки, выделенные из хронических ран, продуцируют значительно меньше IL-2 после стимуляции по сравнению с клетками, выделенными из острой раны и нормального эпидермиса до ($0,9\% \pm 0,08$ и $22,6\% \pm 2,5$ и $3,9\% \pm 1,0$ соответственно ($p < 0,01$)) и после стимуляции митогеном ($1,8\% \pm 0,5$ и $48,6\% \pm 8,0$ и $9,9\% \pm 3,5$ соответственно ($p < 0,001$)). При анализе количества резидентных $\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитов

ТАБЛИЦА 1. ПРОДУКЦИЯ IGF-1 Т-КЛЕТКАМИ ПРИ ОСТРЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ РАНАХ

TABLE 1. PRODUCTION OF IGF-1 BY T CELLS IN ACUTE AND CHRONIC WOUNDS

Резидентные Т-лимфоциты Resident T lymphocytes	Здоровая кожа Healthy skin (n = 20)	Острая рана Acute wound (n = 10)	Хроническая рана Chronic wound (n = 9)	p
CD3 ⁺ αβ ⁺ (%)	3,9±1,3	13,6±5,6#*	1,7±0,9	**p < 0,001
CD3 ⁺ γδ ⁺ (%)	1,9±0,6	8,9±3,1#*	0,44±0,02	**p < 0,001

Примечание. # – разница со здоровой кожей; * – разница с хронической раной.

Note. #, difference with healthy skin; *, difference with chronic wound.

кожи, секретирующих IL-17, мы получили следующие цифры: здоровая кожа (1,4%±0,085), острая рана (11,3%±3,2) хроническая рана (31,7%±11,8) (p < 0,001)).

Обсуждение

Кожа человека содержит эпидермальные резидентные αβ⁺ и γδ⁺Т-клетки, которые могут функционировать при иммунном надзоре за кожей [10]. Ранее нами было установлено, что процессы апоптоза и пролиферации играют важную роль как в патогенезе образования рубцовой ткани, так и в поддержании гомеостаза здоровой кожи [2, 3, 4]. Прежде чем исследовать роль резидентных Т-клеток в заживлении ран и гомеостазе, мы определили наличие популяций Т-лимфоцитов в здоровой коже человека [5]. Т-лимфоциты кожи сравнивали с периферическими Т-лимфоцитами крови здоровых доноров. Мы обнаружили значительное количество γδ⁺Т-клеток в коже по сравнению с кровью (p < 0,001). Основной пул αβ⁺Т-клеток был обнаружен в крови здоровых доноров (p < 0,001). Соответственно, γδ⁺Т-лимфоциты являются популяцией кожи. Мы не обнаружили достоверных различий в соотношении субпопуляций CD3⁺αβ⁺ и CD3⁺γδ⁺ при острых и хронических незаживающих ранах и здоровым эпителием [10]. Значит, незаживление ран и переход в хроническую форму может быть вызван нарушением функциональной активности резидентных Т-лимфоцитов. Исследования Sibrián D. et al. показали, что экспрессия CD69 на тканевых резидентных иммунных клетках при воспалении является маркером различных сигнальных путей, которые потенциально регулируют регенерацию тканей [9]. В нашем исследовании относительное количество Т-клеток, экспрессирующих на своей поверхности CD69, полученных от пациентов с острой раны, достоверно увеличивалось по сравнению с нормальным эпидермисом и хронической раной (p < 0,001). Количество клеток с фенотипом CD3⁺αβ⁺CD69⁺ достоверно не отличалось у всех трех групп сравнения. По результатам этого этапа

исследования можно сделать предварительный вывод, что резидентные γδ⁺Т-лимфоциты в хронических ранах имеют функциональные нарушения и не способны продуцировать биологически активные вещества во время процесса восстановления тканей. По данным литературного анализа, мышечные DETC регулируют гомеостаз кожи посредством секреции IGF-1, члена семейства инсулиновых гормонов роста. IGF-1 используется кератиноцитами в коже для развития и поддержания эпидермиса [17]. В коже человека IGF-1 регулирует форму и миграцию кератиноцитов для обеспечения эпителизации раны [24]. Предполагается, что фибробласты являются основным источником IGF-1 в коже [13]. Чтобы исследовать способность Т-лимфоцитов кожи участвовать в заживлении раны, мы оценили продукцию IGF-1 клетками здоровой кожи с помощью проточной цитометрии. Обнаружено, что эпидермальные Т-лимфоциты, как αβ⁺, так и γδ⁺ спонтанно (*in vitro*) продуцируют IGF-1 на низких уровнях, что описано и для DETC мыши [17]. Продукции IGF-1 кожными резидентными Т-клетками окрашенными анти-IGF-1 увеличивается при стимуляции митогенами в пуле CD3⁺αβ⁺ и CD3⁺γδ⁺ (p < 0,001) относительно базального уровня.

Резидентные Т-клетки кожи реагируют на ее повреждение, инфицирование, стресс секрецией цитокинов и факторов роста, которые стимулируют клеточную пролиферацию, вызывают цитолиз и активируют другие клетки для инфильтрации пораженной области. Предыдущие исследования показали, что количество IGF-1 в раневой жидкости человека достигает максимальных значений в течение 24 часов после повреждения [12]. Уровень IGF-1 увеличивается после повреждения эпидермиса кожи, достигая максимума через 3 дня после ранения [20]. По данным нашего исследования, резидентные Т-лимфоциты, выделенные из незаживающих хронических кожных ран, не секретируют IGF-1, по сравнению с Т-клетками, выделенными из острых ран и здоровой кожи (p < 0,001) (табл. 1).

Одним из признаков ранней стадии заживления раны является увеличение IGF-1 в месте

раны, было показано, что уровни IGF-1 снижаются в незаживающих ранах от пациентов с диабетом [13]. Поэтому мы выдвинули гипотезу, что резидентные Т-клетки кожи активируются при повреждении *in vivo* с образованием IGF-1. Т-лимфоциты, полученные из биоптата острой раны, при стимуляции секретируют достоверно большее количество IGF-1 ($p < 0,001$), чем Т-клетки здоровой кожи. Т-лимфоциты, выделенные из незаживающих хронических ран, не отвечали на стимуляцию митогенами. Чтобы определить, является ли это уникальным ответом резидентных Т-клеток кожи во время повреждения, $\alpha\beta^+$ и $\gamma\delta^+$ Т-клетки были выделены из крови доноров и пациентов. При стимуляции *in vitro* митогенами секреция IGF-1 тремя пулами Т-лимфоцитов крови достоверно значимо увеличивались ($p < 0,001$). Возможно, повышенная продукция $\alpha\beta^+$ $\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитами IGF-1 во время заживления раны ограничена локальной средой. В совокупности наши результаты демонстрируют, что Т-клетки кожи человека являются локальным источником IGF-1, обладая способностью усиливать экспрессию фактора роста при активации, влияя на процессы регенерации раны.

Далее мы исследовали способность $CD3^+\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитов здоровой и поврежденной кожи синтезировать цитокины. Известно, что CD69 регулирует секрецию CD8Т-клетками и $\gamma\delta$ Т-клетками $IFN\gamma$, IL-17 и IL-22, обуславливая иммунный ответ типа 3 (GATA 3) [9]. Так, IL-22 увеличивает пролиферацию и миграцию кератиноцитов, стимулирует выработку коллагена дермальными фибробластами и способствует дифференцировке миофибробластов после ранения [19]. Анализ методом проточной цитометрии показал более низкую спонтанную секрецию IL-22 и IL-2 в CD69-дефицитных дермальных $\gamma\delta^+$ Т-клетках по сравнению с клетками, полученными из острой раны и здоровой кожи ($p < 0,001$). Резидентные Т-лимфоциты, полученные из хронической раны, не ответили на стимуляцию митогенами *in vitro* в течение 24 часов в отличие от групп сравнения ($p < 0,001$). Можно предположить, что резидентные Т-лимфоциты в хронической раневой среде становятся менее чувствительными к активации. Потеря функции $\gamma\delta^+$ Т-клеток приводит к длительному заживлению ран у мышей с диабетом [21]. При анализе количества резидентных $\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитов кожи, секретирующих IL-17 мы получили следующие цифры: здоровая кожа ($1,4\% \pm 0,085$), острая рана ($11,3\% \pm 3,2$) хроническая рана ($31,7\% \pm 11,8$) ($p < 0,001$). Умеренная продукция IL-17 резидентными Т-лимфоцитами оказывает благоприятное действие в заживлении острых ран, способствуя пролиферации кератиноцитов и выработке противомикробных пептидов [15], нерегулируемая же передача сигналов

семейства IL-17 может приводить к длительному воспалению. Возможно, постоянно повышенный уровень IL-17 связан с хроническим незаживающим течением раневого процесса. Ранее проведенные исследования показали, что уровни семейства IL-17 в раневой жидкости из венозных язв повышены по сравнению с уровнями венозной крови пациентов, взятых в одно и то же время, и семейство IL-17 также повышено в образцах пораженной ткани у пациентов с гангренозной пиодермией относительно нормальной кожи [16, 18]. Однако ни в одном из исследований не изучались конкретные подтипы семейства IL-17. Проведенное исследование указывает на то, что резидентные Т-клетки, хотя и присутствуют в хронических ранах, функционально нарушены и не способны продуцировать IGF-1 и цитокины в процессе восстановления тканей.

Заключение

Заживление кожной раны представляет собой сложный процесс, требующий постоянной связи между клетками в форме высвобождения цитокинов, межклеточных контактов и межклеточных взаимодействий. Данное исследование демонстрирует, что попадающие в кожу популяции резидентных Т-клеток ($\alpha\beta TCR^+$ и $\gamma\delta TCR^+$) способны секретировать IGF-1, IL-2, IL-22, IL-17, нормализовать гомеостаз кожи и способствовать заживлению ран. Хронические раны характеризуются стойким воспалением с замедленным заживлением. Поскольку резидентные Т-лимфоциты обеих исследуемых субпопуляций ($CD3^+\alpha\beta$ и $CD3^+\gamma\delta^+$ в хронических незаживающих ранах имеют функциональные нарушения и не способны продуцировать биологически активные вещества во время процесса регенерации и ремоделирования тканей. Возможно, активирующие антигены чрезмерно стимулируют резидентные Т-клетки в хронической ране, что приводит к их невосприимчивости к активационным сигналам. Дисфункция резидентных Т-лимфоцитов может быть вызвана повышенной экспрессией ингибирующих рецепторов, таких как апоптоз усиливающаяся в ответ на тяжелые повреждения. Полученные результаты показывают роль резидентных Т-клеток, находящихся в коже человека, в заживлении ран и дают новое представление о понимании патогенеза хронических ран. С клинической точки зрения исследование повреждения резидентных Т-клеток на ранней стадии процесса заживления раны может быть прогностическим фактором для формирования хронической раны.

Список литературы / References

1. Гольцов С.В., Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г., Паульс В.Ю. Способ определения субпопуляционно-го состава клеток кожи и получения цитоиммунограммы кожи. Патент RU2630607 (Россия) от 02.06.2016. [Goltsov S.V., Kostolomova E.G., Suhovei Yu.G., Pauls V.Yu. A method for determining the subpopulation composition of skin cells and obtaining a skin cytoimmunogram. Patent RU2630607 (Russia) on 02.06.2016].
2. Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г., Унгер И.Г. Дозозависимое влияние лиофилизированного экстракта клеток куриного эмбриона на индуцированный апоптоз моноцитов в условиях *in vitro* // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 3. С. 1206-1210. [Kostolomova E.G., Suhovei Yu.G., Unger I.G. Dependable effect of lyophilized extract of chicken embryo cells on induced apoptosis of monocytes under *in vitro* conditions. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 3, pp. 1206-1210. (In Russ.)]
3. Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г., Унгер И.Г., Акунеева Т.В. Взаимодействие иммуноцитов кожи в процессе репаративной регенерации в ране // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 20, № 2. С. 148-150. [Kostolomova E.G., Suhovei Yu.G., Unger I.G., Akuneeva T.V. Interaction of skin immunocytes in the process of reparative regeneration in the wound. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 20, no. 2, pp. 148-150. (In Russ.)]
4. 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.
5. Марков А.А., Костоломова Е.Г., Тимохина Т.Х., Соловьев Г.С., Паромова Я.И., Полянских Е.Д., Воронин К.А. Влияние супернатанта *Bifidobacterium bifidum* на морфофункциональные свойства фибробластов человека в динамике в эксперименте *in vitro* // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 3. С. 581-586. [Markov A.A., Kostolomova E.G., Timokhina T.Kh., Solov'yev G.S., Paromova Ya.I., Polyanskikh E.D., Voronin K.A. Effect of *Bifidobacterium bifidum* supernatant on the morphological and functional characteristics of human fibroblasts in real time during an *in vitro* experiment. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 3, pp. 581-586. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-EOB-2720.
6. Олейник Е.К., Чуров А.В., Олейник В.М. Иммунологическая память: роль регуляторных клеток // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 613-620. [Oleinik E.K., Churov A.V., Oleinik V.M. Immunological memory: the role of regulatory cells (TREGS). *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 613-620. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-613-620.
7. Суховой Ю.Г., Костоломова Е.Г., Унгер И.Г., Акунеева Т.В. Локальный иммунитет кожи как отражение ее возрастного и функционального состояния // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 20, № 3. С. 521-523. [Suhovei Y.G., Kostolomova E.G., Unger I.G., Akuneeva T.V. Local immunity of skin as reflection of its age and functional state. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 20, no. 3, pp. 521-523. (In Russ.)]
8. Bernal-Alferes B., Gómez-Mosqueira R., Ortega-Tapia G.T., Burgos-Vargas R., García-Latorre E., Domínguez-López M.L., Romero-López J.P. The role of $\gamma\delta$ T cells in the immunopathogenesis of inflammatory diseases: from basic biology to therapeutic targeting. *J. Leukoc. Biol.*, 2023, qiad046. doi: 10.1093/jleuko/qiad046.
9. Boothby I.C., Cohen J.N., Rosenblum M.D. Regulatory T cells in skin injury: At the crossroads of tolerance and tissue repair. *Sci. Immunol.*, 2020, Vol. 5, no. 47, eaaz9631. doi: 10.1126/sciimmunol.aaz9631.
10. Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol.*, 2017, Vol. 47, no. 6, pp. 946-953.
11. Cruz M.S., Diamond A., Russell A., Jameson J.M. Human $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in skin immunity and disease. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1304. doi: 10.3389/fimmu.2018.01304.
12. Elijah I.E., Branski L.K., Finnerty C.C., Herndon D.N. The GH/IGF-1 system in critical illness. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011, Vol. 25, no. 5, pp. 759-767.
13. Farag A.G.A., Abdu Allah A.M.K., El-Rebey H.S., Mohamed Ibraheem K.I., Mohamed A.S.E.D., Labeeb A.Z., Elgazzar A.E., Haggag M.M. Role of insulin-like growth factor-1 in skin tags: a clinical, genetic and immunohistochemical study in a sample of Egyptian patients. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 2019, Vol. 12, pp. 255-266.
14. Garoufalia Z., Papadopetraki A., Karatza E., Vardakostas D., Philippou A., Kouraklis G., Mantas D. Insulin-like growth factor-I and wound healing, a potential answer to non-healing wounds: A systematic review of the literature and future perspectives. *Biomed Rep.*, 2021, Vol. 15, no. 2, 66. doi: 10.3892/br.2021.1442.
15. Isailovic N., Daigo K., Mantovani A., Selmi C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J. Autoimmun.*, 2015, Vol. 60, pp. 1-11.
16. Ligi D., Mosti G., Croce L., Raffetto J.D., Mannello F. Chronic venous disease – Part I: Inflammatory biomarkers in wound healing. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, Vol. 1862, no. 10, pp. 1964-1974.
17. Liu M., Liu Z., Chen Y., Peng S., Yang J., Chen C., Wang J., Shang R., Tang Y., Huang Y., Zhang X., Hu X., Liou Y.C., Luo G., He W. Dendritic epidermal T cells secreting exosomes promote the proliferation of epidermal stem cells to enhance wound re-epithelialization. *Stem Cell Res. Ther.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 121. doi: 10.1186/s13287-022-02783-6.

18. Marzano A.V., Damiani G., Ceccherini I., Berti E., Gattorno M., Cugno M. Autoinflammation in pyoderma gangrenosum and its syndromic form (pyoderma gangrenosum, acne and suppurative hidradenitis). *Br. J. Dermatol.*, 2017, Vol. 176, no. 6, pp. 1588-1598.
19. McGee H.M., Schmidt B.A., Booth C.J., Yancopoulos G.D., Valenzuela D.M., Murphy A.J., Stevens S., Flavell R.A., Horsley V. IL-22 promotes fibroblast-mediated wound repair in the skin. *J. Invest. Dermatol.*, 2013, Vol. 133, no. 5, pp. 1321-1329.
20. Miescher I., Rieber J., Calcagni M., Buschmann J. *In vitro* and *In vivo* effects of IGF-1 delivery strategies on tendon healing: a review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 3, 2370. doi:10.3390/ijms24032370.
21. Munoz L.D., Sweeney M.J., Jameson J.M. Skin resident $\gamma\delta$ T cell function and regulation in wound repair. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 23, 9286. doi: 10.3390/ijms21239286.
22. Raziyeva K., Kim Y., Zharkinbekov Z., Kassymbek K., Jimi S., Saparov A. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*, 2021, Vol. 11, no. 5, 700. doi: 10.3390/biom11050700.
23. Tokura Y., Phadungsaksawasdi P., Kurihara K., Fujiyama T., Honda T. Pathophysiology of skin resident memory T Cells. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 11, 618897. doi: 10.3389/fimmu.2020.618897.
24. Tu C.-L., Celli A., Mauro T., Chang W. Calcium-sensing receptor regulates epidermal intracellular Ca^{2+} signaling and re-epithelialization after wounding. *J. Invest. Dermatol.*, 2019, Vol. 139, Iss. 4, pp. 919-929.

Авторы:

Костоломова Е.Г. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, научный сотрудник лаборатории геномики, протеомики и метаболомики Университетского НИИ медицинских биотехнологий и биомедицины ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующая научно-исследовательской лабораторией ООО «Тюменский филиал института фундаментальной и клинической иммунологии», г. Тюмень, Россия

Стрелин С.А. — к.м.н., доцент, врач, пластический хирург «Ай Кью Пластик» Тимура Хайдарова, Москва, Россия

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

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

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

Марков А.А. — к.м.н., директор, ведущий научный сотрудник Университетского НИИ медицинских биотехнологий и биомедицины, доцент кафедры медицинской профилактики и реабилитации ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Полянских Е.Д. — студентка Института материнства и детства ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Authors:

Kostolomova E.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Research Associate, Laboratory of Genomics, Proteomics and Metabolomics, University Research Institute of Medical Biotechnology and Biomedicine, Tyumen State Medical University; Head, Research Laboratory, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Tyumen Branch, Tyumen, Russian Federation

Strelin S.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Plastic Surgeon, Head Physician, Timur Khidarov IQ Plastique,, Moscow, Russian Federation

Sukhovei Yu.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Tyumen Scientific Centre, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Leading Research Associate, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Tyumen Branch, Tyumen, Russian Federation

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

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

Markov A.A., PhD (Medicine), Director, Leading Research Associate, University Research Institute of Medical Biotechnology and Biomedicine, Associate Professor, Department of Preventive Medicine and Rehabilitation, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Polyanskikh E.D., Student, Institute of Motherhood and Childhood, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ЛОКАЛЬНОГО И СИСТЕМНОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕЛАТОНИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

Осиков М.В.^{1,2}, Агеева А.А.¹, Бойко М.С.¹, Агеев Ю.И.¹

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

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

Резюме. Распространенность термической травмы, высокий риск инфекционных и неинфекционных краткосрочных и долговременных осложнений, ограниченная эффективность применяемых терапевтических подходов являются предпосылкой для поиска и патогенетического обоснования новых средств терапии, среди которых внимание привлекает эндогенный регулятор гомеостаза с плейотропными свойствами – мелатонин.

Цель работы – изучить влияние локального в составе оригинальной дермальной пленки и системного применения мелатонина на концентрацию TNF α и IL-4 в сыворотке при экспериментальной термической травме.

Скорость эпителизации высчитывали в %. Концентрацию в плазме IL-4, TNF α определяли на автоматическом иммуноферментном анализаторе Personal LAB (Италия).

При ТТ от 5-х к 20-м суткам эксперимента увеличивается скорость эпителизации раны. В условиях применения ДП с МТ при ТТ на 5-е, 10-е и 20-е сутки зафиксировано увеличение скорости эпителизации раны. В условиях внутрибрюшинного применения МТ при ТТ на 10-е и 20-е сутки увеличивается скорость эпителизации раны. Проведенный нами корреляционный анализ позволил выявить, что при ТТ в условиях применения ДП с МТ более сильные связи, чем в условиях применения МТ внутрибрюшинно, а значит быстрее проходят процессы репарации, снижается площадь альтерации и уменьшается синтез цитокинов в сыворотке.

При ТТ концентрация TNF α и IL-4 повышается в сыворотке крови на 5-е, 10-е и 20-е сутки. На 10-е и 20-е сутки были зарегистрированы умеренные положительные ассоциации между скоростью эпителизации раны и концентрацией цитокинов в сыворотке крови. Внутрибрюшинное применение МТ с ТТ на 5-е, 10-е и 20-е сутки увеличивает скорость эпителизации, на 10-й и 20-й дни концентрация TNF α снижается. На 5-е, 10-е и 20-е сутки были зарегистрированы умеренные негативные ассоциации между скоростью эпителизации раны и концентрацией TNF α . В условиях применения ДП с МТ с ТТ скорость эпителизации раны увеличивается на 5-е, 10-е и 20-е сутки, концентрация TNF α в сыворотке крови снижается, концентрация IL-4 снижается на 10-е сутки. На 5-е, 10-е и 20-е сутки были зарегистрированы отрицательные ассоциации между скоростью эпителизации раны и концен-

Адрес для переписки:

Бойко Маргарита Сергеевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (982) 288-07-18.
E-mail: ritkaboyko@yandex.ru

Address for correspondence:

Margarita S. Boyko
South Ural State Medical University
64 Vorovsky St
Chelyabinsk
454092 Russian Federation
Phone: +7 (982) 288-07-18.
E-mail: ritkaboyko@yandex.ru

Образец цитирования:

М.В. Осиков, А.А. Агеева, М.С. Бойко, Ю.И. Агеев
«Иммунорегуляторные эффекты локального
и системного применения мелатонина при
экспериментальной термической травме»
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,
№ 2. С. 123-128.
doi: 10.46235/1028-7221-9408-IEO

© Осиков М.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.V. Osikov, A.A. Ageeva, M.S. Boyko, Yu.I. Ageev
“Immunoregulatory effects of local and systemic use of
melatonin in experimental thermal trauma”, *Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*, 2023,
Vol. 26, no. 2, pp. 123-128.
doi: 10.46235/1028-7221-9408-IEO

© Osikov M.V. et al., 2023

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-9408-IEO

трациями TNF α и IL-4 в сыворотке крови. Сравнительный анализ эффективности применения ДП с МТ, в отличие от внутрибрюшинного применения МТ с ТТ, выявил более ускоренную эпителизацию раны и раннее снижение TNF α , большее количество и силу взаимосвязи между скоростью эпителизации раны и концентрацией содержания цитокинов в сыворотке крови.

Ключевые слова: термическая травма, мелатонин, эпителизация, TNF α , IL-4

IMMUNOREGULATORY EFFECTS OF LOCAL AND SYSTEMIC USE OF MELATONIN IN EXPERIMENTAL THERMAL TRAUMA

Osikov M.V.^{a, b}, Ageeva A.A.^a, Boyko M.S.^a, Ageev Yu.I.^a

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

^b Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. High incidence of thermal trauma (TT), increased risk of infectious and non-infectious short- and long-term complications, and limited effectiveness of the therapeutic approaches are the main pre-requisites for searching and pathogenetic justification of new therapies. E.g., melatonin, an endogenous homeostatic regulator with pleiotropic properties, deserves special attention. The aim of the work was to study the effect of local application (as an original dermal film) and systemic usage of melatonin upon concentrations of circulating TNF- α and IL-4 in the course of experimental thermal trauma.

The rates of wound epithelization were expressed as per cent values. The plasma concentrations of IL-4, TNF α were determined with automatic enzyme immunoassay analyzer "Personal LAB" (Italy).

In the series with TT, the rate of wound epithelization increased from the 5th to the 20th day of experiment. When using dermal films with MT in experimental TT on days +5, +10 and +20, an increase in the rate of wound epithelization was registered. Under the conditions of intraperitoneal MT injection in experimental TT, the rate of wound epithelization increased on days +10 and +20. A correlation analysis revealed stronger interrelations observed when applying dermal films with MT in thermal trauma, rather than in series with intraperitoneal usage of MT thus suggesting faster repair processes in the first case, along with diminished area of alterations and decreased amounts of cytokines in serum.

In experimental TT, the concentrations of TNF α and IL-4 increase in blood serum on days +5, +10 and +20. On days +10 and +20, moderate positive associations were recorded between the rate of wound epithelialization and the concentration of serum cytokines. Upon intraperitoneal use of MT in experimental TT, on days +5, +10 and +20, the rate of epithelization increases, along with decrease of TNF α concentration on days +10 and +20. On days +5, +10 and +20, moderate negative associations were recorded between the rate of wound epithelization and the concentration of TNF α . Under the conditions of using DP with MT with TT, the rate of wound epithelization increases on days 5, 10 and 20, the concentration of TNF α decreases in serum, the concentration of IL-4 decreases on day +10. On days +5, +10 and +20, the negative correlations were recorded between the rate of wound epithelization and serum concentrations of TNF α and IL-4. A comparative efficiency analysis of MT-containing dermal films *versus* intraperitoneal use of MT in experimental thermal trauma revealed a more accelerated epithelization of the wound along with earlier decrease in TNF α , a greater number and strength of relationships between the rate of the wound epithelization and concentrations of cytokines in blood serum.

Keywords: thermal trauma, melatonin, epithelialization, TNF α , IL-4

Введение

Ожоговая травма является одной из ключевых медицинских и социальных проблем. Несмотря на значительные достижения в комбустиологии, медленное заживление и присоединение инфекции являются ключевыми проблемами у пациентов с ожогами, которые приводят к удлинению госпитализации, снижению качества жизни и эмоциональным расстройствам [1]. До 70% всех осложнений после термической травмы (ТТ) связаны с инфекциями, в первую очередь пневмонией и инфекциями мочевыводящих путей. Развитие инфекционных осложнений, включая

сепсис, после ТТ связано с иммуносупрессивными реакциями как компенсации длительного стабильного провоспалительного ответа, особенно в связи с избыточным синтезом репродукции IL-10, IL-4, TNF α , TGF- β [2]. Иммунные реакции занимают ключевое место в патогенезе ТТ и ее осложнений на каждом этапе, понимание патофизиологии ожогов является предпосылкой для разработки патогенетически обоснованных методов терапии, а также методов безопасной некрэктомии и ушивания ран [3]. В этом отношении особый интерес представляют эндогенные регуляторы гомеостаза, которые могут вмешиваться в нарастающий иммунный ответ на ТТ и

быть задействованы в качестве иммунокорректоров.

Ранее мы показали, что применение эритропоэтина локально и системно, а также местное введение EGF при ТТ ускоряют заживление ожоговой травмы и восстановление иммунного статуса в клинических и экспериментальных условиях [4, 5]. Мелатонин (МТ) регулирует гомеостаз, оказывая плейотропные эффекты: регуляция цикла сон-бодрствование (изменение ритма секреции МТ при ТТ рассматривается как ключевой фактор нарушений сна), редокс-фактора с преобладающим антиоксидантным действием, про- и противовоспалительный, иммуномодулирующий, антиапоптогенный, регулирующий клеточную пролиферацию и дифференцировку [6]. Клетки кожи вырабатывают МТ, его метаболиты обнаруживаются в кератиноцитах, меланоцитах, фибробластах кожи [7]. Рецепторы МТ₁, МТ₂, ROR α обнаружены в кератиноцитах, фибробластах кожи, клетках волосяного фолликула и дермальных кровеносных сосудов, а также в меланоцитах [8].

В настоящее время фармацевтические формы МТ для местного применения при повреждениях кожи недоступны в РФ, а пероральные формы МТ не показаны для применения при ТТ.

Цель работы — изучить влияние локального в составе оригинальной дермальной пленки и системного применения мелатонина на концентрацию TNF α и IL-4 в сыворотке при экспериментальной термической травме.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования выполнены на 109 крысах линии Wistar массой 240-250 г в экспериментально-биологической клинике (виварии) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России. Эксперимент проводился при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию животных, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18.03.1986, Страсбург), Рекомендациями Европейской Комиссии 2007/526/ЕС от 18 июня 2007 года, Директивой 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Организация исследования одобрена этическим комитетом Южно-Уральского государственного медицинского университета, протокол № 10 от 15.11.2019, протокол № 13 28.12.2020.

Животные были случайным образом разделены на 4 группы: группа 1 (n = 26) — интактный контроль, группа 2 (n = 44) — животные с ТТ и ежедневным наложением асептической повязки (ТТ + АсП), группа 3 (n = 38) — животные с ТТ с наложением асептической повязки и наложением дермальной пленки с мелатонином

(Flamma SpA, Италия) в ежедневной разовой дозе 5 мг/г в течение 5 суток (ТТ + МТ ДП), группа 4 (n = 39) — животные с ТТ с наложением асептической повязки и внутрибрюшинным введением мелатонина (Flamma SpA, Италия) в ежедневной разовой дозе 10 мг/кг в течение 5 суток (ТТ + МТ). Для моделирования ТТ IIIA степени и относительной площадью 3,5% изолированный межлопаточный участок кожи крысы погружали в очищенную воду при 98-99 °С на 12 с. Глубину ожога верифицировали морфологическими методами. Для анестезии использовали препарат «Золетил-100» (Virbac SanteAnimale, Франция) в дозе 20 мг/кг.

ДП изготавливали на основе 4%-ного водного раствора натрий-карбоксиметилцеллюлозы (NaКМЦ) и глицерина. В качестве действующего вещества вводили спиртовой раствор МТ («ФЛАММА С.П.А.», Италия). Площадь одной ДП составила 12 см², масса — 6,0 г, содержание МТ — 0,03 г. Концентрация МТ в ДП 5 мг/г (патент № 2751048).

На 5-е, 10-е и 20-е сутки от момента индукции ТТ в группах осуществлялся забор крови под наркозом после торакотомии пункцией сердца в области левого желудочка в вакуумные пробирки Vacuette (Greiner BioOne, Австрия). Концентрацию в сыворотке IL-4, TNF α определяли на автоматическом иммуноферментном анализаторе Personal LAB (Италия) с применением специфических для крыс тест-систем Cloud-Clone Corp. (Китай) результаты выражали в пг/мл.

Скорость эпителизации (VS) рассчитывали по формуле:

$$VS = S - S_n / t,$$

где S — начальная площадь раны (в дальнейшем площадь при предыдущем измерении); S_n — площадь при последующем измерении; t — число дней между измерениями [2]. Площадь ожоговой раны в последующих измерениях определяли в %, принимая за 100% площадь раны при предыдущем измерении, результат выражали в % за сутки.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics 19. Характеристика выборки представлена в формате “Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})”, где Me — медиана, Q_{0,25} и Q_{0,75} — значение нижнего и верхнего квартиля соответственно. Значимость различий между группами оценивали при помощи критериев Краскела—Уоллиса, Манна—Уитни. С целью выявления взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R).

Результаты

При ТТ от 5-х к 20-м суткам эксперимента увеличивается скорость эпителизации раны. В динамике ТТ на 10 сутки скорость эпителизации выше (p < 0,01), чем на 5-е сутки, на 20-е сутки выше (p < 0,01), чем на 10-е и 5-е сутки (табл. 1).

При ТТ на 5-е, 10-е и 20-е сутки в сыворотке зафиксировано увеличение концентрации $TNF\alpha$, IL-4. В динамике ТТ концентрация $TNF\alpha$ и IL-4 на 10-е сутки ТТ была выше, чем на 5-е сутки, и не отличается от значений на 20-е сутки, что позволяет говорить о максимальном уровне $TNF\alpha$ и IL-4 на 10-е сутки.

Нами проведена корреляция между скоростью эпителизации раны и концентрацией в сыворотке $TNF\alpha$ и IL-4 (табл. 2). Выявлена на 10 и 20 сутки ТТ умеренная положительная связь скорости эпителизации раны с концентрацией $TNF\alpha$ и IL-4.

В условиях применения ДП с МТ при ТТ на 5, 10 и 20 сутки зафиксировано увеличение скорости эпителизации раны (табл. 1). В динамике на 10 и 20 сутки по сравнению с 5 сутками и на 20 сутки по сравнению с 5 и 10 сутками скорость эпителизации раны увеличивается.

Применение МТ в составе ДП на 5, 10 и 20 сутки в сыворотке снижается концентрация $TNF\alpha$, а концентрация IL-4 снижается только на 10 сутки (табл. 1). Наиболее выраженный эффект отмечен при оценке концентрации $TNF\alpha$, которая снижалась во все сроки наблюдения и на 10 и 20 сутки значимо отличалась от значений в группе интактных животных, то есть восстанавливалась частично. Концентрация в сыворотке IL-4 на 5, 10 и 20 сутки ТТ была значимо выше, чем в группе интактных животных.

Нами с использованием корреляционного анализа между скоростью эпителизации раны при ТТ установлены следующие значимые связи с концентрацией в сыворотке $TNF\alpha$: на 5-е сутки – умеренная отрицательная связь, на 10-е и 20-е сутки – сильная отрицательная связь; с концентрацией в сыворотке IL-4: на 10-е сутки – сильная отрицательная связь, на 20-е сутки – умеренная отрицательная связь (табл. 2).

В условиях внутрибрюшинного применения МТ при ТТ на 10-е и 20-е сутки увеличиваются скорость эпителизации раны (табл. 1). В динамике эксперимента скорость эпителизации на 10-е и 20-е сутки выше ($p < 0,01$), чем на 5-е сутки, на 20-е сутки выше ($p < 0,01$), чем на 5-е и 10-е сутки.

Внутрибрюшинное применение МТ при ТТ снижает концентрацию в сыворотке $TNF\alpha$ на 10-е и 20-е сутки, концентрация IL-4 не имеет значимых изменений (табл. 1). Во все сроки наблюдения концентрация $TNF\alpha$ и IL-4 в сыворотке была выше ($p < 0,01$), чем в группе интактных животных. В динамике ТТ концентрация $TNF\alpha$ не изменяется, концентрация IL-4 на 10-е сутки выше ($p < 0,01$), чем на 5-е сутки.

Корреляционный анализ позволил выявить взаимосвязи между скоростью эпителизации раны и концентрацией в сыворотке $TNF\alpha$: на 5-е сутки – умеренная положительная связь, на 10-е и 20-е сутки умеренная отрицательная связь (табл. 2).

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА СКОРОСТЬ ЭПИТЕЛИЗАЦИИ, КОНЦЕНТРАЦИЮ В СЫВОРОТКЕ $TNF\alpha$ И IL-4 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТТ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. EFFECT OF MELATONIN ON THE RATE OF EPITHELIALIZATION, SERUM CONCENTRATIONS OF $TNF\alpha$ AND IL-4 IN EXPERIMENTAL ТТ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Indicator	Группа 1 Интактные Group 1 Intact (n = 12)	Группа 2 ТТ + АсП Group 2 ТТ + AsB			Группа 3 ТТ + МТ ДП Group 3 ТТ + МТ DM			Группа 4 ТТ + МТ Group 4 ТТ + МТ		
		5-е сутки 5 th day (n = 12)	10-е сутки 10 th day (n = 20)	20-е сутки 20 th day (n = 17)	5-е сутки 5 th day (n = 14)	10-е сутки 10 th day (n = 20)	20-е сутки 20 th day (n = 17)	5-е сутки 5 th day (n = 16)	10-е сутки 10 th day (n = 16)	20-е сутки 20 th day (n = 7)
Скорость эпителиза- ции, % / сутки Epithelializa- tion rate, % / day	0	0,89 (0,86- 0,89) *	1,90 (1,88- 1,95) * &	2,26 (2,14- 2,55) * & ^	1,33 (1,29- 1,35) * #	6,57 (5,92- 6,93) * # &	14,30 (13,38- 15,17) * # & ^	1,15 (1,04- 1,22) * \$	2,90 (2,62- 3,27) * # \$ &	8,89 (7,80- 9,90) * # \$ & ^
$TNF\alpha$, пг/мл $TNF\alpha$, pg/mL	1,18 (0,84-1,96)	2,25 (2,02- 2,92) *	3,42 (2,72- 6,14) * &	3,48 (1,77- 5,05) *	1,77 (1,07- 2,30) #	1,96 (1,35- 4,32) * # &	1,57 (1,35- 2,69) * # &	2,33 (1,85- 3,03) * \$	2,69 (2,19- 3,03) * #	1,91 (1,35- 3,03) * #
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	0,79 (0,50-1,75)	1,93 (1,36- 2,51) *	3,26 (2,58- 5,65) * &	2,97 (1,57- 4,97) * &	1,72 (1,36- 1,86) *	2,36 (1,29- 4,22) * # &	2,08 (1,29- 2,65) *	2,11 (1,79- 2,86) * \$	2,79 (2,43- 3,36) * &	2,18 (1,79- 3,01) *

Примечание. * – значимые ($p < 0,01$) различия с группой 1 на соответствующие сутки, # – с группой 2 на соответствующие сутки, \$ – с группой 3 на соответствующие сутки, & – внутри групп на 5-е сутки, ^ – внутри групп на 10-е сутки.

Note. *, significant ($p < 0.01$) differences with group 1 on the corresponding day; #, with group 2 on the corresponding day; \$, with group 3 on the corresponding day; &, within groups on the 5th day; ^, within groups on the 10th day.

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ СКОРОСТЬЮ ЭПИТЕЛИЗАЦИИ РАНЫ И КОНЦЕНТРАЦИЕЙ В СЫВОРОТКЕ TNF α И IL-4 ПРИ ТТ

TABLE 2. CORRELATION BETWEEN THE RATE OF WOUND EPITHELIALIZATION AND SERUM CONCENTRATIONS OF TNF α AND IL-4 IN TT

Показатель Indicator	Группа 2 ТТ + АсП Group 2 TT + AsB			Группа 3 ТТ + МТ ДП Group 3 TT + MT DM			Группа 4 ТТ + МТ Group 4 TT + MT		
	5-е сутки 5 th day (n = 12)	10-е сутки 10 th day (n = 20)	20-е сутки 20 th day (n = 17)	5-е сутки 5 th day (n = 14)	10-е сутки 10 th day (n = 20)	20-е сутки 20 th day (n = 17)	5-е сутки 5 th day (n = 16)	10-е сутки 10 th day (n = 16)	20-е сутки 20 th day (n = 7)
TNF α , пг/мл TNF α , pg/mL	0,28	0,55	0,64	-0,53	-0,77	-0,75	0,54	-0,48	-0,50
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	0,32	0,48	0,46	0,30	-0,78	0,66	0,30	0,36	0,31

Примечание. Полу жирным шрифтом выделены значимые ($p < 0,05$) связи.

Note. Significant ($p < 0.05$) connections are highlighted in bold.

Обсуждение

При ТТ повышение концентрации TNF α в сыворотке связано с синдромом гиперметаболизма, в том числе генерацией АФК, катаболизмом липидов и высвобождением свободных жирных кислот, разобщением окисления и фосфорилирования [1]. Низкий уровень TNF α в сыворотке связывают с хорошим прогнозом при ТТ [1]. Наряду с изменением соотношения Th1/Th2-зависимого ответа, при ТТ имеет значение активация Th17, в том числе IL-4, в частности это приводит к ухудшению репарации и риску ожогового сепсиса [2].

Зафиксированная взаимосвязь между скоростью эпителизации раны с концентрацией в сыворотке TNF α и IL-4 объясняется тем, что в первые 5 суток, когда преобладают альтеративные (вторичная альтерация) и сосудисто-экссудативные, лейкоцитарные реакции, дегрануляция тучных клеток и высвобождение преформированных медиаторов (гистамина, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-4 и др.) приводит к артериальной и венозной гиперемии, экссудации, активации фагоцитов [3]. Далее на 10-20-е сутки увеличивается синтез коллагена, что в том числе связано с активацией химазой мастоцитов сигнального пути TGF- β 1/Smads и пролиферацией фибробластов, увеличение синтеза серотонина, что повышает выживаемость и миграцию фибробластов и кератиноцитов, участвуя таким образом в регуляции заживления ожоговой раны, а применение блокаторов высвобождения эндогенного серотонина приводит к замедлению эпителизации.

При сравнении при ТТ эффектов локального применения МТ в отличие от внутрибрюшинного применения МТ выявлено, что на 5-е, 10-е и 20-е сутки более выраженное увеличение скорости эпителизации, а также зафиксирована более низкая концентрация в сыворотке TNF α и IL-4 на 5-е сутки наблюдения.

Полученный протекторный, ускоряющий заживление эффект МТ в очаге ТТ обусловлен

мультигитропными свойствами и обеспечивается несколькими механизмами. Во-первых, известное антиоксидантное действие МТ, за счет снижения выраженности вторичной альтерации в очаге повреждения кожи, активацию и продукцию медиаторов, прежде всего провоспалительных цитокинов. Антиоксидантный эффект МТ и защита клеток от окислительного повреждения повышает целостность микросомальной мембраны и уменьшает утечку гидролаз в цитозоль и межклеточное пространство [4]. Уменьшается активация циркулирующих в крови фагоцитов, в том числе поглотительная и НСТ-редуцирующая активности нейтрофилов; снижается гибель лимфоцитов при TNF α -опосредованном апоптозе [6]. Падение концентрации в крови TNF α , и др. цитокинов ограничивают синтез в гепатоцитах реактантов острой фазы, в том числе С-РБ.

Во-вторых, противовоспалительное действие МТ связывают с ограничением NF- κ B-зависимых путей сигнализации. МТ ингибирует экспрессию iNOS, циклооксигеназы (ЦОГ)-2, TNF α , NLRP3-зависимый путь сигнализации, активируемый при окислительном повреждении митохондрий и связанный с экспрессией IL-1 β и IL-18, проапоптогенных факторов [7]. Посредником противовоспалительного действия МТ выступает сиртуин SIRT1, подавляющий активацию NF- κ B-, NLRP3-зависимых путей. МТ изменяет фенотип макрофагов в сторону преобладания M2 субпопуляции с противовоспалительным потенциалом.

В-третьих, протекторное действие МТ в очаге ТТ обусловлено его антиапоптогенным эффектом: опосредованно через снижение активации клеток-продуцентов TNF α , снижение экспрессии проапоптотических белков в кератиноцитах за счет уменьшения выхода цитохрома С из митохондрий, подавления активации каспаз-9, 3 и 7 [8]. Это продемонстрировано в кератиноцитах линии HaCaT с помощью TUNEL-теста. МТ подавляет апоптоз и аутофагию в кардиомиоцитах

при ишемическом повреждении через активацию NAD-зависимого гистона SIRT1.

Проведенный нами корреляционный анализ, позволил выявить, что при ТТ в условиях применения ДП с МТ более сильные связи, чем в условиях применения МТ внутрибрюшинно, а значит быстрее проходят процессы репарации, снижается площадь альтерации и уменьшается синтез цитокинов в сыворотке.

Выводы

1. При ТТ на 5-е, 10-е и 20-е сутки в сыворотке увеличивается концентрация TNF α и IL-4. На 10-е и 20-е сутки зафиксированы умеренные положительные связи между скоростью эпителизации раны и концентрацией цитокинов в сыворотке.

2. Внутрибрюшинное применение МТ при ТТ на 5-е, 10-е и 20-е сутки увеличивается ско-

рость эпителизации, на 10-е и 20-е сутки снижается концентрация TNF α . На 5-е, 10-е и 20-е сутки зафиксированы умеренные отрицательные связи между скоростью эпителизации раны и концентрацией TNF α .

3. В условиях применения ДП с МТ при ТТ на 5-е, 10-е и 20-е сутки увеличивается скорость эпителизации раны, в сыворотке снижается концентрация TNF α , концентрация IL-4 снижается на 10-е сутки. На 5-е, 10-е и 20-е сутки зафиксированы отрицательные связи между скоростью эпителизации раны и концентрацией в сыворотке TNF α и IL-4.

4. Сравнительный анализ эффективности применения ДП с МТ в отличие от внутрибрюшинного применения МТ при ТТ выявил более ускоренную эпителизацию раны и раннее снижение TNF α , больше количество и силы взаимосвязей между скоростью эпителизации раны и концентрацией цитокинов в сыворотке.

Список литературы / References

1. Boutin J.A., Ferry G. Is there sufficient evidence that the melatonin binding Site MT3 is Quinone Reductase 2? *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2019, Vol. 368, no. 1, pp. 59-65.
2. Dong K., Goyarts E., Rella A., Pelle E., Wong Y.H., Pernodet N. Age associated decrease of MT-1 melatonin receptor in human dermal skin fibroblasts impairs protection against UV-induced DNA damage. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 1, 326. doi: 10.3390/ijms21010326.
3. Favero G., Franceschetti L., Bonomini F., Rodella L.F., Rezzani R. Melatonin as an anti-inflammatory agent modulating inflammasome activation. *Int. J. Endocrinol.*, 2017, Vol. 2017, 1835195. doi: 10.1155/2017/1835195.
4. Galano A., Tan D.X., Reiter R.J. Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage. *Molecules*, 2018, Vol. 23, no. 3, 530. doi:10.3390/molecules23030530.
5. Hardeland R. Aging, melatonin, and the pro- and anti-inflammatory networks. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 5, 1223. doi:10.3390/ijms20051223.
6. Lateef Z., Stuart G., Jones N., Mercer A., Fleming S., Wise L. The cutaneous inflammatory response to thermal burn injury in a murine model. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 3, 538. doi: 10.3390/ijms20030538.
7. Loynes C.A., Lee J.A., Robertson A.L., Steel M.J., Ellett F., Feng Y., Levy B.D., Whyte M.K., Renshaw S.A. PGE2 production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution *in vivo*. *Sci. Adv.*, 2018, Vol. 4, no. 9, eaar8320. doi:10.1126/sciadv.aar8320.
8. Mayo J.C., Aguado A., Cernuda-Cernuda R., Alvarez-Artime A., Cepas V., Quiros-Gonzalez I., Hevia D., Sáinz R.M. Melatonin uptake by cells: an answer to its relationship with glucose? *Molecules*, 2018, Vol. 23, no. 8, e1999. doi:10.3390/molecules23081999.

Авторы:

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

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

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

Агеев Ю.И. — к.м.н., доцент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Osikov M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University; Head, Department of Scientific Work, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia

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

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

Ageev Yu.I., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 07.05.2023
Принята к печати 19.06.2023

Received 07.05.2023
Accepted 19.06.2023

УЧАСТИЕ PAR2 В ВЫХОДЕ МЕДИАТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ ИЗ ЭОЗИНОФИЛОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Цинью Ху¹, Хаоян Ванг²

¹ Второй Народный Госпиталь, Даньянг, Цзянсу, Китай

² Департамент педиатрии, Университет Лаваль, Квебек, Канада

Резюме. Активируемые протеиназами рецепторы (PAR) относятся к семейству рецепторов, связанных с G-белками, и могут расщепляться некоторыми сериновыми протеазами с экспозицией фиксированного домена-лиганда, который связывает и активирует рецепторы, инициируя множественные сигнальные каскады. Имеются доказательства того, что некоторые протеазы могут регулировать клетки-мишени, активируя PAR, и есть много исследований, в которых показана важная роль PAR при воспалении. В одной из работ обнаружено, что ингибирование и делеция PAR2 значительно подавляют степень воспаления из-за снижения уровней IL-6 и IL-1 β . Другое исследование также показало, что активация PAR может способствовать продукции активных форм кислорода и передаче сигналов MAPK, что приводит к альвеолярному воспалению. Кроме того, CAPN1 тромбоцитарного происхождения может инициировать воспаление сосудов, связанное с диабетом, посредством расщепления PAR1 и высвобождения TNF α с поверхности эндотелиальных клеток, а сарсасапогенин может ослаблять диабетическую нефропатию путем подавления PAR1. Показано, что экстракт коры *Phellodendron amurense* может подавлять индуцированный твердыми частицами приток Ca²⁺, что вызвано прямым воздействием на PAR2, ослабляет воспаление и поддерживает гомеостатические уровни факторов клеточной адгезии. Существуют также два других антагониста I-287 и GB88, которые могут уменьшать воспалительную реакцию, опосредованную PAR2. В настоящем исследовании мы оценивали экспрессию PAR и высвобождение IL-5, IL-6, RANTES и ECP из эозинофилов крови человека с использованием различных ферментов и агонистов PAR. Экспрессию PARs оценивали в эозинофилах крови человека с помощью проточной цитометрии и ОТ-ПЦР, а уровни цитокинов и эозинофильного катионного белка (ECP) в культивируемых супернатантах определяли с помощью наборов ELISA. Результаты проточной цитометрии показывают, что эозинофилы человека экспрессируют белок PAR2 и не экспрессируют белки PAR1, PAR3 и PAR4. Анализ с помощью ОТ-ПЦР выявил экспрессию генов PAR2 и PAR3 в эозинофилах человека. Триптаза, трипсин и эластаза могут индуцировать высвобождение IL-5, IL-6 и ECP в значительных количествах. Трипсин и эластаза также могут стимулировать секрецию RANTES, но триптаза неспособна индуцировать секрецию RANTES. Индуцированное триптазой, трипсином и эластазой высвобождение цитокинов и ECP из эозинофилов крови человека, скорее всего, происходит посредством активации PAR2.

Ключевые слова: PAR2, эозинофилы, медиатор воспаления, трипсин, триптаза, эластаза

Адрес для переписки:

Хаоян Ванг
Департамент педиатрии, Исследовательский центр
CHUL (CHUQ), Университет Лаваль
Бульвар Лорье, 2705, п/я RC-9800, Квебек,
Канада, G1V 4G2
Тел.: + 1 (778) 251-45-96.
E-mail: why1027cn@gmail.com

Address for correspondence:

Haoyang Wang
Department of Pediatrics, Centre de Recherche du CHUL
(CHUQ), Laval University
2705 Laurier Blvd
Local RC-9800, Québec
Québec
Canada, G1V 4G2
Phone: + 1 (778) 251-45-96.
E-mail: why1027cn@gmail.com

Образец цитирования:

Цинью Ху, Хаоян Ванг «Участие PAR2 в выходе медиаторов воспаления из эозинофилов крови человека» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 2. С. 129-140.
doi: 10.46235/1028-7221-10759-IOP

© Ху Цинью, Ванг Хаоян, 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Xinyu Hu, Haoyang Wang "Involvement of PAR2 in inflammatory mediator release from human blood eosinophils", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 2, pp. 129-140.
doi: 10.46235/1028-7221-10759-IOP

© Hu Xinyu, Wang Haoyang, 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-10759-IOP

INVOLVEMENT OF PAR2 IN INFLAMMATORY MEDIATOR RELEASE FROM HUMAN BLOOD EOSINOPHILS

Xinyu Hu^a, Haoyang Wang^b

^a Danyang Second People Hospital, Danyang, Jiangsu, China

^b Department of Pediatrics, Laval University, Québec, Québec, Canada

Abstract. Proteinase Activated Receptors (PARs) are the members of G-protein-coupled receptor family and can be cleaved by certain serine proteases to expose a tethered ligand domain, which binds and activates the receptors to initiate multiple signaling cascades. There is some evidence that certain proteases may regulate target cells by activating PARs. There are many studies, in which PARs play important roles in inflammation. One study indicated that PAR2 inhibition and deletion significantly suppressed the degree of inflammation due to decreased IL-6 and IL-1 β levels. Another study also showed that PAR's activation could mediate reactive oxygen species production and MAPK signaling leading to alveolar inflammation. In addition, platelet-derived CAPN1 can trigger the vascular inflammation associated with diabetes via cleavage of PAR1 and the release of TNF α from the endothelial cell surface, and sarsasapogenin may alleviate diabetic nephropathy by the downregulation of PAR1. Another *Phellodendron amurense* bark extract can suppress the particulate matter-induced Ca²⁺ influx caused by direct action upon PAR2, alleviating inflammation and maintaining homeostatic levels of cell adhesion components. There are also other two antagonists of I-287 and GB88, which can reduce the PAR2-mediated inflammatory reaction. In this study, we tested expression of PARs and IL-5, IL-6, RANTES and ECP release from human blood eosinophils using different enzymes and PAR agonists. The expression of PARs was assessed in human blood eosinophils by flow cytometry and RT-PCR, and the levels of cytokine and eosinophil cationic protein (ECP) in the cultured supernatants were determined with ELISA kits. Flow cytometry shows that human eosinophils express PAR2 protein and do not express PAR1, PAR3 and PAR4 proteins. RT-PCR analysis revealed expression of PAR2 and PAR3 genes in human eosinophils. Tryptase, trypsin and elastase can induce significant IL-5, IL-6 and ECP release. Trypsin and elastase may also stimulate RANTES secretion, but tryptase cannot induce the RANTES secretion. Tryptase, trypsin and elastase-induced cytokine and ECP release from human blood eosinophils most likely occurs via activation of PAR2.

Keywords: PAR2, eosinophils, inflammatory mediator, trypsin, tryptase, elastase

Introduction

There are some evidences that certain proteases can regulate target cells by activating PARs [1]. Four members of this receptor family has been cloned and named PAR1, PAR2, PAR3 and PAR4 [14, 15, 25, 27, 31, 35]. Human PAR1, PAR2 and PAR3 are activated by thrombin [14, 15, 27, 31, 35], however PAR2 is activated by trypsin [25]. It has been reported that they are expressed on many inflammatory cells, such as mast cells [12, 26, 36], eosinophils [5, 10, 24], neutrophils [32], macrophages [17, 28], T cells and B cells [4, 13, 16]. There are many studies, in which PARs play important roles in inflammation. One study indicated that PAR2 inhibition and deletion significantly suppressed inflammatory level, which was related to decreased IL-6 and IL-1 β levels [3]. Another study also showed that PARs activation could mediate reactive oxygen species production and MAPK signaling leading to alveolar inflammation [19]. In addition, platelet-derived CAPN1 can trigger the vascular inflammation associated with diabetes via the cleavage of PAR1 and the release of TNF α from the endothelial cell surface and sarsasapogenin can alleviate diabetic nephropathy through down-regulating PAR1 [21, 29]. Another phellodendron

amurense bark extract can suppress particulate matter-induced Ca²⁺ influx by directly acting on PAR2, alleviate inflammation and maintain homeostatic levels of cell adhesion components [8]. There are also other two antagonists of I-287 and GB88, which can reduce PAR2 mediated inflammatory reaction [24, 25]. Furthermore, the inhibition of PAR4 can reduce neuroinflammation [22].

Eosinophils are considered to be one of the major effector cells in asthma and there is a strong linkage between the accumulation of eosinophils in the airways of asthma and symptoms. Once present in the tissue, they respond to specific stimuli and release a variety of proinflammatory mediators such as lipid metabolites and cytotoxic granule proteins. Secretion of these mediators causes tissue damage within the airways and contributes to the characteristics of asthma [27].

Previous study indicates that trypsin can stimulate the release of inflammatory mediators from human eosinophils via the activation of PAR2. Human eosinophils express PAR2 [6, 24]. However, the effects of PAR2 agonists on the secretion of IL-5 and RANTES from human eosinophils are unclear. In the current study, the effects of trypsin, tryptase, elastase and PAR2 agonist peptides SLIGKV-NH₂ and tc-

LIGRLO-NH₂ on IL-5 and RANTES release from human eosinophils were investigated. The effects of these agonists on IL-6 and ECP secretion were also evaluated.

Materials and methods

Materials

Human trypsin, soy bean trypsin inhibitor (SBTI), leupeptin hemisulfate, benzamidine, PAR2 inhibitor and bovine serum albumin (BSA, fraction v) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Recombinant human lung beta tryptase was from Promega (Madison, WI, USA). Human IL-5, IL-6 and RANTES ELISA kits were obtained from Pierce. Human ECP ELISA kit was obtained from Cusabio. Agonist peptides of PAR2, SLIGKV-NH₂ and tc-LIGRLO-NH₂ were synthesized in CL Bio-Scientific Inc (Xi An, China). RPMI 1640, Pen-Strep, fetal calf serum (FCS) and insulin were from GIBCO. Ficoll-Paque Plus was obtained from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). Anti-CD16 magnetic bead antibody was purchased from MiltenyiBiotec. Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated mouse anti-human PAR1 and PAR2 monoclonal antibodies, rabbit anti-human PAR3 and PAR4 polyclonal antibodies, mouse IgG1 FITC and IgG2a, rabbit IgG and goat anti-rabbit IgG-FITC were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). FITC-labeled mouse anti-human CD49d antibody was obtained from BioLegend. Trizol reagent was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The reverse transcription PCR kit was from TakaRa, (Dalian, China). SYBR Green 1 Nucleic Acid Gel Stain was obtained from BMA Inc (USA). All other reagents of analytic grade were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Isolation of human blood eosinophils

The informed consent from 5 healthy volunteers and agreement with the ethical committee of Danyang Second People Hospital were obtained. Human blood eosinophils were isolated by a Ficoll-Paque density gradient method [29]. In brief, fresh peripheral blood was obtained from healthy volunteers, 200 mL from each individual per visit. After centrifugation at 500 × g for 30 min, the granulocyte layer directly above the red blood cells was carefully collected with a pipette. The collected cells were then resuspended in 0.5 mL of a buffer, containing PBS and 1% FCS and the remaining red blood cells were lysed by adding H₂O at room temperature for 45 seconds with the equilibration by 1.8% NaCl. After washing twice with PBS, containing 1% FCS at 500 × g for 5 min, eosinophils were resuspended in RPMI 1640 medium, containing 0.5% BSA and 2M EDTA and were incubated with anti-CD16 magnetic bead antibody at 4 °C for 30 min and eluted 3 times in 5 mL buffer. The purity of eosinophils was consistently more than 95% with a little contaminated neutrophils

as determined with FITC-labeled mouse anti-human CD49d antibody by flow cytometry and cell count and cell viability was more than 98% as judged by trypan blue dye exclusion.

Determination of PAR expression on human eosinophils

To detect PAR1 and PAR2 expression, purified human eosinophils were incubated with FITC-conjugated mouse anti-human PAR1 and PAR2 monoclonal antibodies for 2 hours on ice. Similarly, for the detection of PAR3 and PAR4 expression, purified human eosinophils were incubated with rabbit anti-human PAR3 and PAR4 polyclonal antibodies for 15 minutes on ice and followed by the incubation of FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG for 30 minutes. The cells were washed twice with PBS and were resuspended in 0.5 mL PBS for flow cytometric analyses using a FACScan cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data were acquired and analyzed with CellQuest software (BD Immunocytometry Systems).

Determination of PAR mRNA expression on human eosinophils

Total RNA was extracted from eosinophils using TRIzol reagent and was reverse-transcribed to random primed cDNA with a commercial RT-PCR kit according to the manufacturer's instructions. PCR amplification of the cDNA was conducted using β-actin as the internal control. The amplification conditions were as follows: for PAR1, PAR2, PAR3 and PAR4, 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 67 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and then a final elongation cycle of 10 min at 72 °C. For β-actin, 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and then a final elongation cycle of 10 min at 72 °C. Electrophoresis was conducted on 1.5% agarose gels that were stained with SYBR Green 1 Nucleic Acid Gel Stain (BMA) and photographed under UV light. PCR products were confirmed by sequencing.

Challenge of human eosinophils

In order to allow cells to recover from purification procedure, isolated eosinophils were cultured in 24 well culture plates at a density of 1 × 10⁶ cells/well in RPMI 1640 medium (containing 2% FCS and 1% Pen/Strep) at 37 °C with 5% CO₂ for at least 1 h. The culture supernatants were then removed and the cells were washed with RPMI 1640 medium twice at 300 × g for 10 min. For challenge experiments, cells were exposed to various concentrations of trypsin (0.01-1 µg/mL), tryptase (0.125-0.5 µg/mL), elastase (0.125-0.5 µg/mL), inhibitors of proteinases (10 and 30 µg/mL), PAR2 inhibitor (30 µg/mL) and agonist peptides of PAR2 (all at 0.1-100 µM) for 16 h and 30 min respectively before the culture supernatants were harvested and stored at -80 °C until use.

Measurement of IL-5, IL-6, RANTES and ECP

The levels of IL-5, IL-6, RANTES and ECP in the culture supernatants were determined with an

ELISA Kit according to the manufacturer's instructions. The optical density (OD) of samples was measured using a Spectra Max 340 PC Microplate Reader (Molecular Devices, USA).

Statistical analysis

The values were shown as mean \pm SEM and the differences between groups were tested for significance using the Student's t test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ were taken as statistically significant. All statistics were performed using SPSS 11.0 for Windows (SPSS Inc).

Results

Expression of PAR2 by human eosinophils

Eosinophils express PAR2, not PAR1, PAR3 or PAR4 protein (Figure 1). RT-PCR analyses show that eosinophils express only PAR2 and PAR3, not PAR1 and PAR4 mRNA (Figure 2). The experiments were repeated 5 times with five different donors.

Effects of serine proteinases on IL-5, IL-6, RANTES and ECP secretion from human eosinophils

Tryptase at concentration of 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induced much more IL-5, IL-6 and ECP secretion and at concentrations of 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induced more significant IL-5, IL-6 and ECP secretion from eosinophils, when compared to medium, leupeptin, benzamide and cycloheximide controls. The tryptase inhibitors, leupeptin and benzamide and PAR2 inhibitor, cycloheximide inhibited tryptase-induced IL-5, IL-6 and ECP release at concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, when they were mixed with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of tryptase (Figures 3, 4, 5). Similarly, trypsin at concentrations of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induced more significant IL-5, IL-6, RANTES and ECP

secretion from eosinophils, when compared to medium, SBTI and cycloheximide controls. Trypsin inhibitor, SBTI at concentrations of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and PAR2 inhibitor, cycloheximide at concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ could substantially reduce trypsin-induced IL-5, IL-6, RANTES and ECP release, when they were mixed with 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of trypsin. However, trypsin at concentration of 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ failed to induce IL-5, IL-6, RANTES and ECP secretion from eosinophils, when compared to medium, SBTI and cycloheximide controls (Figures 6, 7, 8, 9). Furthermore, elastase at concentrations of 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induced more significant IL-5, IL-6, RANTES and ECP secretion from eosinophils, when compared to medium, EI and cycloheximide controls. Elastase inhibitor and PAR2 inhibitor, cycloheximide at concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ could significantly reduce elastase-induced IL-5, IL-6, RANTES and ECP release, when they were mixed with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of elastase. However, elastase at concentration of 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ failed to induce IL-5, IL-6, RANTES and ECP secretion from eosinophils, when compared to medium, EI and cycloheximide controls (Figures 10, 11, 12, 13).

Effects of PAR2 agonist peptides on IL-5, IL-6, RANTES and ECP secretion from human eosinophils

The PAR2 agonist peptides SLIGKV-NH₂ and t-LIGRLO-NH₂ at concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induced much more IL-5, IL-6, RANTES and ECP secretion and at concentrations of 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induced more significant IL-5, IL-6 and RANTES release from eosinophils, when compared to medium control (Figures 14, 15, 16, 17).

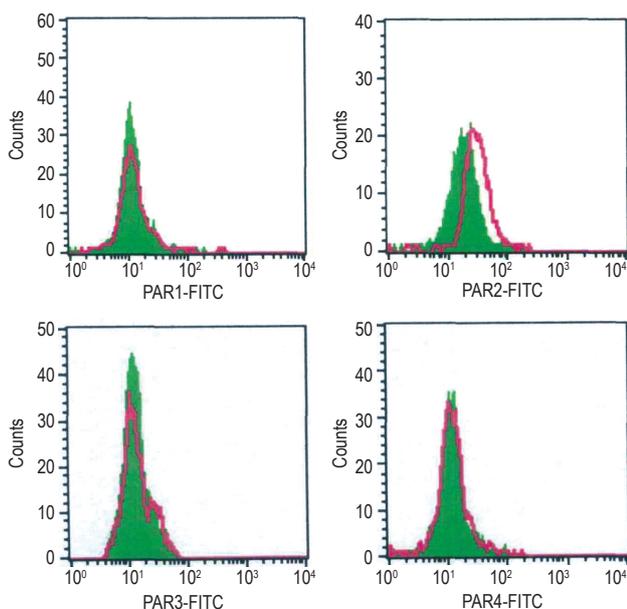


Figure 1. Expression of PARs protein by flow cytometry analysis on human eosinophils

Note. Eosinophils express PAR2 protein and do not express PAR1, PAR3 and PAR4 proteins.

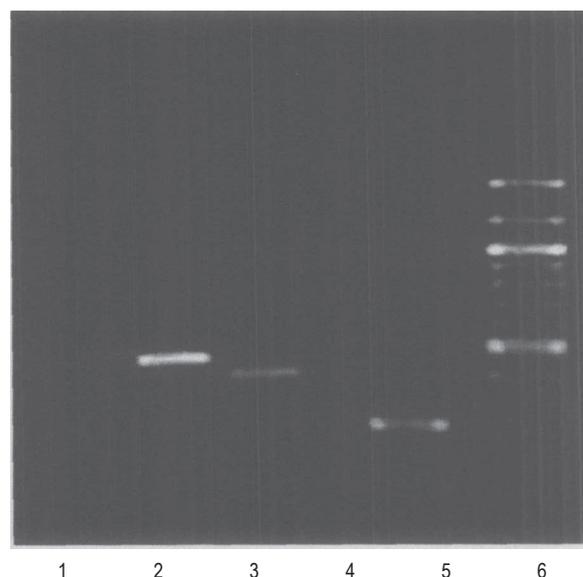


Figure 2. mRNA expression of PARs by RT-PCR analysis in human eosinophils

Note. RT-PCR shows that eosinophils express PAR2 and PAR3 genes and did not express PAR1 and PAR4 genes. Lanes 1-6 represent PAR1, PAR2, PAR3, PAR4, β -actin and DNA marker, respectively.

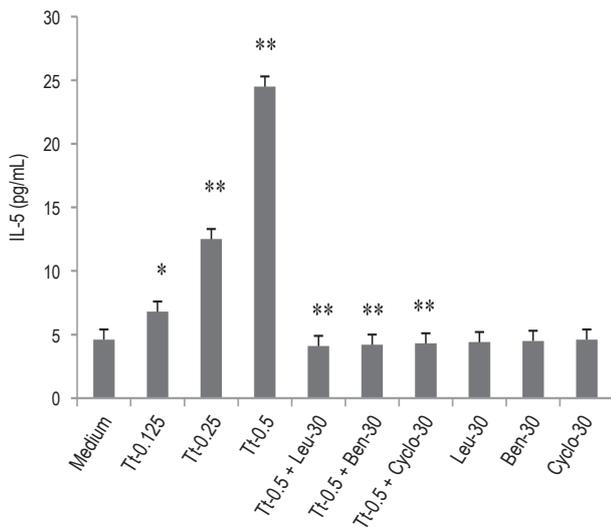


Figure 3. Effects of trypsin on IL-5 release from human eosinophils

Note. Trypsin at concentration of 0.125 µg/mL induced much more IL-5 secretion and at concentrations of 0.25 µg/mL and 0.5 µg/mL induced more significant IL-5 secretion from eosinophils, when compared to medium, leupeptin, benzamide and cycloheximide controls. Trypsin inhibitors, leupeptin and benzamide and PAR2 inhibitor, cycloheximide inhibited trypsin-induced IL-5 release at concentration of 30 µg/mL, when they were mixed with 0.5 µg/mL of trypsin.

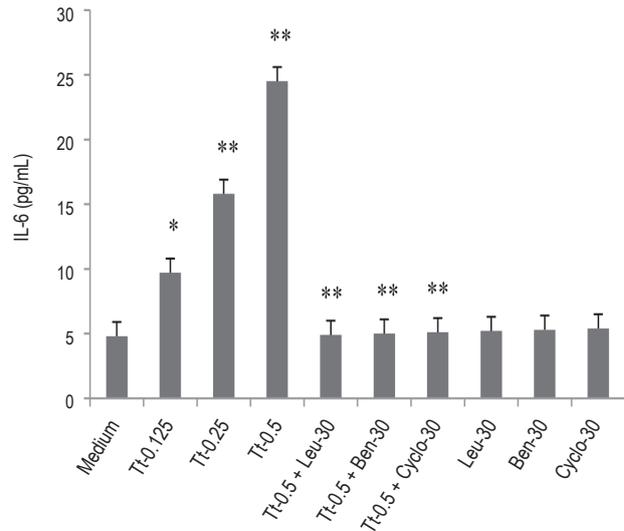


Figure 4. Effects of trypsin on IL-6 release from human eosinophils

Note. Trypsin at concentration of 0.125 µg/mL induced much more IL-6 secretion and at concentrations of 0.25 µg/mL and 0.5 µg/mL induced more significant IL-6 secretion from eosinophils, when compared to medium, leupeptin, benzamide and cycloheximide controls. Trypsin inhibitors, leupeptin and benzamide and PAR2 inhibitor, cycloheximide inhibited trypsin-induced IL-6 release at concentration of 30 µg/mL, when they were mixed with 0.5 µg/mL of trypsin.

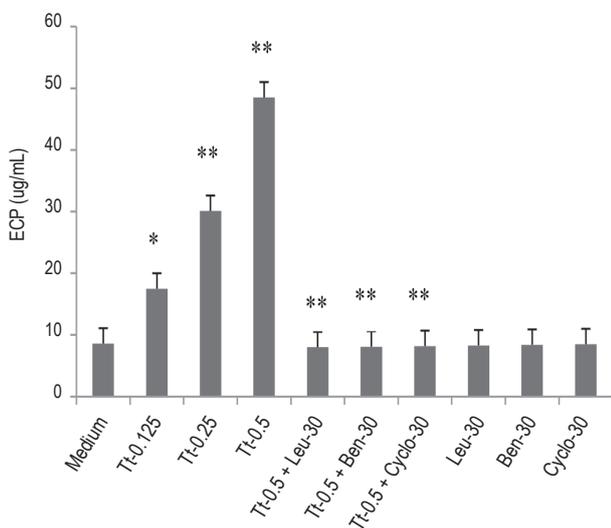


Figure 5. Effects of trypsin on ECP release from human eosinophils

Note. Trypsin at concentration of 0.125 µg/mL induced much more ECP secretion and at concentrations of 0.25 µg/mL and 0.5 µg/mL induced more significant ECP secretion from eosinophils, when compared to medium, leupeptin, benzamide and cycloheximide controls. Trypsin inhibitors, leupeptin and benzamide and PAR2 inhibitor, cycloheximide inhibited trypsin-induced ECP release at concentration of 30 µg/mL, when they were mixed with 0.5 µg/mL of trypsin.

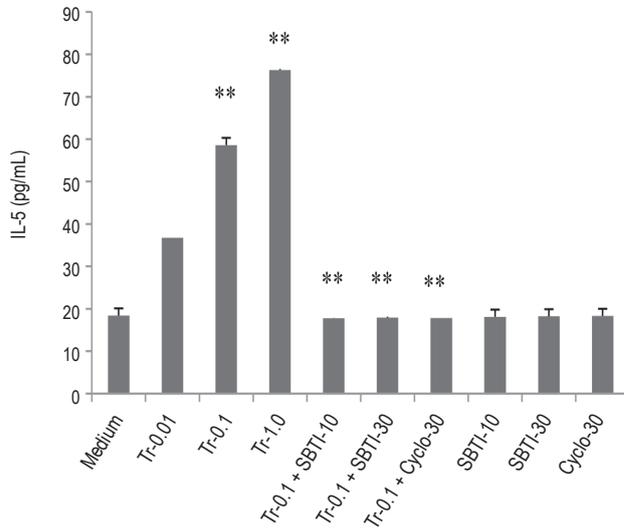


Figure 6. Effects of trypsin on IL-5 release from human eosinophils

Note. Trypsin at concentrations of 0.1 µg/mL and 1.0 µg/mL induced more significant IL-5 secretion from eosinophils, when compared to medium, leupeptin, benzamide and cycloheximide controls. Trypsin inhibitor, SBTI at concentrations of 10 µg/mL and 30 µg/mL and PAR2 inhibitor, cycloheximide at concentration of 30 µg/mL can substantially reduce trypsin-induced IL-5 release, when they are mixed with 0.1 µg/mL of trypsin.

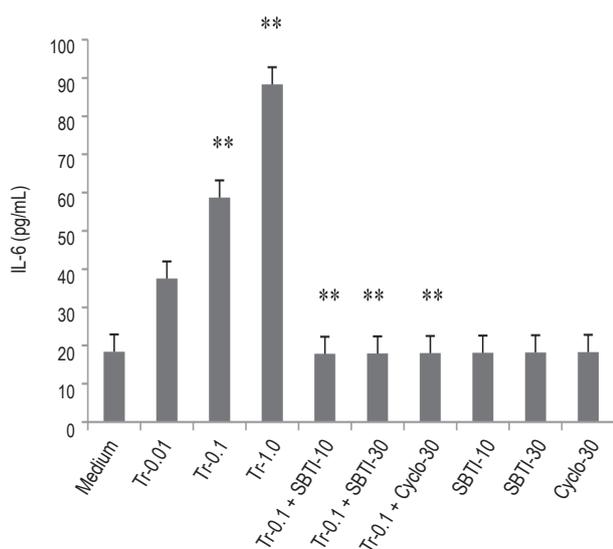


Figure 7. Effects of trypsin on IL-6 release from human eosinophils

Note. Trypsin at concentrations of 0.1 $\mu\text{g/mL}$ and 1.0 $\mu\text{g/mL}$ induced more significant IL-6 secretion from eosinophils, when compared to medium, leupeptin, benzamide and cycloheximide controls. Trypsin inhibitor, SBTI at concentrations of 10 $\mu\text{g/mL}$ and 30 $\mu\text{g/mL}$ and PAR2 inhibitor, cycloheximide at concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$ can substantially reduce trypsin-induced IL-6 release, when they are mixed with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ of trypsin.

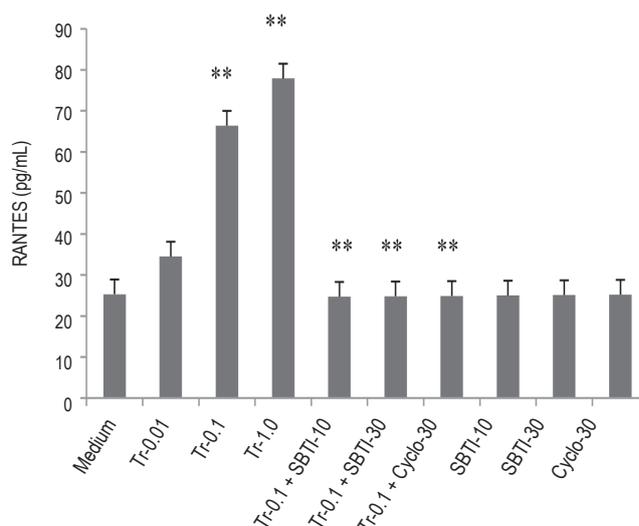


Figure 8. Effects of trypsin on RANTES release from human eosinophils

Note. Trypsin at concentrations of 0.1 $\mu\text{g/mL}$ and 1.0 $\mu\text{g/mL}$ induced more significant RANTES secretion from eosinophils, when compared to medium, leupeptin, benzamide and cycloheximide controls. Trypsin inhibitor, SBTI at concentrations of 10 $\mu\text{g/mL}$ and 30 $\mu\text{g/mL}$ and PAR2 inhibitor, cycloheximide at concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$ can substantially reduce trypsin-induced RANTES release, when they are mixed with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ of trypsin.

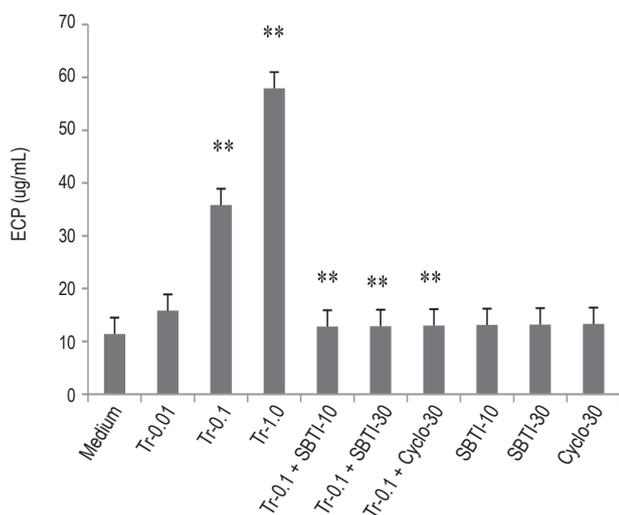


Figure 9. Effects of trypsin on ECP release from human eosinophils

Note. Trypsin at concentrations of 0.1 $\mu\text{g/mL}$ and 1.0 $\mu\text{g/mL}$ induced more significant ECP secretion from eosinophils, when compared to medium, leupeptin, benzamide and cycloheximide controls. Trypsin inhibitor, SBTI at concentrations of 10 $\mu\text{g/mL}$ and 30 $\mu\text{g/mL}$ and PAR2 inhibitor, cycloheximide at concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$ can substantially reduce trypsin-induced ECP release, when they are mixed with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ of trypsin.

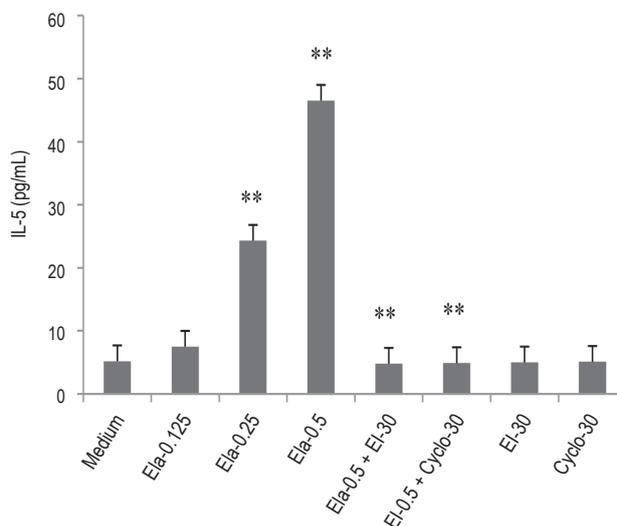


Figure 10. Effects of elastase on IL-5 release from human eosinophils

Note. Elastase at concentrations of 0.25 $\mu\text{g/mL}$ and 0.5 $\mu\text{g/mL}$ induced more significant IL-5 secretion from eosinophils, when compared to medium, leupeptin, benzamide and cycloheximide controls. Elastase inhibitor, EI and PAR2 inhibitor, cycloheximide at concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$ can substantially reduce elastase-induced IL-5 release, when they are mixed with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ of elastase.

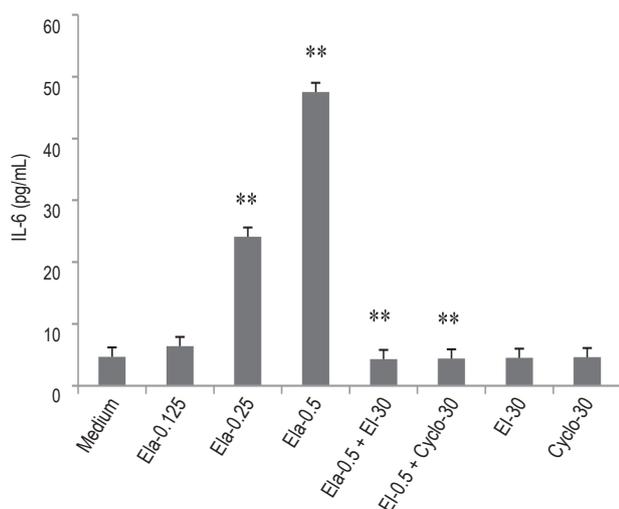


Figure 11. Effects of elastase on IL-6 release from human eosinophils

Note. Elastase at concentrations of 0.25 $\mu\text{g/mL}$ and 0.5 $\mu\text{g/mL}$ induced more significant IL-6 secretion from eosinophils, when compared to medium, leupeptin, benzamide and cycloheximide controls. Elastase inhibitor, EI and PAR2 inhibitor, cycloheximide at concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$ can substantially reduce elastase-induced IL-6 release, when they are mixed with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ of elastase.

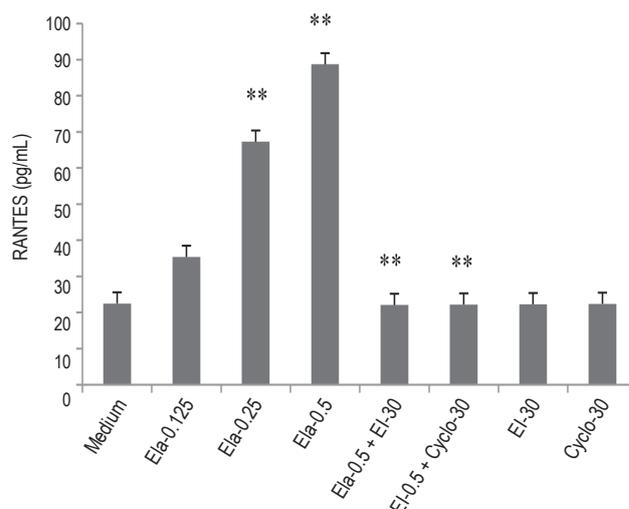


Figure 12. Effects of elastase on RANTES release from human eosinophils

Note. Elastase at concentrations of 0.25 $\mu\text{g/mL}$ and 0.5 $\mu\text{g/mL}$ induced more significant RANTES secretion from eosinophils, when compared to medium, leupeptin, benzamide and cycloheximide controls. Elastase inhibitor, EI and PAR2 inhibitor, cycloheximide at concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$ can substantially reduce elastase-induced RANTES release, when they are mixed with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ of elastase.

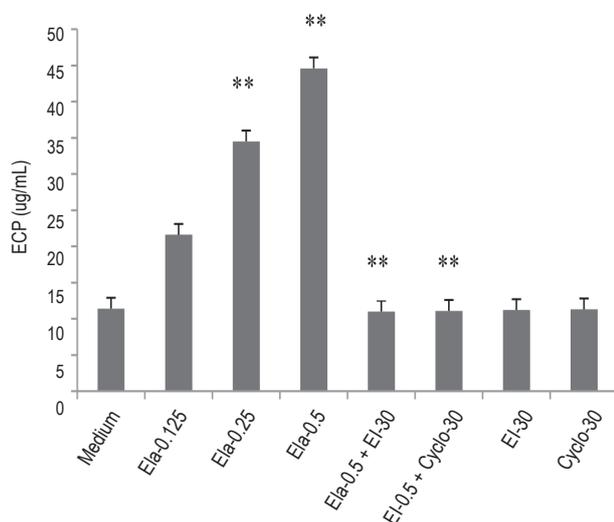


Figure 13. Effects of elastase on ECP release from human eosinophils

Note. Elastase at concentrations of 0.25 $\mu\text{g/mL}$ and 0.5 $\mu\text{g/mL}$ induced more significant ECP secretion from eosinophils, when compared to medium, leupeptin, benzamide and cycloheximide controls. Elastase inhibitor, EI and PAR2 inhibitor, cycloheximide at concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$ can substantially reduce elastase-induced ECP release, when they are mixed with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ of elastase.

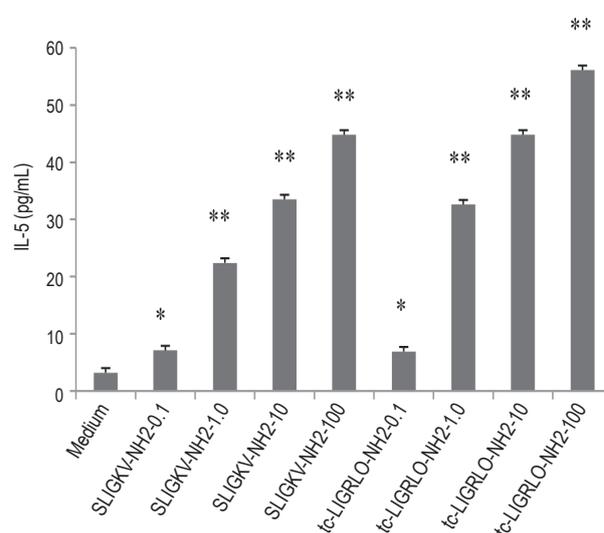


Figure 14. Effects of PAR2 agonist peptides on IL-5 release from human eosinophils

Note. The PAR2 agonist peptides SLIGKV-NH₂ and tc-LIGRLO-NH₂ at concentration of 0.1 $\mu\text{g/mL}$ induced much more IL-5 secretion and at concentrations of 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$ induced more significant IL-5 release from eosinophils, when compared to medium control.

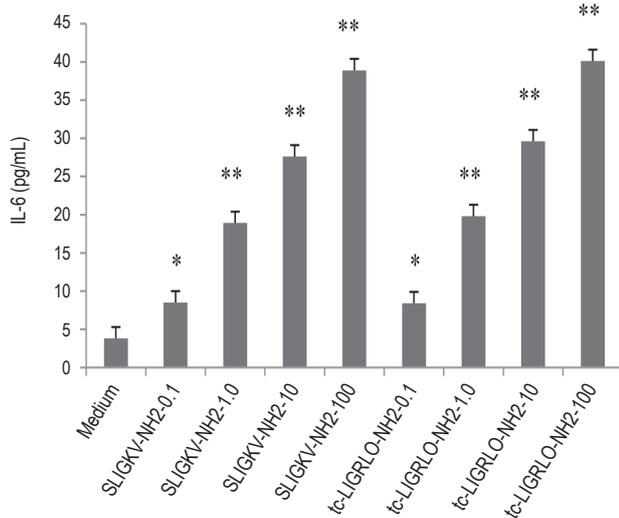


Figure 15. Effects of PAR2 agonist peptides on IL-6 release from human eosinophils

Note. The PAR2 agonist peptides SLIGKV-NH₂ and tc-LIGRLO-NH₂ at concentration of 0.1 µg/mL induced much more IL-6 secretion and at concentrations of 1.0 µg/mL, 10 µg/mL and 100 µg/mL induced more significant IL-6 release from eosinophils, when compared to medium control.

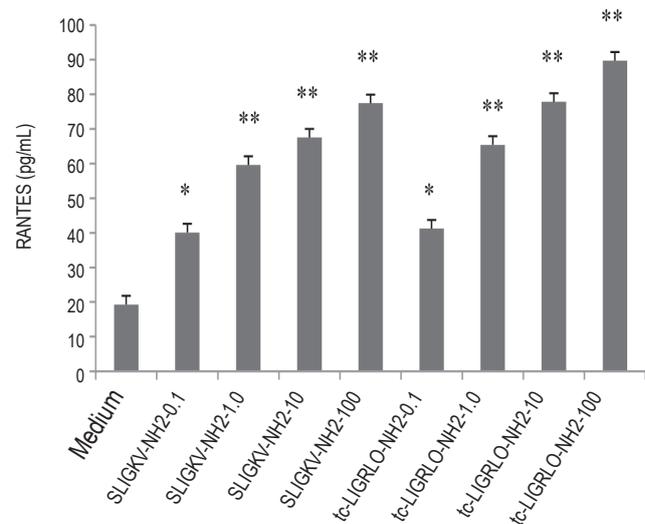


Figure 16. Effects of PAR2 agonist peptides on RANTES release from human eosinophils

Note. The PAR2 agonist peptides SLIGKV-NH₂ and tc-LIGRLO-NH₂ at concentration of 0.1 µg/mL induced much more RANTES secretion and at concentrations of 1.0 µg/mL, 10 µg/mL and 100 µg/mL induced more significant RANTES release from eosinophils, when compared to medium control.

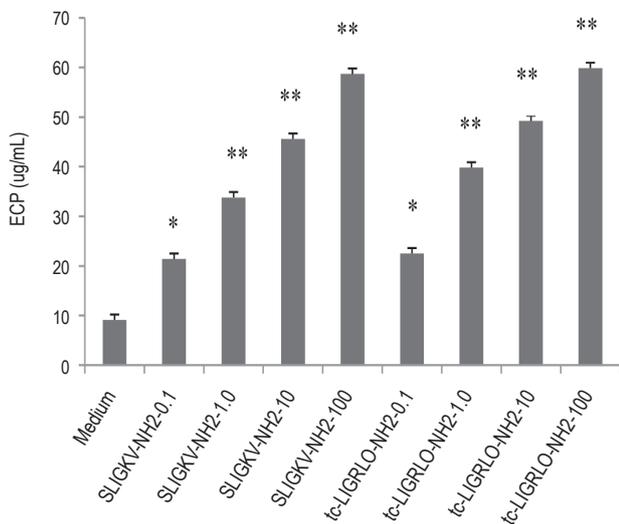


Figure 17. Effects of PAR2 agonist peptides on ECP release from human eosinophils

Note. The PAR2 agonist peptides SLIGKV-NH₂ and tc-LIGRLO-NH₂ at concentration of 0.1 µg/mL induced much more ECP secretion and at concentrations of 1.0 µg/mL, 10 µg/mL and 100 µg/mL induced more significant ECP release from eosinophils, when compared to medium control.

Discussion

It was demonstrated for the first time that serine proteinases could induce the release of IL-5, IL-6, RANTES and ECP from human eosinophils. Trypsin could induce significant amount of IL-5, IL-6 and ECP secretion at concentrations of 0.25 µg/mL and 0.5 µg/mL. Trypsin at concentrations of 0.1 µg/mL and 1.0 µg/mL and elastase at concentrations of 0.25 µg/mL and 0.5 µg/mL could induce a large amount of IL-5, IL-6, RANTES and ECP release and it is implicated that these serine proteinases are effective activators of human eosinophils.

Since PAR2 is a receptor for trypsin, tryptase and elastase, the effects of trypsin, tryptase and elastase on the release of IL-5, IL-6, RANTES and ECP are most likely through the activation of PAR2. It has been reported that the mast cell tryptase may have crucial roles in inducing lung fibroblast migration via PAR2 activation, which may contribute to remodeling processes in chronic lung diseases [2]. Similar report also indicates that tryptase in neutrophil migration, and lung inflammation is dependent on PAR2 activation [9]. Furthermore, tryptase can induce eosinophil recruitment in vivo through the activation

of PAR2 [23]. All these findings indicate that there is an interaction between tryptase and PAR2 and are consistent with the present results. The tryptase inhibitors, leupeptin and benzamide and PAR2 inhibitor, cycloximide can diminish tryptase-induced IL-5, IL-6 and ECP secretion, indicating that the action of tryptase on eosinophils is dependent upon its intact catalytic site. In the present experiment, tryptase fails to induce the release of RANTES (data not shown) and lack of role of tryptase in induction of RANTES secretion suggests that PAR2 activation may very improbably have any functional roles in the process of RANTES release. Furthermore, there are evidence that tryptase does not induce the secretion of RANTES [7, 30]. These results support the current study.

It has been reported that trypsin and PAR2 play an important role in the aggressiveness of ovarian cancer [18]. Another study also shows that trypsin and PAR2 signaling can cause pancreatic cancer pain [37]. Furthermore, trypsin can induce inflammatory mediator release from human eosinophils via the activation of PAR2 [24]. All these findings also suggest that there is an interaction between trypsin and PAR2 and are consistent with the present results. Similarly, trypsin and PAR2 inhibitors significantly diminish trypsin-induced IL-5, IL-6, RANTES and ECP secretion, indicating that the action of trypsin on eosinophils is also dependent upon its intact catalytic site.

It is easy to imagine that elastase can cause the release of IL-5, IL-6, RANTES and ECP, since PAR2 is highly expressed after allergen stimulation in eosinophilic response and elastase inhibitor can reduce this response [20]. This study indicates the

relationship between elastase and PAR2 and supports current finding.

To better understand the actions of tryptase, trypsin and elastase on human eosinophils, it is crucial to confirm the expression of PARs on eosinophils. Human eosinophils express PAR2, not PAR1, PAR3 or PAR4 protein. This result indicates that tryptase, trypsin and elastase are likely to induce the release of IL-5, IL-6, RANTES and ECP by activating PAR2. PAR2 agonist peptides SLIGKV-NH₂ and tc-LIGRLO-NH₂ can induce the secretion of IL-5, IL-6, RANTES and ECP from human eosinophils and it is once again demonstrated that tryptase, trypsin and elastase are likely interacted with PAR2.

In conclusion, human eosinophils express PAR2 protein and tryptase, trypsin and elastase are able to induce IL-5, IL-6, RANTES and ECP release from human eosinophils. The actions of tryptase, trypsin and elastase on eosinophil activation are most likely through activation of PAR2. The finding that mast cell tryptase can activate eosinophils demonstrates once again the interactions between mast cells and eosinophils in inflammation in man.

Conclusions

Tryptase, trypsin and elastase-induced cytokine and ECP release from human blood eosinophils most likely occurs via the activation of PAR2.

Acknowledgments

We thank Xinyu Hu for performing the experiment.

References

1. Avet C., Sturino C., Grastilleur S., Gouill C.L., Semache M., Gross F., Gendron L., Bennani Y., Mancini J.A., Sayegh C.E., Bouvier M. The PAR2 inhibitor I-287 selectively targets G α_q and G $\alpha_{12/13}$ signaling and has anti-inflammatory effects. *Commun. Biol.*, 2020, Vol. 3, no. 1, 719. doi: 10.1038/s42003-020-01453-8.
2. Bagher M., Larsson-Callerfelt A.K., Rosmark O., Hallgren O., Bjermer L., Westergren-Thorsson G. Mast cells and mast cell tryptase enhance migration of human lung fibroblasts through protease-activated receptor 2. *Cell Commun. Signal.*, 2018, Vol. 16, no. 1, 59. doi: 10.1186/s12964-018-0269-3.
3. Bang E., Kim D.H., Chung H.Y. Protease-activated receptor 2 induces ROS-mediated inflammation through Akt-mediated NF- κ B and FoxO6 modulation during skin photoaging. *Redox Biol.*, 2021, Vol. 44, 102022. doi: 10.1016/j.redox.2021.102022.

4. Belibasakis G.N., Bostanci N., Reddi D. Regulation of protease-activated receptor-2 expression in gingival fibroblasts and Jurkat T cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Biol. Int.*, 2010, Vol. 34, no. 3, pp. 287-292.
5. Bolton S.J., McNulty C.A., Thomas R.J., Hewitt C.R., Wardlaw A.J. Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, Vol. 74, no. 1, pp. 60-68.
6. Brass L.F., Molino M. Protease-activated G protein-coupled receptors on human platelets and endothelial cells. *Thromb. Haemost.*, 1997, Vol. 78, no. 1, pp. 234-241.
7. Chhabra J., Li Y.Z., Alkhoury H., Blake A.E., Ge Q., Armour C.L., Hughes J.M. Histamine and tryptase modulate asthmatic smooth muscle GM-CSF and RANTES release. *Eur. Respir. J.*, 2007, Vol. 29, no. 5, pp. 861-870.
8. Choi J., Moon M.Y., Han G.Y., Chang M.S., Yang D., Cha J. Phellodendron amurense extract protects human keratinocytes from PM2.5-induced inflammation via PAR-2 Signaling. *Biomolecules*, 2020, Vol. 11, no. 1, 23. doi: 10.3390/biom11010023.
9. de Almeida A.D., Silva I.S., Fernandes-Braga W., Imafilho A.C.M., Florentino R.O.M., Barra A., de Oliveira Andrade L., Leite M.F., Cassali G.D., Klein A. A role for mast cells and mast cell tryptase in driving neutrophil recruitment in LPS-induced lung inflammation via protease-activated receptor 2 in mice. *Inflamm. Res.*, 2020, Vol. 69, no. 10, pp. 1059-1070.
10. Dinh Q.T., Cryer A., Trevisani M., Dinh S., Wu S., Cifuentes L.B., Feleszko W.K., Williams A., Geppetti P., Fan Chung K., Heppert W., Klapp B.F., Fischer A. Gene and protein expression of protease-activated receptor 2 in structural and inflammatory cells in the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy*, 2006, Vol. 36, no. 8, pp. 1039-1048.
11. Hansel T.T., de Vries I.J., Iff T., Rihs S., Wandzilak M., Betz S., Blaser K., Walker C. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J. Immunol. Methods*, 1991, Vol. 145, no. 1-2, pp. 105-110.
12. He S., Zhang Z., Zhang H., Wei J., Yang L., Yang H., Sun W., Zeng X., Yang P. Analysis of properties and proinflammatory functions of cockroach allergens Per a 1.01s. *Scand. J. Immunol.*, 2011, Vol. 74, no. 3, pp. 288-295.
13. Hurley A., Smith M., Karpova T., Hasley R.B., Belkina N., Shaw S., Balenga N., Druey K.M., Nickel E., Packard B., Imamichi H., Hu Z., Follmann D., McNally J., Higgins J., Sneller M., Lane H.C., Catalfamo M. Enhanced effector function of CD8(+) T cells from healthy controls and HIV-infected patients occurs through thrombin activation of protease-activated receptor 1. *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 207, no. 4, pp. 638-650.
14. Ishihara H., Connolly A.J., Zeng D., Kahn M.L., Zheng Y.W., Timmons C., Tram T., Coughlin S.R. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*, 1997, Vol. 386, no. 6624, pp. 502-506.
15. Kahn M.L., Zheng Y.W., Huang W., Bigornia V., Zeng D., Moff S., Farese R.V., Jr, Tam C., Coughlin S.R. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, 1998, Vol. 394, no. 6694, pp. 690-694.
16. Kalashnyk O., Petrova Y., Lykhmus O., Mikhalovska L., Mikhalovsky S., Zhukova A., Gnatenko D., Bahou W., Komisarenko S., Skok M. Expression, function and cooperating partners of protease-activated receptor type 3 in vascular endothelial cells and B lymphocytes studied with specific monoclonal antibody. *Mol. Immunol.*, 2013, Vol. 54, no. 3-4, pp. 319-326.
17. Kim J.Y., Sohn J.H., Choi J.M., Lee J.H., Hong C.S., Lee J.S., Park J.W. Alveolar macrophages play a key role in cockroach-induced allergic inflammation via TNF- α pathway. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 10, e47971. doi: 10.1371/journal.pone.0047971.
18. Kim K.K., Turner R., Khazan N., Kodza A., Jones A., Singh R.K., Moore R.G. Role of trypsin and protease-activated receptor-2 in ovarian cancer. *PLoS One*, 2020, Vol. 15, no. 5, pp. e0232253. doi: 10.1371/journal.pone.0232253.
19. Kim Y.H., Kang M.K., Lee E.J., Kim D.Y., Oh H., Kim S.I., Oh S.Y., Na W., Shim J.H., Kang I.J., Kang Y.H. Astragalin Inhibits Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Thrombosis and Alveolar Inflammation and Disrupts

PAR Activation and Oxidative Stress-Responsive MAPK-Signaling. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 7, 3692. doi: 10.3390/ijms22073692.

20. Koga H., Miyahara N., Fuchimoto Y., Ikeda G., Waseda K., Ono K., Tanimoto Y., Kataoka M., Gelfand E.W., Tanimoto M., Kanehiro A. Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge: neutrophil elastase inhibition attenuates allergic airway responses. *Respir. Res.* 2013, Vol. 14, no. 1, 8. doi: 10.1186/1465-9921-14-8.

21. Kyselova A., Elgheznawy A., Wittig I., Heidler J., Mann A.W., Ruf W., Fleming I., Randriamboavonjy V. Platelet-derived calpain cleaves the endothelial protease-activated receptor 1 to induce vascular inflammation in diabetes. *Basic Res. Cardiol.*, 2020, Vol. 115, no. 6, 75. doi: 10.1007/s00395-020-00833-9.

22. Luo J., Wu X., Liu H., Cui W., Guo W., Guo K., Guo H., Tao K., Li F., Shi Y., Feng D., Yan H., Gao G., Qu Y. Antagonism of Protease-Activated Receptor 4 Protects Against Traumatic Brain Injury by Suppressing Neuroinflammation via Inhibition of Tab2/NF- κ B Signaling. *Neurosci. Bull.*, 2021, Vol. 37, no. 2, pp. 242-254.

23. Matos N.A., Silva J.F., Matsui T.C., Damasceno K.A., Duarte I.D., Lemos V.S., Cassali G.D., Klein A. Mast cell tryptase induces eosinophil recruitment in the pleural cavity of mice via proteinase-activated receptor 2. *Inflammation.*, 2013, Vol. 36, no. 6, pp. 1260-1267.

24. Miike S., McWilliam A.S., Kita H. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 11, pp. 6615-6622.

25. Nystedt S., Emilsson K., Wahlestedt C., Sundelin J. Molecular cloning of a potential Proteinase activated receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 1994, Vol. 91, no. 20, pp. 9208-9212.

26. Qiao L., Zhang H., Wu S., He S. Downregulation of protease activated receptor expression and cytokine production in P815 cells by RNA interference. *BMC Cell Biol.*, 2009, Vol. 10, 62. doi: 10.1186/1471-2121-10-62.

27. Rasmussen U.B., Vouret-Craviari V., Jallat S., Schlesinger Y., Pagès G., Pavirani A., LecocqJ.P., Pouysségur J., van Obberghen-Schilling E. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett.*, 1991, Vol. 288, no. 1-2, pp. 123-128.

28. Roche N., Stirling R.G., Lim S., Oliver B.G., Oates T., Jazrawi E., Caramori G., Chung K.F. Effect of acute and chronic inflammatory stimuli on expression of protease-activated receptors 1 and 2 in alveolar macrophages. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003, Vol. 111, no. 2, pp. 367-373.

29. Tang Z.Z., Zhang Y.M., Zheng T., Huang T.T., Ma T.F., Liu Y.W. Sarsasapogenin alleviates diabetic nephropathy through suppression of chronic inflammation by down-regulating PAR-1: *In vivo* and *in vitro* study. *Phytomedicine*, 2020, Vol. 78, 153314. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153314.

30. Vliagoftis H., Lacy P., Luy B., Adamko D., Hollenberg M., Befus D., Moqbel R. Mast cell tryptase activates peripheral blood eosinophils to release granule-associated enzymes. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2004, Vol. 135, no. 3, pp. 196-204.

31. Vu T.K., Hung D.T., Wheaton V.I., Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 1991, Vol. 64, no. 6, pp. 1057-1068.

32. Wang H., He S. Induction of lactoferrin and IL-8 release from human neutrophils by tryptic enzymes via proteinase activated receptor-2. *Cell Biol. Int.*, 2006, Vol. 30, no. 9, pp. 688-697.

33. Wang Y.J., Yu S.J., Tsai J.J., Yu C.H., Liao E.C. Antagonism of Protease Activated Receptor-2 by GB88 Reduces Inflammation Triggered by Protease Allergen Tyr-p3. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 557433. doi: 10.3389/fimmu.2021.557433.

34. Wardlaw A.J., Brightling C., Green R., Woltmann G., Pavord I. Eosinophils in asthma and other allergic diseases. *Br. Med. Bull.*, 2000, Vol. 56, no. 4, pp. 985-1003.

35. Xu W.F., Andersen H., Whitmore T.E., Presnell S.R., Yee D.P., Ching A., Gilbert T., Davie E.W., Foster D.C. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 1998, Vol. 95, no. 12, pp. 6642-6646.

36. Zhang H., Yang X., Yang H., Zhang Z., Lin Q., Zheng Y., Chen S., Yang P., He S. Modulation of mast cell proteinase-activated receptor expression and IL-4 release by IL-12. *Immunol. Cell Biol.*, 2007, Vol. 85, no. 7, pp. 558-566.

37. Zhu J., Miao X.R., Tao K.M., Zhu H., Liu Z.Y., Yu D.W., Chen Q.B., Qiu H.B., Lu Z.J. Trypsin-protease activated receptor-2 signaling contributes to pancreatic cancer pain. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 37, pp. 61810-61823.

Авторы:

Цинью Ху – бакалавр наук, директор Клинического лабораторного центра, постоянный сотрудник Второго Народного Госпиталя, Даньянг, Цзянсу, Китай

Хаоян Ванг – к.м.н., директор Исследовательского центра CHUL (CHUQ), постоянный сотрудник кафедры педиатрии, Университет Лаваль, Квебек, Канада

Authors:

Xinyu Hu, BSc, Director of Clinical Lab Center, Permanent, Danyang Second People Hospital, Danyang, Jiangsu, China

Haoyang Wang, PhD (Medicine), Director of Centre de Recherche du CHUL (CHUQ), Permanent, Department of Pediatrics, Laval University, Québec, Canada

Поступила 22.05.2023

Отправлена на доработку 05.06.2023

Принята к печати 19.06.2023

Received 22.05.2023

Revision received 05.06.2023

Accepted 19.06.2023

РОЛЬ SP В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЫ

Микрюкова Н.В.¹, Калинина Н.М.^{1, 2}

¹ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Хроническая крапивница (ХК) представляет собой серьезную проблему в аллергологии. Несмотря на достаточно большое количество исследований, неизвестен точный патогенез заболевания. Клинически ХК проявляется волдырями и/или ангиоотеками и длится более 6 недель. Подразделяется на спонтанную (без очевидных триггеров) и индуцированную, когда триггером являются физические и химические раздражители.

Достаточно сложным является поиск причины. Наиболее часто пациенты называют триггером прием в пищу конкретных продуктов. Второй по значимости причиной ХК, после нарушений в диете, называют стресс. Было показано, что психический или эмоциональный стресс вызывает дегрануляцию тучных клеток (ТК) и выделение гистамина. Самым информативным маркером ХК считается нейромедиатор Substance P (SP), лежащий в основе нейроиммунного воспаления.

Цель исследования – изучение роли SP в патогенезе ХК, оценка взаимосвязи SP с триггерами крапивницы и сопутствующей патологией.

Мы обследовали 97 пациентов с ХК и 68 условно здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту. Исследовалась сыворотка крови, в которой определялся уровень гистамина, субстанции P (SP) методом иммуноферментного анализа. Пациенты были разделены на группы в зависимости от наличия в анамнезе пищевой и лекарственной непереносимости, наличия сопутствующего аутоиммунного тиреоидита (АИТ), влияния стресса как триггера ХК.

При анализе средних уровней гистамина и SP в группе пациентов, страдающих ХК по сравнению с группой контроля достоверных корреляций не выявлено. Отмечалось повышение практически в 3 раза уровня гистамина у пациентов, страдающих АИТ (28,25 нг/мл и 83,61 нг/мл).

Однако при оценке уровня гистамина у пациентов с ХК и имеющих в анамнезе пищевую и лекарственную непереносимость, триггер стресс и АИТ средние значения показателя не были достоверны.

При оценке показателя SP у пациентов, имеющих в анамнезе лекарственную, пищевую непереносимость, АИТ и стресс в качестве триггера ХК мы получили достоверно значимые повышения SP по сравнению с группой контроля при $p < 0,05$.

Адрес для переписки:

Микрюкова Наталья Васильевна
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной
медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России
197345, Россия, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, 54.
Тел.: 8 (812) 702-63-45 (доб. 33-31).
E-mail: natalya@mikryukov.info

Address for correspondence:

Natalia V. Mikryukova
A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation
Medicine, EMERCOM of Russia
54 Optikov St
St. Petersburg
197345 Russian Federation
Phone: +7 (812) 702-63-45 (acc. 33-31).
E-mail: natalya@mikryukov.info

Образец цитирования:

Н.В. Микрюкова, Н.М. Калинина «Роль SP
в патогенезе хронической крапивницы» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 2. С. 141-148.
doi: 10.46235/1028-7221-7127-ROS

© Микрюкова Н.В., Калинина Н.М., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.V. Mikryukova, N.M. Kalinina “Role of substance P
in the pathogenesis of chronic urticaria”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 2, pp. 141-148.
doi: 10.46235/1028-7221-7127-ROS

© Mikryukova N.V., Kalinina N.M., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-7127-ROS

Наши результаты подтверждают, что система нейроиммунного воспаления вовлечена в патогенез активации тучных клеток у пациентов с ХК. Требуются дальнейшие исследования для выделения отдельного фенотипа стресс-индуцированной ХК и определения возможности его психофармакологической коррекции.

Ключевые слова: гистамин, Substance P, хроническая крапивница, стресс, триггер

ROLE OF SUBSTANCE P IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC URTICARIA

Mikryukova N.V.^a, Kalinina N.M.^{a, b}

^a A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia, St. Petersburg, Russian Federation

^b First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Chronic urticaria (CU) is a serious issue in clinical allergology. Exact pathogenesis of diseases is unknown despite a fairly large number of studies. From clinical view, CU manifests as wheals and/or angioedema, lasting for more than 6 weeks. It is classified into spontaneous (without obvious triggers) and induced CU (in cases of evident physical and chemical stimuli). It is quite difficult to reveal its cause. Most often, the patients refer to specific foods as a trigger factor. Stress is the second leading cause of CU after breaking the diet. Mental or emotional stress has been shown to cause degranulation of mast cells (MC) and histamine release. Substance P (SP) is a neurotransmitter, which underlies neuroimmune inflammation, being considered the most informative marker of CU. The purpose of our study was to assess a role of SP in the CU pathogenesis and to determine the relationship of SP with known urticaria triggers and comorbidities.

We examined 97 patients with CU and 68 apparently healthy individuals matched by sex and age. The levels of histamine and substance P (SP) were determined in blood serum by enzyme immunoassay. The patients were classified into groups, depending on the history of food and drug intolerance, presence of concomitant autoimmune thyroiditis (AIT), influence of stress as a trigger for CU.

When analyzing the average levels of histamine and SP in the group of patients suffering from CU, compared with the control group, no significant correlations were found. We detected an almost 3-fold increase of histamine levels in the patients suffering from AIT (28.25 ng/mL versus 83.61 ng/mL). However, when assessing the level of histamine in patients with CU and with a history of food and drug intolerance, trigger stress and AIT, the average values of the indicator did not show significant differences. Meanwhile, when assessing the SP index in patients with a history of drug, food intolerance, AIT and stress as a trigger for CU, we have found a significant increase in SP in the patients when compared with control group ($p < 0.05$).

Our results confirm the neuroimmune inflammation system to be involved in genesis of mast cell activation in CU patients. Further studies are required in order to discern a specific phenotype of stress-induced CU and determine the opportunities for its psychopharmacological correction.

Keywords: histamine, Substance P, chronic urticaria, stress, trigger factor

Введение

Хроническая крапивница — это заболевание, которое проявляется возникновением уртикарных высыпаний, которые сопровождаются сильным зудом, снижающим качество жизни пациента, нарушениями сна и невозможностью вы-

полнять профессиональные обязанности. В мире ХК страдает от 1% до 3% населения, женщины в 2 раза чаще мужчин [25]. Несмотря на достаточно большое количество исследований, точный патогенез заболевания остается неизвестным.

Хроническая крапивница длится более 6 недель и подразделяется на спонтанную, без оче-

видных триггеров, и индуцированную, когда триггером может быть температура, давление, УФО, стресс.

Главными в патогенезе крапивницы являются ТК и базофилы. Медиаторы, основным из которых является гистамин, высвобождаются из активированных ТК и вызывают активацию сенсорных нейронов, привлечение клеток в кожу, расширение и повышение проницаемости посткапиллярных венул и лимфатических сосудов дермы, что приводит к утечке сыворотки в ткани и появлению волдыря, ангиоотека и зуда. Даже в неповрежденной коже пациентов с ХК отмечается активация молекул адгезии, периваскулярная инфильтрация эозинофилами, нейтрофилами и измененная экспрессия цитокинов [26].

ТК экспрессируют множество рецепторов (к хемокинам, простагландинам, иммуноглобулинам, к компонентам комплемента, Toll-подобные рецепторы, рецепторы к нейропептидам и др.) активация которых приводит к дегрануляции ТК. Экспрессия высокоаффинного рецептора для IgE (FcεRI) и низкоаффинного рецептора для IgG (FcγRIIA), и их перекрестное связывание индуцирует высвобождение провоспалительных и иммуномодулирующих медиаторов, определенные типы тучных клеток (например, кожные и синовиальные) экспрессируют MAS рецептор-X2, связанный с G-белком (MRGPRX2) [21].

В ходе ряда исследований было показано, что такие нейротрансмиттеры, как SP, участвуют в дегрануляции ТК и выработке хемокинов [11].

SP представляет собой нейропептид (нейромедиатор) состоящий из 11 аминокислот, который относится к семейству пептидов, известных как тахикинины. SP высвобождается из сенсорных нейронов и относится к неадренергической нехолинергической системе (NANC). После высвобождения он способен активировать некоторые другие воспалительные факторы [12]. В свою очередь, медиаторы тучных клеток гистамин и триптаза могут активировать сенсорные нервы, поддерживая взаимодействие между тучными клетками и сенсорными волокнами при воспалении кожи, вызванном ТК. Согласно современным данным, биологическая активность SP может проявляться не только через Neurokinin-1 receptor (NK-1), но и через MRGPRX2, и вызывать активацию тучных клеток. Было обнаружено, что MRGPRX2 активируется в коже пациентов с тяжелой хронической крапивницей [7]. Отмечено, что постоянные стрессовые ситуации и инфекционные процессы у пациентов, страдающих хронической крапивницей, могут активировать тучные клетки путем высвобождения нескольких

нейропептидов и антимикробных белков защиты хозяина, действующих через MRGPRX2 [3]. Еще в 2004 г. было показано, что высвобождение нейропептидов из сенсорного нерва вызвано повышением концентрации цитозольного Ca²⁺ [8]. Кожные сенсорные нервы экспрессируют MRGPRX2 в дополнение к управляемым напряжением Ca-каналам, активация которых увеличивает концентрацию цитозольного Ca²⁺. MRGPRX2 вовлечены в гистамин-независимые пути зуда. Их активация на тучных клетках вызывает сильный зуд, который впоследствии приводит к разрушению клеток кожи и прогрессированию воспалительного процесса в коже [22].

Многие авторы подтверждают вовлечение SP в патогенез крапивницы, основанный на способности SP вызывать зуд кожи и ангиоотек, вызывать дегрануляцию тучных клеток и базофилов и действовать как сенсibilизатор ТК, усиливая их чувствительность к различным триггерам [10]. В исследовании на пациентах с крапивницей Metz M. (2014) показал, что циркулирующие уровни SP значительно повышены в соответствии с тяжестью заболевания [14], однако в работе Fadaee J. (2020) значение SP не коррелировало с тяжестью крапивницы и ангионевротического отека [6], что получило подтверждение в исследовании Memet B. и соавт. (2021 г.) [13], в котором определена связь уровня SP у пациентов с ХК с тяжестью депрессии, но не с активностью крапивницы. В 2016 году Zheng W. и соавт. выявил увеличение количества циркулирующих SP-положительных базофилов [24]. Определено, что SP вызывает дегрануляцию базофилов, полученных от пациентов с хронической крапивницей. Кроме того, SP может участвовать в псевдоаллергических реакциях и действовать как фактор, высвобождающий гистамин у пациентов с крапивницей. Показано, что базофилы пациентов с хронической крапивницей активирует АКТГ и его рилизинг-фактор [5].

Повышение NLRP-3-воспаления было продемонстрировано при депрессии и стрессе, что доказывает связь между психологическими факторами и обострением крапивницы в результате эмоционального стресса [9]. Продемонстрированы повышение уровня С-реактивного белка, интерлейкина 18 и значительное снижение базального кортизола у пациентов с хронической крапивницей в связи с тяжестью заболевания и стрессом. Таким образом, хронический стресс может способствовать формированию порочного круга в патогенезе крапивницы [20].

Существует лекарственный препарат Апрепитант, который является антагонистом рецептора

NK1 (рецептора SP) и применяется при лечении рвоты, устойчивой к химиотерапии [16]. Он показал свою эффективность в лечении хронического зуда и ХК, устойчивой к терапии [15, 19, 21].

Если корреляция SP и ХК доказана, то его основной рецептор NK1 может стать новым средством лечения кожных заболеваний, связанных с хроническим зудом, в том числе и ХК.

В связи с различными результатами предыдущих исследований мы вернулись к изучению и оценке роли SP у пациентов с хронической крапивницей.

Одной из подгрупп пациентов, страдающих ХК, были спасатели, чья профессия характеризуется высоким уровнем стресса.

Цель исследования – изучение роли SP в патогенезе ХК, оценка взаимосвязи SP с триггерами крапивницы, наследственностью, сопутствующей патологией.

Материалы и методы

Критериями включения пациентов в исследование явилось наличие рецидивирующего течения крапивницы и/или ангиоотеков на протяжении 6 и более недель. Диагноз «хроническая крапивница» установлен с использованием материалов согласительного документа EAACI/GA2LEN/EDF/WAO 2018 г.; T. Zuberbier, W. Aber, R. Asego и соавт., 2018 г. и федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению крапивницы 2018 г. (Данилычева И.В., 2018) [1].

В исследование включено 165 человек, от 18 до 68 лет, 76 женщин, 89 мужчин, из них 97 пациентов, страдающих хронической крапивницей. Группу сравнения составили 68 условно здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой, не имевших клинических проявлений крапивницы и не страдающих сопутствующей аллергопатологией.

В исследование были включены пациенты, находящиеся на амбулаторном лечении в ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никиторова МЧС России в 2018-2023 гг. От испытуемых было получено информированное согласие. Это исследование было одобрено Комитетом по этике ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никиторова МЧС России.

У каждого участника исследования был тщательно собран анамнез заболевания и жизни. Исследовалась сыворотка крови, в которой определялся уровень гистамина, субстанции P (SP).

Определение концентрации гистамина (НА) проведено методом иммуноферментного анализа (ИФА) (CEA927Ge96Tests для гистамина (НА),

Cloud-Clone Corp.) Определение концентрации Субстанции P (SP) проведено методом ИФА (CEA393Hu96Tests для SubstanceP (SP), Cloud-Clone Corp.) Тест-системы Cloud-Clone Corp. (Ухань) сертифицированы для научных исследований.

При исследовании определение концентрации проводили по «сэндвич»-схеме твердофазного ИФА в две стадии с последующей детекцией на основе пероксидазы хрена. Регистрация результатов ИФА проводилась с помощью микропланшетного фотометра при длине волны 450 нм. При определении гистамина чувствительность 0,52 нг/мл, диапазон определения 1,23-100 нг/мл. При определении SP чувствительность 5,42 пг/мл, диапазон определения 12,35-1000 пг/мл.

Статистический анализ. Коэффициент корреляции рассчитывался с помощью программы RStudio (RStudio PBC, США) для операционной системы Windows 10 64 (Microsoft, США), с помощью языка программирования R, который разработан для статистической обработки и анализа данных. Значение $p < 0,05$ указывало на статистически значимую разницу. Количественные данные представлены в виде средних со стандартным (среднеквадратическим) отклонением. Для оценки значимости различий между сравниваемыми группами использовали U-критерий Манна–Уитни. Для проверки равенства дисперсий двух выборок применялся критерий Фишера.

Результаты

В исследование было включено 97 пациентов с хронической крапивницей, мужчин 45 (46,4%), женщин 52 (53,6%); диагноз «крапивница» был установлен в соответствии с федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению крапивницы 2018 г. (Данилычева И.В., 2018). Группу контроля составили 68 здоровых лиц. Группы были сопоставимы по возрасту и полу. Средний возраст пациентов составил $41,10 \pm 12,52$ года (возрастной диапазон – от 18 до 68 лет). В сыворотке крови участников исследования были определены методом ИФА уровни гистамина и SP.

У пациентов страдающих хронической крапивницей прослеживались следующие закономерности уровней гистамина и SP в зависимости от наличия имеющейся в анамнезе пищевой и лекарственной непереносимости, сопутствующего АИТ, влияния стресса как триггера ХК, которые представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ГИСТАМИНА, SP В СЫВОРОТКЕ КРОВИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. HISTAMINE AND SP LEVELS IN BLOOD SERUM, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Indicators	Гистамин, нг/мл Histamin, ng/mL	SP, пг/мл SP, pg/mL
Группа контроля Control group (n = 68)	28,25 (7,58-100,00)	101,89 (48,95-229,16)
Пациенты с ХК Patients with CU (n = 97)	24,75 (6,16-100,00)	133,91 (70,90-273,16)
Пациенты с ХК и пищевой непереносимостью Patients with CU and food intolerance (n = 46)	31,94 (4,57-100,00)	202,87 (91,22-294,56)*
Пациенты с ХК и лекарственной непереносимостью Patients with CU and drug intolerance (n = 43)	18,82 (3,75-91,65)	207,03 (102,22-298,34)*
Пациенты с ХК и АИТ Patients with CU and autoimmune thyroiditis (n = 14)	83,61 (4,70-100,00)	204,68 (111,89-282,86)*
Пациенты со стресс- индуцированной ХК Patients with stress induced CU (n = 35)	26,98 (7,29-100,00)	192,64 (94,13-298,38)*

Примечание. * – $p < 0,05$ достоверно по сравнению с группой контроля по U-критерию Манна–Уитни.

Note. *, $p < 0.05$ significantly compared with the control group according to the Mann–Whitney U test.

При анализе средних уровней гистамина и SP в подгруппе пациентов, страдающих ХК, по сравнению с группой контроля, и гистамина в подгруппах пациентов ХК с пищевой и лекарственной непереносимостью в анамнезе, имеющих сопутствующий АИТ и описывающих стресс триггером ХК достоверных корреляций не выявлено. Однако оценивая показатель SP у пациентов, имеющих в анамнезе лекарственную, пищевую непереносимость, АИТ и стресс в качестве триггера ХК мы получили достоверно значимые повышения SP по сравнению с группой контроля при $p < 0,05$.

Обсуждение

Общеизвестно, что главный медиатор хронической крапивницы — гистамин, который продуцируется, в основном, ТК и базофилами. Нейротрансмиттер SP, посредством дегрануляции ТК и базофилов, может вызвать ХК. Наше исследование было направлено на уточнение роли SP в патогенезе ХК. Средние значения гистамина и SP у пациентов с ХК достоверно не отличались от показателей контрольной группы.

У пациентов, страдающих ХК и имеющих сопутствующую патологию (АИТ) отмечалось повышение практически в 3 раза уровня гистамина (28,25 нг/мл и 83,61 нг/мл). Средние значения ги-

стамина у пациентов с ХК и имеющих в анамнезе пищевую и лекарственную непереносимость, триггер стресс и АИТ достоверно не отличались от контрольной группы.

В группах с АИТ у пациентов с ХК, с лекарственной и пищевой непереносимостью показатели SP были достоверно выше, чем в контрольной группе.

Средние уровни SP в сыворотке крови пациентов с ХК не превышали показатели контрольной группы. Следует отметить, аналогичные результаты получены в исследованиях Memet и соавт. [13] и Tedeschi и соавт. [18]. Противоположные данные получены Fadaee и соавт. [6], Zheng и соавт. [24], Metz и соавт. [14] и Basak и соавт. [4] которые отметили повышение уровня SP у пациентов с ХК. В частности, в исследовании Javad Fadaee в 2020 г. [6] было показано, что уровень SP у пациентов с ХК был в два раза выше, чем у здоровых. Basak и соавт., изучая несколько нейропептидов в своем исследовании 2014 года, выявили значимое (также в два раза) повышение вещества P у пациентов с ХК [4]. Metz и соавт. в том же году показали значительное (в четыре раза) увеличение уровня SP у пациентов с ХК по сравнению со здоровыми [14]. В своем исследовании Zheng и соавт. в 2016 г. подтвердили повышение циркулирующего SP (в 3 раза) у пациентов с ХК [24].

Оценивая влияние стресса на средние значения SP мы выявили значимое повышение показателя у пациентов, описывающих стресс как триггер обострения ХК (p -value = 0,0271).

Связь SP с депрессией

Некоторые предыдущие исследования изучали взаимосвязь SP и депрессии у пациентов с ХК. В исследовании Memet В. (2021) уровни SP не коррелировали с показателями активности крапивницы, но были связаны с тяжестью депрессии [13], что подтвердило исследование Schut и соавт., в котором также была доказана связь уров-

ня SP в сыворотке не с тяжестью крапивницы, а с уровнем депрессии, и авторы предположили возможную причинно-следственную связь между ХК и психическим дистрессом и призвали к дальнейшим исследованиям, чтобы подтвердить, является ли повышенный уровень стресса у ХК причиной или результатом их высокого уровня заболеваемости [17].

Ограничения исследования

Мы не изучали уровень стресса, приняв во внимание исследование Baldwin AL, что стресс может модулировать активацию тучных клеток и усугублять течение крапивницы [2].

И мы не ориентировались на степень тяжести ХК, т. к. предыдущие исследователи не выявили корреляции между уровнем SP в сыворотке крови и степенью активности ХК [6].

Предметом дальнейших исследований может явиться изучение роли стресса в обострении ХК и связи с SP, что потребует других терапевтических подходов в лечении стресс-индуцированной крапивницы с помощью психотерапии, антидепрессантов, и, возможно, антагониста рецептора NK1.

Заключение

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что уровень продукции SP коррелировал с наличием сопутствующих состояний и заболеваний у пациентов с ХК. Настоящая работа подтвердила взаимосвязь хронической крапивницы со стрессом. И важным выводом из нашего исследования является необходимость оценки уровня стресса и психического здоровья пациентов с ХК, и возможное психофармакологическое воздействие на сопутствующие состояния и определение потенциальной пользы вмешательств, направленных на уменьшение симптомов крапивницы.

Список литературы / References

1. Данилычева И.В., Ильина Н.И., Лусс Л.В., Феденко Е.С., Шульженко А.Е. Федеральные клинические рекомендации. Крапивница // Российский фллергологический журнал, 2018. Т. 15, № 5. С. 47-62. [Danilicheva I.V., Ilina N.I., Luss L.V., Fedenko E.S., Shulzhenko A.E. Federal Clinical Recommendations. Urticaria. Updated, 2018. *Rossiyskiy Allergologicheskij Zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2018, Vol. 15, no. 5, pp. 47-62. (In Russ.)]
2. Baldwin A.L. Mast cell activation by stress. *Methods Mol. Biol.*, 2006, Vol. 315, pp. 349-360.
3. Bansal C.J., Bansal A.S. Stress, pseudoallergens, autoimmunity, infection and inflammation in chronic spontaneous urticaria. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2019 Vol. 15, 56. doi: 10.1186/s13223-019-0372-z.
4. Basak P.Y., Erturan I., Yuksel O., Kazanoglu O.O., Vural H. Evaluation of serum neuropeptide levels in patients with chronic urticaria. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 2014, Vol. 80, no. 5, 483. doi: 10.4103/0378-6323.140345.

5. Dyke S.M., Carey B.S., Kaminski E.R. Effect of stress on basophil function in chronic idiopathic urticaria. *Clin. Exp. Allergy*, 2008, Vol. 38, no. 1, pp. 86-92.
6. Fadaee J., Khoshkhui M., Emadzadeh M., Hashemy S.I., Farid Hosseini R., Jabbari Azad F., Ahanchian H., Lavi Arab F. Evaluation of serum substance P level in chronic urticaria and correlation with disease severity. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 2020, Vol. 19, no. 1, pp. 18-26.
7. Fujisawa D., Kashiwakura J., Kita H., Kikukawa Y., Fujitani Y., Sasaki-Sakamoto T., Kuroda K., Nunomura S., Hayama K., Terui T., Ra C., Okayama Y. Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticaria. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 3, pp. 622-633.
8. Jans R., Sartor M., Jadot M., Poumay Y. Calcium entry into keratinocytes induces exocytosis of lysosomes. *Arch. Dermatol. Res.*, 2004, Vol. 296, no. 1, pp. 30-41.
9. Kaufmann F.N., Costa A.P., Ghisleni G., Diaz A.P., Rodrigues A.L.S., Peluffo H., Kaster M.P. NLRP3 inflammasome-driven pathways in depression: Clinical and preclinical findings. *Brain Behav. Immun.*, 2017, Vol. 64, pp. 367-383.
10. Kocatürk E., Maurer M., Metz M., Grattan C. Looking forward to new targeted treatments for chronic spontaneous urticaria. *Clin. Transl. Allergy*, 2017, Vol. 7, 1. doi: 10.1186/s13601-016-0139-2.
11. Kulka M., Sheen C.H., Tancowny B.P., Grammer L.C., Schleimer R.P. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology*, 2008, Vol. 123, no. 3, pp. 398-410.
12. Lisowska B., Lisowski A., Siewruk K. Substance P and chronic pain in patients with chronic inflammation of connective tissue. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 10, e0139206. doi: 0.1371/journal.pone.0139206.
13. Memet B., Vurgun E., Barlas F., Metz M., Maurer M., Kocatürk E. In chronic spontaneous urticaria, comorbid depression linked to higher disease activity, and substance P levels. *Front. Psychiatry*, 2021, Vol. 12, 667978. doi: 10.3389/fpsy.2021.667978.
14. Metz M., Krull C., Hawro T., Saluja R., Groffik A., Stanger C., Staubach P., Maurer M. Substance P is upregulated in the serum of patients with chronic spontaneous urticaria. *J. Invest. Dermatol.*, 2014, Vol. 134, no. 11, pp. 2833-2836.
15. Ohanyan T., Schoepke N., Eirefelt S., Hoey G., Koopmann W., Hawro T., Maurer M., Metz M. Role of substance P and its receptor neurokinin 1 in chronic prurigo: a randomized, proof-of-concept, controlled trial with topical aprepitant. *Acta Derm. Venereol.*, 2018, Vol. 98, no. 1, pp. 26-31.
16. Sanger G.J., Andrews P.L.R. A history of drug discovery for treatment of nausea and vomiting and the implications for future research. *Front. Pharmacol.*, 2018, Vol. 9, 913. doi: 10.3389/fphar.2018.00913.
17. Schut C., Magerl M., Hawro T., Kupfer J., Rose M., Gieler U., Maurer M., Peters E.M.J. Disease activity and stress are linked in a subpopulation of chronic spontaneous urticaria patients. *Allergy*, 2020, Vol. 75, no. 1, pp. 224-226.
18. Tedeschi A., Lorini M., Asero R. No evidence of increased serum substance P levels in chronic urticaria patients with and without demonstrable circulating vasoactive factors. *Clin. Exp. Dermatol.*, 2005, Vol. 30, no. 2, pp. 171-175.
19. Tey H.L., Yosipovitch G. Targeted treatment of pruritus: a look into the future. *Br. J. Dermatol.*, 2011, Vol. 165, no. 1, pp. 5-17.
20. Varghese R., Hui-Chan C.W., Bhatt T. Reduced cognitive-motor interference on voluntary balance control in older tai chi practitioners. *J. Geriatr. Phys. Ther.*, 2016, Vol. 39, no. 4, pp. 190-199.
21. Varricchi G., Rossi F.W., Galdiero M.R., Granata F., Criscuolo G., Spadaro G., de Paulis A., Marone G. Physiological roles of mast cells: collegium internationale allergologicum update 2019. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2019, Vol. 179, no. 4, pp. 247-261.
22. Vietri J., Turner S.J., Tian H., Isherwood G., Balp M.M., Gabriel S. Effect of chronic urticaria on US patients: analysis of the National Health and Wellness Survey. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2015, Vol. 115, no. 4, pp. 306-311.
23. Yosipovitch G., Bernhard J.D. Clinical practice. Chronic pruritus. *N. Engl. J. Med.*, 2013, Vol. 368, no. 17, pp. 1625-1634.
24. Zheng W., Wang J., Zhu W., Xu C., He S. Upregulated expression of substance P in basophils of the patients with chronic spontaneous urticaria: induction of histamine release and basophil accumulation by substance P. *Cell Biol. Toxicol.*, 2016, Vol. 32, no. 3, pp. 217-228.

25. Zuberbier T., Aberer W., Asero R., Abdul Latiff A.H., Baker D., Ballmer-Weber B., Bernstein J.A., Bindslev-Jensen C., Brzoza Z., Buense Bedrikow R., Canonica G.W., Church M.K., Craig T., Danilycheva I.V., Dressler C., Ensina L.F., Giménez-Arnau A., Godse K., Gonçalo M., Grattan C., Hebert J., Hide M., Kaplan A., Kapp A., Katelaris C.H., Kocatürk E., Kulthanan K., Larenas-Linnemann D., Leslie T.A., Magerl M., Mathelier-Fusade P., Meshkova R.Y., Metz M., Nast A., Nettis E., Oude-Elberink H., Rosumeck S., Saini S.S., Sánchez-Borges M., Schmid-Grendelmeier P., Staubach P., Sussman G., Toubi E., Vena G.A., Vestergaard C., Wedi B., Werner R.N., Zhao Z., Maurer M.; Endorsed by the following societies: AAAAI, AAD, AAAITO, ACAAI, AEDV, APAAACI, ASBAI, ASCIA, BAD, BSACI, CDA, CMICA, CSACI, DDG, DDS, DGAKI, DSA, DST, EAACI, EIAS, EDF, EMBRN, ESCD, GA²LEN, IAACI, IADVL, JDA, NVvA, MSAI, ÖGDV, PSA, RAACI, SBD, SFD, SGAI, SGDV, SIAAIC, SIDeMaST, SPDV, TSD, UNBB, UNEV and WAO. The EAACI/GA²LEN/EDF/WAO guideline for the definition, classification, diagnosis and management of urticaria. *Allergy*, 2018, Vol. 73, no. 7, pp. 1393-1414.

26. Zuberbier T., Schadendorf D., Haas N., Hartmann K., Henz B.M. Enhanced P-selectin expression in chronic and dermographitic urticaria. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1997, Vol. 114, no. 1, pp. 86-89.

Авторы:

Микрюкова Н.В. – заведующая отделением профилактики и экспертизы профессиональной пригодности поликлиники ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Калинина Н.М. – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России; профессор ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Mikryukova N.V., Head, Department of Prevention and Expertise of Professional Suitability of the Polyclinic, A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia, St. Petersburg, Russian Federation

Kalinina N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Laboratory Diagnostics A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia; Professor, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 02.04.2023
Отправлена на доработку 01.05.2023
Принята к печати 27.05.2023

Received 02.04.2023
Revision received 01.05.2023
Accepted 27.05.2023

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

Серебрякова М.К.¹, Ильвес А.Г.², Лебедев В.М.², Новоселова О.М.²,
Прахова Л.Н.², Кудрявцев И.В.^{1,3,4}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУН «Институт мозга человека имени Н.П. Бехтеревой» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. С применением многоцветной проточной цитометрии проведен анализ основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов (Тцит), выявленных на основании экспрессии CD45RA и CD62L, в парных образцах периферической крови и спинно-мозговой жидкости (СМЖ) больных рассеянным склерозом в период обострения (n = 32) и период ремиссии (n = 20), а также в периферической крови условно здоровых доноров (n = 51). При обострении РС наблюдается снижение относительного содержания CD3⁺CD4⁺ и соотношение CD4/CD8-лимфоцитов в ликворе. При периферической крови, полученной от больных РС в период обострения, были выявлены обратные зависимости между баллами шкалы EDSS и абсолютным (r = -0,430 при p = 0,014) и относительным (r = -0,502 при p = 0,003) содержанием CD45RA⁺CD62L⁺Тцит. При ремиссии РС относительное содержание CD45RA⁺CD62L⁺Тцит снижалось до 8,70% (6,51-11,63), что было достоверно (p = 0,005) ниже значений контрольной группы – 12,18% (10,38-15,24), хотя и не отличалось (p = 0,114) от больных в период обострения – 11,31% (8,28-13,90). Анализ образцов ликвора выявил, что при рецидиве РС имеет место увеличение (p = 0,027) уровня EM Тцит до 8,16% (6,40-11,40), тогда как в период ремиссии лимфоциты данной популяции составляли 6,49% (4,51-8,39) от общего числа CD3⁺ клеток СМЖ. При обострении РС, как правило, наблюдается положительная взаимосвязь между относительным содержанием отдельных субпопуляций Тцит в СМЖ и процентным содержанием, а также концентрацией аналогичных популяций Т-лимфоцитов в периферической крови. Обратная зависимость между уровнем EM Тцит, циркулирующими в СМЖ, и «наивными» клетками периферической крови мо-

Адрес для переписки:

Серебрякова Мария Константиновна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Павлова, 12.
Тел./факс: 8 (812) 234-68-68.
E-mail: m-serebryakova@yandex.ru

Address for correspondence:

Mariia K. Serebriakova
Institute of Experimental Medicine
12 Acad. Pavlov St
St. Petersburg
197022 Russian Federation
Phone/fax: +7 (812) 234-68-68.
E-mail: m-serebryakova@yandex.ru

Образец цитирования:

М.К. Серебрякова, А.Г. Ильвес, В.М. Лебедев,
О.М. Новоселова, Л.Н. Прахова, И.В. Кудрявцев
«Субпопуляционный состав цитотоксических
Т-лимфоцитов периферической крови и спинномозговой
жидкости при рассеянном склерозе» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 2. С. 149-160.
doi: 10.46235/1028-7221-1533-СТС

© Серебрякова М.К. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.K. Serebriakova, A.G. Ilves, V.M. Lebedev,
O.M. Novoselova, L.N. Prakhova, I.V. Kudryavtsev
“Cytotoxic T cell subsets in peripheral blood and cerebrospinal
fluid from patients with multiple sclerosis”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 2, pp. 149-160.
doi: 10.46235/1028-7221-1533-СТС

© Serebriakova M.K. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-1533-СТС

жет объясняться тесной связью между этими двумя популяциями Тцит и клиническими проявлениями РС (в баллах по шкале EDSS). В период ремиссии большая часть этих зависимостей нарушается. Дальнейшие исследования динамики изменения цитотоксических Т-клеток в периферической крови и спинно-мозговой жидкости помогут приблизиться к пониманию патогенеза РС, а также позволят обнаружить новые маркеры прогноза развития и течения данного заболевания.

Ключевые слова: проточная цитометрия, рассеянный склероз, цитотоксические Т-лимфоциты, CD45RA, CD62L, спинно-мозговая жидкость, периферическая кровь

CYTOTOXIC T CELL SUBSETS IN PERIPHERAL BLOOD AND CEREBROSPINAL FLUID FROM PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Serebriakova M.K.^a, Ilves A.G.^b, Lebedev V.M.^b, Novoselova O.M.^b, Prakhova L.N.^b, Kudryavtsev I.V.^{a, c, d}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b N. Bechtereva Institute of Human Brain, St. Petersburg, Russian Federation

^c Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

^d First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Using multicolor flow cytometry, the main cytotoxic T lymphocytes (Tcyt) subsets were identified, based on the expression of CD45RA and CD62L in paired samples of peripheral blood and cerebrospinal fluid from the patients during the relapse (n = 32) and remission (n = 20) of multiple sclerosis (MS), as well as in the peripheral blood samples of healthy volunteers (n = 51). During the relapse of MS, we have observed a decreased relative number of CD3⁺CD4⁺ cells and CD4/CD8 ratio in cerebrospinal liquor. In peripheral blood taken from the relapsed MS patients, we have found significant correlations between EDSS score and absolute counts (r = -0,430, p = 0.014), and with relative numbers of CD45RA⁺CD62L⁺Tcyt (r = -0,502, p = 0.003). In remission state of MS, the relative numbers of blood CD45RA⁻CD62L⁻Tcyt cells exhibited a significant decrease (p = 0.005) to 8.70% (6.51-11.63) against control group with 12.18% (10.38-15.24), although it did not significantly differ (p = 0.114) from the relapsed patients with 11.31% (8.28-13.90). Studies of liquor samples have shown that, during MS relapse, the percentage of CD45RA⁻CD62L⁻Tcyt was increased (p = 0.027) up to 8.16% (6.40-11.40), while in remission state these cells comprised only 6.49% (4.51-8.39) from the total CD3⁺ cell number. During relapse of MS, some positive correlations were revealed between the relative number of “naïve”, CM, EM and TEMRA Tcyt from liquor, and the percentages, as well as contents of similar T cell subsets in peripheral blood samples. The inverse relationship between the level of EM Tcyt from liquor and peripheral blood “naïve” cells showed the close relationship between these two Tcyt subsets and clinical manifestations of MS (i.e., scores of EDSS scale). During the remission period, most of these correlations are disrupted. Further investigations of cytotoxic T cells dynamics in peripheral blood and cerebrospinal fluid will help to approach the understanding of MS pathogenesis by revealing novel markers for the clinical prognosis in this disorder.

Keywords: multiple sclerosis, flow cytometry, cytotoxic T cells, CD45RA, CD62L, cerebrospinal fluid, peripheral blood

Работа выполнена в рамках плановой темы НИР ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» FGWG-2022-0005 (рег. № 122020300186-5).

Введение

Рассеянный склероз – нейродегенеративное заболевание, при котором в организме пациента обнаруживаются аутореактивные Т-хелперы,

которые способны мигрировать в нервную ткань через гемато-энцефалический барьер. На сегодняшний день рассматривается также вопрос об участии цитотоксических Т-лимфоцитов (Тцит) в развитии данного заболевания. Многочисленные исследования функциональных особенностей Тцит показали, что эти клетки, подобно Т-хелперам 17, способны продуцировать широ-

кий спектр провоспалительных цитокинов, влияющих на проницаемость гемато-энцефалического барьера, что делает его проницаемым для иммунных клеток, циркулирующих в периферической крови [28]. С использованием молекулярно-биологических методов было показано, что у больных РС в периферической крови, спинно-мозговой жидкости (СМЖ) и в участках поражения нервной ткани обнаруживались CD3⁺CD8⁺ лимфоциты всего лишь нескольких клонов, выявленных на основании анализа последовательности CDR3 участка Т-клеточного рецептора (TcR) [26]. Более того, такая узко специфическая олигоклональность клеток была характерна только для цитотоксических Т-лимфоцитов, тогда как популяция Т-хелперов во всех исследованных тканях была весьма гетерогенна с точки зрения строения TcR. Эти результаты подтверждают тем, что большинство клонов CD3⁺CD8⁺ клеток, обнаруживаемых в составе очагов поражения нервной системы, обычно представлены на значительном уровне и в периферической крови больных [22].

Другим важнейшим фактором, свидетельствующим о существенной роли цитотоксических Т-лимфоцитов в патогенезе РС, являются результаты генетических исследований, указывающих на значимость некоторых аллельных форм молекул главного комплекса гистосовместимости I класса, распознавание которых связано с функциональной активностью именно CD3⁺CD8⁺ клеток. Показано, что вероятность развития РС резко возрастала при наличии у пациентов аллели HLA-A*0301, тогда как присутствие в геноме аллели HLA-A*0201 существенно снижало риски развития данной патологии [11]. Анализ гистохимического строения зон поражения нервной ткани выявил, что в составе периваскулярных лимфатических скоплений, встречающихся по периферии активных демиелинизирующих бляшек, относительное содержание CD8⁺Т-лимфоцитов в пятьдесят и более раз превосходит содержание Т-хелперов [12]. Хотя в настоящее время чаще указывается, что соотношение CD8/CD4 в рамках очагов оставляет в среднем 10:1 [18]. В зонах воспаления с демиелинированными нервными волокнами отмечается накопление зрелых эффекторных CD8⁺Т-клеток, несущих в своей цитоплазме гранулы с гранзимом В, способным вызывать апоптоз в клетках-мишенях [18]. Накопление CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов в составе очагов поражения нервной ткани тесно связано с уровнем демиелинизации поврежденных аксонов [7].

Направленная миграция в нервную ткань обеспечивается наличием на поверхности лимфоцитов набора молекул-адресинов и при этом отсутствием молекул «хоуминга» в лимфоидную ткань. Такое сочетание характерно для прошедших антиген-зависимую дифференцировку зрелых Т-клеток с эффекторным потенциалом. Цитотоксические Т-лимфоциты, обладающие комплексом описанных свойств, способны синтезировать эффекторные цитокины и разрушать клетки-мишени за счет секреции перфоринов и гранзимов, что позволяет рассматривать их в качестве ключевых игроков в патогенезе РС и других заболеваний. В связи с вышеизложенным **целью данного исследования** стал анализ субпопуляционного состава и поиск взаимосвязей между разными субпопуляциями Тцит в периферической крови и СМЖ пациентов с РС на стадии обострения и в ремиссии.

Материалы и методы

Исследования проводили на образцах венозной крови и спинно-мозговой жидкости 52 пациентов с рецидивирующе-ремиттирующей формой рассеянного склероза, диагностированного на основании критериев МакДональда [2]. Для сравнения использовали образцы периферической крови 51 условно здорового добровольца. Общий пул пациентов разделялся на две группы: 20 больных находились в ремиссии, а у 32 наблюдалось клиническое обострение, проявляющееся в появлении новой или усугублении имеющейся очаговой неврологической симптоматики, сохранявшейся не менее 48 часов при отсутствии лихорадки и других возможных причин псевдообострения. Все группы имели сходный половой и возрастной состав.

Пациенты никогда не проходили лечение препаратами, изменяющими течение РС, а также не получали системные кортикостероидные препараты на протяжении трех месяцев, предшествующих исследованию. Для всех больных производилась базальная оценка степени поражения функциональных систем, и рассчитывался балл по расширенной шкале инвалидизации EDSS [16]. При определении обострения не учитывались результаты магнитно-резонансно томографического исследования.

Все пациенты с рассеянным склерозом подписывали информированное согласие на участие в исследованиях в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические

принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследование одобрено Комиссией по этике ФГБУН «Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой» РАН 23 октября 2014 года.

Образцы крови получали пункцией периферической вены, а СМЖ – люмбальной пункцией. Забор образцов производился в вакуумные пробирки с K_3 ЭДТА. Анализ проводился в тот же день. При подготовке образцов учитывали рекомендации производителей реагентов. Окраска образцов производилась моноклональными антителами, конъюгированными с флуорохромами, производства Beckman Coulter, США. Для образцов крови использовали следующую комбинацию: CD62L-ECD (cat. N IM2713U), CD3-APC (cat. N IM2467), CD8-APC-AF700 (cat. N A66332), CD45RA-APC-AF750 (cat. N A86050), CD4-PacBlue (cat. N A82789) и CD45-Krome Orange (cat. N A96416). Для лизиса эритроцитов применяли безотмывочную технологию на базе раствора VersaLyse (cat. N A09777, Beckman Coulter, США) с добавлением IOTest 3 Fixative Solution (cat. N A07800, Beckman Coulter, США) в соотношении 975:25 мкл. Комбинация антител для образцов СМЖ: CD45RA-FITC (cat. N 6603117), CD56-PE (cat. N A07788), CD62L-ECD (cat. N IM2713U), CD8-PC5.5 (cat. N B21205), CD4-PC7 (cat. N 737660), CD3-APC (cat. N IM2467), CD45-KrO (cat. N A96416).

Пробоподготовка СМЖ включала в себя отмывку избытком забуференного фосфатами физиологического раствора (ЗФР) с pH 7,2-7,4 (центрифугирование при 330 g 7 минут) непосредственно после забора образца, с последующей окраской антителами в течении 15 минут. После окраски к суспензии клеток добавляли 200 мкл 2%-ного раствора нейтрального параформальдегида (cat. N HT5011, Sigma-Aldrich, США) в ЗФР и сразу же проводили анализ на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США).

Алгоритм выделения основных популяций $CD8^+$ T-лимфоцитов периферической крови был подробно описан в 2015 году в работе [2], а анализ образцов СМЖ проводили с использованием тактики «гейтирования», приведенной на рисунке 1. Стадии дифференцировки Тцит и соответствующие им субпопуляции выделялись на основании уровня экспрессии CD45RA и CD62L. Доля каж-

дой субпопуляции определялась в рамках общей популяции $CD3^+$ T-лимфоцитов.

Полученные с цитофлуориметра данные обрабатывали при помощи программного обеспечения Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку осуществляли с использованием ПО Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Результаты приводили в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Сравнение относительного содержания субпопуляций проводили при помощи критерия Вилкоксона для парных выборок, а корреляционный анализ – с использованием коэффициента ранговой корреляции r Спирмена.

Результаты

Популяционный состав лимфоцитов периферической крови оценивался нами ранее, результаты приведены в работе [3]. Наблюдается достоверное уменьшение концентрации и доли T-лимфоцитов у пациентов в период обострения. На стадии ремиссии абсолютное и относительное число Тцит ниже, чем в контроле.

Популяционный состав лимфоцитов спинномозговой жидкости

Лимфоциты, выявлявшиеся в составе СМЖ больных РС, были представлены в основном T-клетками с фенотипом $CD3^+$, относительное содержание которых в период ремиссии находилось в пределах 94,56% (91,89-95,70), тогда как на фоне обострения составляло 93,71% (91,64-95,32). В период обострения отмечена обратная зависимость между уровнем этих клеток в СМЖ и баллом по шкале EDSS ($r = -0,504$ при $p < 0,001$). Анализ основных популяций $CD3^+$ лимфоцитов СМЖ показал, что при обострении РС наблюдается снижение относительного содержания $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов до 64,16% (55,41-68,91) при сравнении с образцами от пациентов в период ремиссии (70,67% (63,82-72,41) при $p = 0,016$). Уровень цитотоксических T-клеток при обострении незначительно увеличивался (23,81% (19,33-28,43) против 19,09% (16,77-23,06) при $p = 0,100$).

Субпопуляционный состав цитотоксических T-лимфоцитов периферической крови

При сравнении разных субпопуляций Тцит в периферической крови больных РС с группой контроля основные изменения касались исключительно популяции EM. Так, при ремиссии РС относительное содержание EM Тцит снижа-

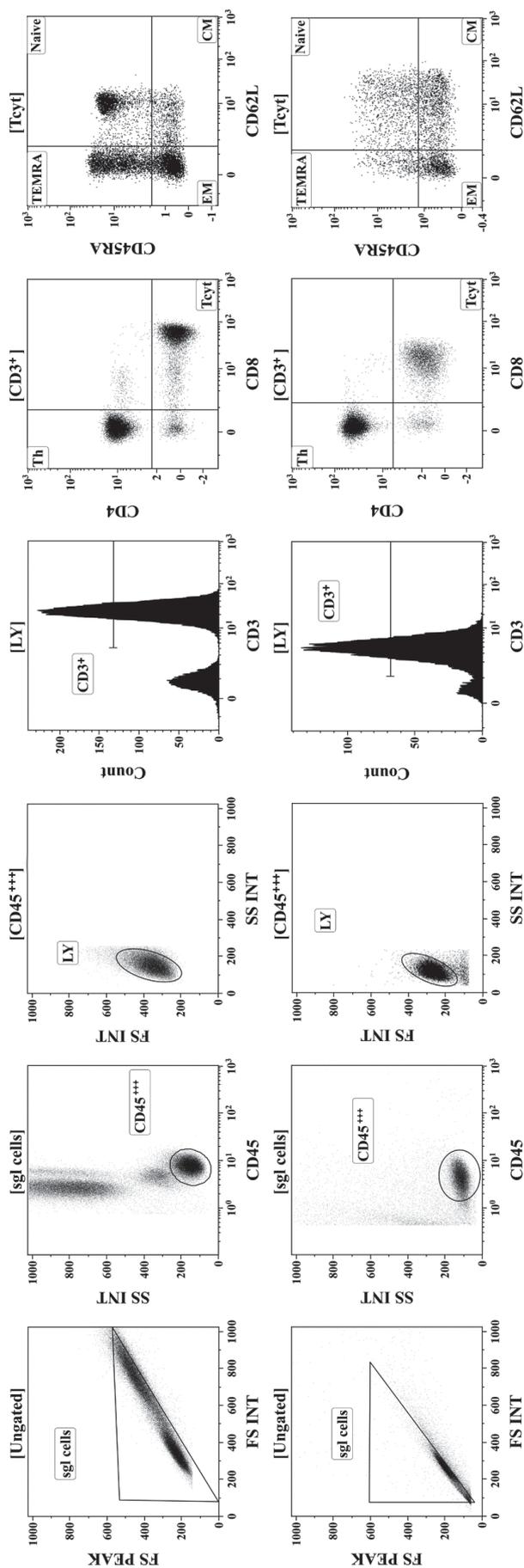


Рисунок 1. Алгоритмы выявления основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови (верхний ряд гистограмм) и спинно-мозговой жидкости (нижний ряд гистограмм) при помощи многоцветной проточной цитометрии

Примечание. Слева направо: гистограммы а: по оси абсцисс – интегральный сигнал прямого светорассеяния; по оси ординат – пиковый сигнал прямого светорассеяния; в области «sgl cells» находятся не слипшиеся лимфоциты, на гистограмме отображены все проанализированные клетки. Гистограммы б: по оси абсцисс – уровень экспрессии CD45; по оси ординат – боковое светорассеяние (SS), характеризующее структуру цитоплазмы клеток; в области «CD45+++» находятся клетки с высокой экспрессией CD45 и низкими значениями бокового светорассеяния, показаны только одиночные клетки из гистограммы а. Гистограммы в: по оси абсцисс – боковое светорассеяние (SS); по оси ординат – прямое светорассеяние (FS), характеризующее размер клеток; в области «LY» находятся клетки соответствующие по своим размерам и структуре популяции лимфоцитов периферической крови. Гистограммы г: по оси абсцисс – уровень экспрессии CD3; по оси ординат – количество проанализированных клеток; а области «CD3+» находятся Т-лимфоциты. Гистограммы д: по оси абсцисс – уровень экспрессии CD8; по оси ординат – уровень экспрессии CD4; в области «Tcyt» располагаются цитотоксических Т-лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD8⁺. Гистограммы е: по оси абсцисс – уровень экспрессии CD62L; по оси ординат – уровень экспрессии CD45RA; в областях «naive», «CM», «EM» и «TEMRA» располагаются «наивные», клетки центральной и эффекторной памяти, а также «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные цитотоксические Т-лимфоциты соответственно.

Figure 1. Gating strategy of flow cytometric analysis of main peripheral blood (upper row of histograms) and liquor (lower row of histograms) CD8⁺ T cell subsets

Note. From left to right: Histograms a: along the x-axis – the integral signal of forward light scattering; along the y-axis, the peak forward scatter signal; in the “sgl cells” area there are non-agglutinated lymphocytes, the histogram shows all the analyzed cells. Histograms b: x-axis – CD45 expression level; along the y-axis – side scattering (SS), which characterizes the structure of the cell cytoplasm; in the “CD45+++” region there are cells with high expression of CD45 and low values of side scatter, only single cells from histogram a are shown. Histograms c: along the abscissa axis – side light scattering (SS); along the y-axis – forward scattering (FS), which characterizes the cell size; in the “LY” area there are cells corresponding in size and structure to the population of peripheral blood lymphocytes. Histograms d: on the x-axis there is CD3 expression level; on the y-axis – number of analyzed cells; and “CD3+” areas are T lymphocytes. Histograms e: x-axis – CD4 expression level; in the area of “Tcyt” are cytotoxic T lymphocytes with the phenotype CD3⁺CD8⁺. Histograms e: abscissa – CD45RA expression level; ordinate – CD45RA-positive cytotoxic T lymphocytes, respectively.

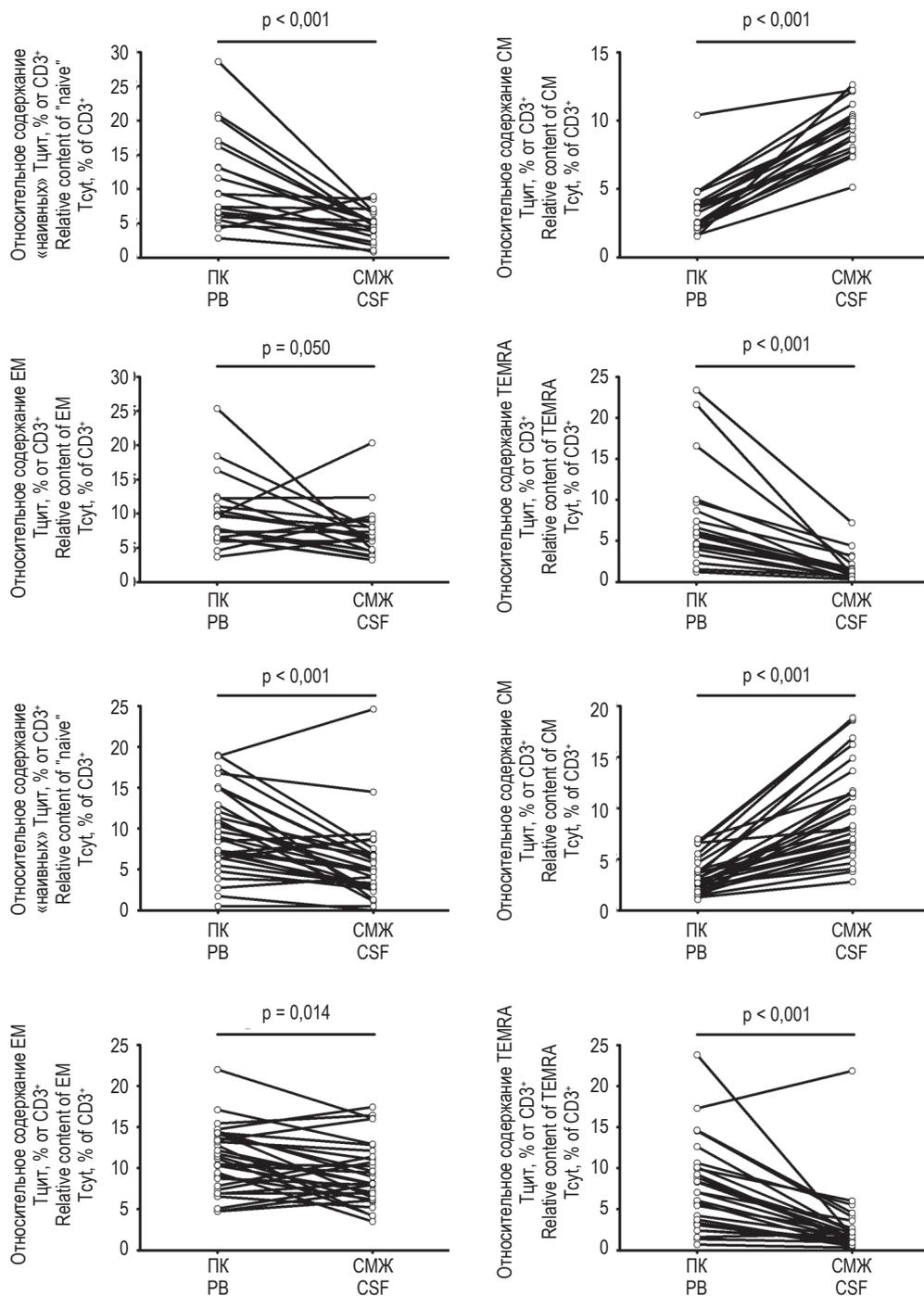


Рисунок 2. Анализ относительного содержания различных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови и спинно-мозговой жидкости больных рассеянным склерозом в период ремиссии (верхний ряд) и обострения (нижний ряд)

Примечание. ПК – относительное содержание клеток в периферической крови; СМЖ – относительное содержание клеток в спинно-мозговой жидкости. Результаты приведены в виде % клеток каждой из популяций Тцйт в рамках общей популяции CD3+ клеток. Статистическая значимость зависимости между выборками оценивали при помощи парного теста Вилкоксона.

Figure 2. Frequencies of main maturation CD8+T cell subsets in peripheral blood and liquor from patients with multiply sclerosis during relapse (n = 32, upper row) and remission (n = 20, lower row) periods of disease

Note. PB and CSF represents the relative numbers (% of CD8+T cell subsets within total CD3+T cell population) of main maturation subsets of CD8+T cell in peripheral blood and liquor, respectively. Significant differences were determined by the Wilcoxon matched pairs test.

лось до 8,70% (6,51-11,63), что было достоверно ($p = 0,005$) ниже значений контрольной группы – 12,18% (10,38-15,24), хотя и не отличалось ($p = 0,114$) от больных в период обострения – 11,31% (8,28-13,90). Исследование содержания Тцит с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻ периферической крови показало, что абсолютное число таких клеток как при обострении (118 (80-184) кл/мкл), так и на фоне ремиссии (104 (85-142) кл/мкл), значительно ниже ($p = 0,017$ и $p = 0,003$, соответственно) контрольных значений (166 (124-213) кл/мкл).

Субпопуляционный состав цитотоксических Т-лимфоцитов СМЖ

Анализ образцов СМЖ выявил, что при рецидиве РС имеет место увеличение ($p = 0,027$) уровня ЕМ Тцит до 8,16% (6,40-11,40), тогда как в период ремиссии лимфоциты данной популяции составляли 6,49% (4,51-8,39) от общего числа CD3⁺ клеток СМЖ. Кроме того, именно у больных с обострением РС наблюдалась положительная корреляционная связь между увеличением доли этих клеток в СМЖ и баллом EDSS ($r = 0,366$ при $p = 0,047$), чего не было отмечено для больных в период ремиссии ($r = 0,018$ при $p = 0,945$). Таким образом, при рецидиве РС на-

блюдается увеличение уровня ЕМ Тцит в СМЖ при сравнении с показателями периферической крови, а также СМЖ больных в период ремиссии.

Взаимосвязь между разными субпопуляциями Тцит различной локализации

Как видно из рисунка 2, снижение уровня «наивных» Тцит в периферической крови сопровождалось уменьшением данной популяции клеток в составе СМЖ больных РС как в период обострения, так и в период ремиссии. Вне зависимости от стадии заболевания в периферической крови содержание «наивных» клеток всегда превосходило показатели СМЖ. Более того, при анализе образцов периферической крови, полученных от больных РС в период обострения, были выявлены обратные зависимости между баллами шкалы EDSS и абсолютным ($r = -0,430$ при $p = 0,014$) и относительным ($r = -0,502$ при $p = 0,003$) содержанием CD45RA⁺CD62L⁺Тцит. Клетки центральной памяти в образцах СМЖ превосходили значения, полученные для периферической крови. Увеличение относительного содержания CD45RA⁺CD62L⁻Тцит в периферической крови сопровождалось их изменением в СМЖ ($p = 0,014$), тогда как на стадии ремиссии подобной динамики не отмечалось.

ТАБЛИЦА 1. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ОТНОСИТЕЛЬНЫМ (% ОТ CD3⁺ КЛЕТОК) И АБСОЛЮТНЫМ (#, КОЛ-ВО КЛЕТОК В 1 мкл) СОДЕРЖАНИЕМ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И АНАЛОГИЧНЫМИ ПОПУЛЯЦИЯМИ CD3⁺CD8⁺ КЛЕТОК СПИННО-МОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ РС В ПЕРИОД ОБОСТРЕНИЯ (n = 32)

TABLE 1. CORRELATION BETWEEN RELATIVE (% OF CD3⁺ CELLS) AND ABSOLUTE (#, NUMBER OF CELLS PER 1 μL) CONTENT OF SUBPOPULATIONS OF CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD AND SIMILAR POPULATIONS OF CD3⁺CD8⁺ CELLS IN CEREBROSPINAL FLUID IN MS PATIENTS DURING EXACERBATION (n = 32)

		«Наивные» Тцит Naive Tcyt		СМ Тцит CM Tcyt		ЕМ Тцит EM Tcyt		ТЕМРА Тцит TEMRA Tcyt	
		%	#	%	#	%	#	%	#
«Наивные» Тцит, % Naive Tcyt, %	r	0,456	0,554	0,370	0,441	-0,078	0,237	0,361	0,417
	p	0,011	0,001	0,044	0,015	0,683	0,207	0,050	0,022
СМ Тцит, % CM Tcyt, %	r	0,248	0,375	0,627	0,645	0,315	0,551	-0,184	0,000
	p	0,187	0,041	< 0,001	< 0,001	0,090	0,002	0,330	1,000
ЕМ Тцит, % EM Tcyt, %	r	-0,498	-0,524	0,033	-0,095	0,566	0,261	-0,226	-0,283
	p	0,005	0,003	0,864	0,618	0,001	0,164	0,229	0,129
ТЕМРА Тцит, % TEMRA Tcyt, %	r	-0,071	0,045	-0,027	0,081	0,030	0,265	0,671	0,664
	p	0,711	0,813	0,886	0,670	0,875	0,158	< 0,001	< 0,001

Примечание. По горизонтали указаны популяции Тцит, содержащиеся в периферической крови, по вертикали – популяции Тцит, содержащиеся в СМЖ; жирным шрифтом выделены достоверные корреляционные зависимости в соответствии с коэффициентом ранговой корреляции r Спирмена.

Note. Horizontally indicates populations of Tcyt contained in peripheral blood, vertically – populations of Tcyt contained in CSF; bold type indicates reliable correlation dependences in accordance with the Spearman's rank correlation coefficient r.

ТАБЛИЦА 2. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ОТНОСИТЕЛЬНЫМ (% ОТ CD3⁺ КЛЕТОК) И АБСОЛЮТНЫМ (#, КОЛ-ВО КЛЕТОК В 1 мкл) СОДЕРЖАНИЕМ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И АНАЛОГИЧНЫМИ ПОПУЛЯЦИЯМИ CD3⁺CD8⁺ КЛЕТОК СПИННО-МОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ РС В ПЕРИОД РЕМИССИИ (n = 20)

TABLE 2. CORRELATION BETWEEN RELATIVE (% OF CD3⁺ CELLS) AND ABSOLUTE (#, NUMBER OF CELLS PER 1 μL) NUMBER OF SUBPOPULATIONS OF CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD AND SIMILAR POPULATIONS OF CD3⁺CD8⁺ CELLS IN CEREBROSPINAL FLUID IN MS PATIENTS DURING REMISSION (n = 20)

		«Наивные» Тцит Naïve Tcyt		СМ Тцит CM Tcyt		ЕМ Тцит EM Tcyt		ТЕМРА Тцит TEMRA Tcyt	
		%	#	%	#	%	#	%	#
«Наивные» Тцит, % Naïve Tcyt, %	r	0,380	0,463	-0,078	0,120	-0,126	-0,071	0,244	0,349
	p	0,098	0,040	0,743	0,613	0,596	0,767	0,301	0,132
СМ Тцит, % CM Tcyt, %	r	-0,056	0,053	0,529	0,477	0,039	0,119	0,212	0,153
	p	0,816	0,826	0,016	0,034	0,870	0,618	0,369	0,519
ЕМ Тцит, % EM Tcyt, %	r	-0,140	-0,250	-0,194	-0,328	0,110	-0,107	0,340	0,155
	p	0,556	0,289	0,413	0,158	0,645	0,654	0,143	0,514
ТЕМРА Тцит, % TEMRA Tcyt, %	r	0,206	0,053	0,051	-0,232	-0,235	-0,515	0,662	0,350
	p	0,383	0,823	0,830	0,324	0,319	0,020	0,001	0,131

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for table 1.

Результаты корреляционного анализа субпопуляционного состава Тцит периферической крови и СМЖ приведены для больных в период обострения в таблице 1, а для больных в период ремиссии – в таблице 2.

Обсуждение

Ранее мы уже публиковали данные о том, что при обострении РС в периферической крови снижается общее количество и доля CD3⁺ лимфоцитов по сравнению со здоровыми добровольцами и пациентами в ремиссии. В то время как в стадии ремиссии наблюдается достоверное уменьшение абсолютного и относительного числа цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с контролем [3]. Кроме того наблюдалась обратная взаимосвязь доли Тцит в популяции лимфоцитов и балла EDSS. Сходные изменения были отмечены и другими группами исследователей. Так, у больных РС в периферической крови повышалось соотношение CD4/CD8 лимфоцитов, главным образом, за счет снижения относительного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов [9]. Данное обстоятельство было связано с уменьшением в циркуляции уровня CD28⁺CD8⁺ лимфоцитов, тогда как относительное содержание CD28⁺CD8⁺ клеток достоверно не различалось между сравниваемыми группами. В рамках другого исследования также отмечено снижение

общего пула циркулирующих CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов за счет уменьшения уровней клеток эффекторной памяти (ЕМ) и эффекторных клеток (ТЕМРА) в периферической крови [23].

В СМЖ больных РС большая часть лимфоцитов была представлена Т-клетками. При этом наблюдалось незначительное увеличение Тцит при обострении, что в сочетании с достоверным снижением процента CD4⁺Т-лимфоцитов приводило к отмеченному нами ранее значимому уменьшению соотношения CD4/CD8-лимфоцитов [4]. Данные литературы также указывают на то, что основным типом циркулирующих лимфоцитов в СМЖ являются Т-клетки, составляющие по некоторым оценкам около 97% [27] или 95% [13] от общего числа лимфоцитов. Причем подавляющее большинство клеток являются Т-хелперами, на которых приходится около 70% [10] или 67% [13] лимфоцитов. При РС ранее отмечалось увеличение относительного содержания Т-хелперов в СМЖ при сравнении с условно здоровыми добровольцами [25]. Более того, сравнение различных нейровоспалительных заболеваний выявило, что увеличение соотношения CD4⁺/CD8⁺ характерно именно для РС [20], тогда как результаты собственных исследований указывают на то, что данный показатель значимо изменяется в периоды ремиссии и обострения РС.

Клетки центральной памяти в образцах СМЖ превосходили значения, полученные для пери-

ферической крови, что подтверждается данными других исследователей [19]. Считается, что именно на этой стадии дифференцировки Т-лимфоциты способны направленно мигрировать в нервную ткань за счет взаимодействия поверхностного Р-селектина с ICAM-1 венул хориоидального сплетения и субарахноидального пространства [15]. В рамках другого исследования было показано, что именно цитотоксические Т-лимфоциты больных с активным рецидивирующим РС несли на своей поверхности высокий уровень PSGL-1 при сравнении с аналогичной популяцией Т-лимфоцитов периферической крови условно здоровых доноров. Более того, именно CD3⁺CD8⁺ клетки обладали повышенной по сравнению с Т-хелперами способностью к миграции через активированные венулы мозговых оболочек в условиях *in vitro* [5].

Следует также отметить, что при сравнении разных субпопуляций Тцит в периферической крови больных РС с группой контроля основные изменения касались исключительно популяции ЕМ. Принципиальным отличием ЕМ клеток от центральной памяти (СМ) является выраженная способность к продукции эффекторных цитокинов и проявлению цитолитической активности в отношении клеток-мишеней [1]. Более того, именно на этой популяции клеток возрастает экспрессия молекул «хоуминга» в воспаленные ткани. Так, значительная часть цитотоксических Т-лимфоцитов, обнаруживаемых в составе нервной ткани, не экспрессировали CCR7 и CD62L, но несли на своей поверхности α4-интегрин [14]. Ключевую роль в селективном проникновении клеток эффекторной памяти в пределы ЦНС играли эндотелиальные клетки сосудов гематоэнцефалического барьера, причем привлекались именно CD3⁺CD8⁺ лимфоциты, способные к синтезу и секреции IFNγ и IL-17. Другой важнейшей молекулой, определяющей миграцию CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов периферической крови в пределы нервной ткани, является МСАМ [17]. Уровень МСАМ⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, способных синтезировать провоспалительные цитокины: IL-17, IFNγ, GM-CSF и TNF, а также индуцировать апоптоз олигодендроцитов в условиях *in vitro*, у больных РС повышался во время рецидива заболевания.

Отдельно следует остановиться на результатах корреляционного анализа субпопуляционного состава Тцит периферической крови и СМЖ. Как видно из приведенных результатов, при обострении РС, как правило, наблюдается положительная взаимосвязь между относительным содержанием отдельных субпопуляций Тцит в СМЖ и процентным содержанием, а также concentra-

цией аналогичных популяций Т-лимфоцитов в периферической крови. Обратная зависимость между уровнем ЕМ Тцит, циркулирующими в СМЖ, и «наивными» клетками периферической крови может объясняться тесной связью между этими двумя популяциями Тцит и клиническими проявлениями РС (в баллах по шкале EDSS), как это было обнаружено нами.

По-видимому, обострение РС, ассоциированное с нарушением целостности гемато-энцефалического барьера и сопровождающееся направленной миграцией Т-клеток из периферических лимфоидных органов в нервную ткань, сопровождается сонаправленными изменениями субпопуляционного состава Тцит периферической крови и СМЖ (табл. 1). Последнее обстоятельство требует дальнейших детальных исследований, так как поможет определить роль цитотоксических Т-клеток в патогенезе РС. С одной стороны, Тцит за счет продукции провоспалительных цитокинов (в первую очередь, IL-17) и запуска апоптоза в клетках нервной ткани способствуют развитию данной патологии. Увеличение относительного содержания IL-17-продуцирующих Тцит обнаружено как в составе очагов воспаления, так и в периферической крови больных РС [24, 29]. Эти клетки также обнаруживаются в составе активных очагов поражения нервной ткани при помощи гистологических методов исследования [28]. С другой стороны, некоторыми исследователями отмечается способность Тцит ограничивать воспалительные реакции, протекающие в нервной ткани за счет индукции апоптоза в активированных Т-хелперах, распознающих эпитопы основного белка миелина (МВР, от англ. myelin basic protein) и гликопротеина олигодендроцитов миелина (МОГ, от англ. myelin oligodendrocyte glycoprotein) при совместном культивировании [8]. Более того, в ходе экспериментов *in vitro* выявлена способность МОГ1-специфических Тцит ингибировать пролиферацию МОГ1-специфических Т-хелперов в условиях *in vitro* [6].

Заключение

Основываясь на приведенных выше результатах и данных литературы, можно утверждать, что у больных рассеянным склерозом цитотоксические Т-лимфоциты могут мигрировать из кровотока в ЦНС. Данное обстоятельство позволяет рассматривать эти клетки как возможные маркеры развития заболевания, а их дальнейшее исследование даст возможность лучше понять механизмы патогенеза рассеянного склероза.

Список литературы / References

1. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 4 (17). С. 947-964. [Kudryavtsev I.V. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 4 (17), pp. 947-964. (In Russ.)]
2. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Волков А.Е., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Полевщиков А.В. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки // Тихоокеанский медицинский журнал, 2015. Т. 2, № 60. С. 30-35. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Volkov A.E., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Polevshchikov A.V. CD56 and CD57 expression by distinct populations of human cytotoxic T lymphocytes. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2015, Vol. 2, no. 60, pp. 30-35. (In Russ.)]
3. Кудрявцев И.В., Ильвес А.Г., Новоселова О.М., Рубаник К.С., Серебрякова М.К., Прахова Л.Н. Экспрессия CD56 цитотоксическими Т-лимфоцитами периферической крови при рассеянном склерозе // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12, № 2 (21). С. 150-159. [Kudryavtsev I.V., Ilves A.G., Novoselova O.M., Rubanik K.S., Serebriakova M.K., Prakhova L.N. CD56 expression by peripheral blood cytotoxic T cells in multiple sclerosis. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12, no. 2, pp. 150-159. (In Russ.)]
4. Лебедев В.М., Ильвес А.Г., Кудрявцев И.В., Новоселова О.М., Прахова Л.Н., Рубаник К.С., Серебрякова М.К. Анализ субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови и ЦСЖ больных рассеянным склерозом в стадии обострения и ремиссии // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Материалы XI Всероссийского съезда неврологов и IV конгресса Национальной ассоциации по борьбе с инсультом, 2019. Т. 119, № 5. С. 54. [Lebedev V.M., Ilves A.G., Kudryavtsev I.V., Novoselova O.M., Prakhova L.N., Rubanik K.S., Serebriakova M.K. Analysis of T-lymphocyte subpopulations in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis in exacerbation and remission phases. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova. Materialy XI Vserossiyskogo s'ezda nevrologov i IV kongressa Natsionalnoy assotsiatsii po borbe s insultom = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry. Materials of the XI Russian Congress of Neurologists and IV Congress of the National Stroke Association*, 2019, Vol. 119, no. 5, p. 54. (In Russ.)]
5. Battistini L., Piccio L., Rossi B., Bach S., Galgani S., Gasperini C., Ottoboni L., Ciabini D., Caramia M.D., Bernardi G., Laudanna C., Scarpini E., McEver R.P., Butcher E.C., Borsellino G., Constantin G. CD8⁺ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood*, 2003, Vol. 101, no. 12, pp. 4775-4782.
6. Baughman E.J., Mendoza J.P., Ortega S.B., Ayers C.L., Greenberg B.M., Frohman E.M., Karandikar N.J. Neuroantigen-specific CD8⁺ regulatory T-cell function is deficient during acute exacerbation of multiple sclerosis. *J. Autoimmun.*, 2011, Vol. 36, no. 2, pp. 115-124.
7. Bitsch A., Schuchardt J., Bunkowski S., Kuhlmann T., Brück W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain*, 2000, Vol. 123, no. 6, pp. 1174-1183.
8. Correale J., Villa A. Isolation and characterization of CD8⁺ regulatory T cells in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 2008, Vol. 195, no. 1-2, pp. 121-134.
9. Crucian B., Dunne P., Friedman H., Ragsdale R., Pross S., Widen R. Alterations in levels of CD28-/CD8⁺ suppressor cell precursor and CD45RO⁺/CD4⁺ memory T lymphocytes in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1995, Vol. 2, pp. 249-252.
10. De Graaf M., Smitt P., Luitwieler R., van Vetzen Z., van den Broek P.D., Kraan J., Gratama J.W. Central memory CD4⁺ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry Part B*, 2011, Vol. 80, no. 1, pp. 43-50.
11. Fogdell-Hahn A., Ligiers A., Grønning M., Hillert J., Olerup O. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class II genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens*, 2000, Vol. 55, no. 2, pp. 140-148.
12. Hauser S.L., Bhan A.K., Gilles F., Kemp M., Kerr C., Weiner H.L. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.*, 1986, Vol. 19, no. 6, pp. 578-587.
13. Ho E.L., Ronquillo R., Altmeppen H., Spudich S.S., Price R.W., Sinclair E. Cellular composition of cerebrospinal fluid in HIV-1 infected and uninfected subjects. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 6, e66188. doi: 10.1371/journal.pone.0066188.
14. Ifergan I., Kebir H., Alvarez J.I., Marceau G., Bernard M., Bourbonnière L., Poirier J., Duquette P., Talbot P.J., Arbour N., Prat A. Central nervous system recruitment of effector memory CD8⁺ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on $\alpha 4$ integrin. *Brain*, 2011, Vol. 134, no. 12, pp. 3560-3577.
15. Kivisäkk P., Mahad D.J., Callahan M.K., Trebst C., Tucky B., Wei T., Wu L., Baekkevold E.S., Lassmann H., Staugaitis S.M., Campbell J.J., Ransohoff R.M. Human cerebrospinal fluid central memory CD4⁺ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *PNAS*, 2003, Vol. 100, no. 14, pp. 8389-8394.
16. Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 1983, Vol. 33, no. 11, pp. 1444-1452.

17. Larochelle C., Lécuyer M.A., Alvarez J.I., Charabati M., Saint-Laurent O., Ghannam S., Kebir H., Flanagan K., Yednock T., Duquette P., Arbour N., Prat A. Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation. *Ann. Neurol.*, 2015, Vol. 78, no. 1, pp. 39-53.
18. Lassmann H., Brück W., Lucchinetti C.F. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.*, 2007, Vol. 17, no. 2, pp. 210-218.
19. Mullen K.M., Gocke A.R., Allie R., Ntranos A., Grishkan I.V., Pardo C., Calabresi P.A. Expression of CCR7 and CD45RA in CD4⁺ and CD8⁺ subsets in cerebrospinal fluid of 134 patients with inflammatory and non-inflammatory neurological diseases. *J. Neuroimmunol.*, 2012, Vol. 249, no. 1-2, pp. 86-92.
20. Oreja-Guevara C., Sindern E., Raulf-Heimsoth M., Malin J.P. Analysis of lymphocyte subpopulations in cerebrospinal fluid and peripheral blood in patients with multiple sclerosis and inflammatory diseases of the nervous system. *Acta Neurol. Scand.*, 1998, Vol. 98, no. 5, pp. 310-313.
21. Pender M.P., Csurhes P.A., Pfluger C.M., Burrows S.R. Deficiency of CD8⁺ effector memory T cells is an early and persistent feature of multiple sclerosis. *Mult. Sclerosis.*, 2014, Vol. 20, no. 14, pp. 1825-1832.
22. Planas R., Metz I., Martin R., Sospedra M. Detailed characterization of T cell receptor repertoires in multiple sclerosis brain lesions. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 509. doi: 10.3389/fimmu.2018.00509.
23. Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B., Clanet M., Cohen J.A., Filippi M., Fujihara K., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., Lublin F.D., Montalban X., O'Connor P., Sandberg-Wollheim M., Thompson A.J., Waubant E., Weinshenker B., Wolinsky J.S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.*, 2011, Vol. 69, no. 2, pp. 292-302.
24. Salehi Z., Doosti R., Beheshti M., Janzamin E., Sahraian M.A., Izad M. Differential frequency of CD8⁺ T cell subsets in multiple sclerosis patients with various clinical patterns. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 7, e0159565. doi: 10.1371/journal.pone.0159565.
25. Scolozzi R., Boccafogli A., Tola M.R., Vicentini L., Camerani A., Degani D., Granieri E., Caniatti L., Paolino E. T-cell phenotypic profiles in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of multiple sclerosis patients. *J. Neurol. Sci.*, 1992, Vol. 108, no. 1, pp. 93-98.
26. Skulina C., Schmidt S., Dornmair K., Babbe H., Roers A., Rajewsky K., Wekerle H., Hohlfeld R., Goebels N. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *PNAS*, 2004, Vol. 101, no. 8, pp. 2428-2433.
27. Svenningsson A., Hansson G., Andersen O., Andersson R., Patarroyo M., Stemme S. Adhesion molecule expression on cerebro-spinal fluid T lymphocytes: evidence for common recruitment mechanisms in multiple sclerosis, aseptic meningitis, and normal controls. *Ann. Neurol.*, 1993, Vol. 34, no. 2, pp. 155-161.
28. Tzartos J.S., Friese M.A., Craner M.J., Palace J., Newcombe J., Esiri M.M., Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.*, 2008, Vol. 172, no. 1, pp. 146-155.
29. Wang H.H., Dai Y.Q., Qiu W., Lu Z.Q., Peng F.H., Wang Y.G., Bao J., Li Y., Hu X.Q. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J. Clin. Neurosci.*, 2011, Vol. 18, no. 10, pp. 1313-1317.

Авторы:

Серебрякова М.К. — научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии, отдел иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Ильвес А.Г. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории направленной внутримозговой доставки препаратов ФГБУН «Институт мозга человека имени Н.П. Бехтеревой» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Лебедев В.М. — младший научный сотрудник лаборатории направленной внутримозговой доставки препаратов ФГБУН «Институт мозга человека имени Н.П. Бехтеревой» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Serebriakova M.K., Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Ilyes A.G., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Targeted Intracerebral Drug Delivery, N. Bechtereva Institute of Human Brain, St. Petersburg, Russian Federation

Lebedev V.M., Junior Research Associate, Laboratory of Targeted Intracerebral Drug Delivery, N. Bechtereva Institute of Human Brain, St. Petersburg, Russian Federation

Новоселова О.М. — младший научный сотрудник лаборатории направленной внутримозговой доставки препаратов ФГБУН «Институт мозга человека имени Н.П. Бехтеревой» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Прахова Л.Н. — д.м.н., заведующая лабораторией направленной внутримозговой доставки препаратов ФГБУН «Институт мозга человека имени Н.П. Бехтеревой» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии, отдел иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; старший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Novoselova O.M., Junior Research Associate, Laboratory of Targeted Intracerebral Drug Delivery, N. Bechtereva Institute of Human Brain, St. Petersburg, Russian Federation

Prakhova L.N., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Targeted Intracerebral Drug Delivery, N. Bechtereva Institute of Human Brain, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Cellular Immunology, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; Senior Research Associate, Far Eastern Federal University, Vladivostok; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 25.01.2023
Принята к печати 27.05.2023

Received 25.01.2023
Accepted 27.05.2023

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ В ПЕРИОД 2020-2021 гг.

Костарев С.Н.^{1,2,3}, Серeda Т.Г.²

¹ ФГАОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», г. Пермь, Россия

² ФГБОУ ВО «Пермский государственный аграрно-технологический университет имени академика Д.Н. Прянишникова», г. Пермь, Россия

³ ФКОУ ВО «Пермский институт Федеральной службы исполнения наказаний», г. Пермь, Россия

Резюме. Исследования изменений в иммунной системе подростков в период пандемии 2020-2021 годов недостаточно изучено. В работе исследованы показатели ПЦФМ в зависимости от возрастной группы детей и состояния иммуноглобулинов. Всего было классифицировано 12 категорий (3 возрастных категории и 4 категории, относительно состояния иммуноглобулинов).

Целью данной работы являлось исследование изменений показателей ПЦФМ иммунограмм протекающих в иммунной системе детей и подростков в период пандемии.

Методология работы была основана на анализе иммунограмм, включающих биохимические исследования и проточный цитофотометрический анализ.

Полученные результаты иммунологического статуса пациентов были разбиты на три возрастные категории. Лабораторная диагностика иммунной системы человека проводилась на основе серологического и проточного цитофотометрического анализа. В процессе исследований было проанализировано 250 проб. Иммунограммы были предварительно отсортированы по состоянию иммуноглобулинов А, М и G на четыре категории: отсутствие заболевания — R₁ при котором значения иммуноглобулинов А, М и G находились в референтном интервале, активная стадия болезни — R₂, при котором иммуноглобулины А и М, вышли за границы референтного интервала, пассивная стадия болезни — R₃, характеризующаяся состоянием иммуноглобулинов G и М и процесс выздоровления пациента — R₄. В иммунограммах для исследования были выбраны восемь показателей проточного цитофотометрического анализа: лейкоциты, лимфоциты, Т-лимфоциты (CD3⁺), В-лимфоциты (CD19⁺), НК-клетки (CD16⁺CD56⁺), Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺), НКТ-клетки и индекс иммунорегуляции (CD4⁺/CD8⁺). Проведен количественный анализ отклонений данных показателей от референтного интервала у трех исследуемых возрастных групп в возрасте до 18 лет, проживающих в Пермском крае Российской Федерации во время пандемии 2020-2021 гг.

Результаты исследований показали, что в категории R₁ превышения наблюдались по Т- и В-лимфоцитам у старшей и младшей возрастных групп, по Т-хелперам и Индексу иммунорегуляции у младших возрастных групп. У пациентов категории R₂ наблюдались превышения по лейко-

Адрес для переписки:

Костарев Сергей Николаевич
ФГАОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»
614016, Россия, г. Пермь, ул. Революции, 52в, кв. 404.
Тел.: 8 (906) 878-39-29.
E-mail: iums@dom.raid.ru

Address for correspondence:

Sergey N. Kostarev
Perm National Research Polytechnic University
52v Revolution St, Apt 404
Perm
614016 Russian Federation
Phone: +7 (906) 878-39-29.
E-mail: iums@dom.raid.ru

Образец цитирования:

С.Н. Костарев, Т.Г. Серeda «Исследование параметров иммунитета у детей в период 2020-2021 гг.» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 2. С. 161-172.
doi: 10.46235/1028-7221-1212-SOI

© Костарев С.Н., Серeda Т.Г., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.N. Kostarev, T.G. Sereda "Studies of immune parameters in adolescents over the period of 2020-2021", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 2, pp. 161-172.
doi: 10.46235/1028-7221-1212-SOI

© Kostarev S.N., Sereda T.G., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-1212-SOI

цитам у старшей группы при пониженном уровне иммуноглобулинов, а также по индексу иммунорегуляции у младшей группы при повышенном уровне иммуноглобулинов. Т-лимфоциты имели понижение у средней группы при пониженном уровне иммуноглобулинов. В-лимфоциты имели превышение у средней группы при пониженном уровне иммуноглобулинов. У детей категории R₃ понижение наблюдается у индекса иммунорегуляции для старшей группы при пониженном уровне иммуноглобулинов. При состоянии R₄ общее отклонение основных показателей иммунограмм уменьшается.

Ключевые слова: иммунограмма, иммуноглобулины, проточный цитофотометрический анализ, педиатрия, Т-хелперы, индекс иммунорегуляции

STUDIES OF IMMUNE PARAMETERS IN ADOLESCENTS OVER THE PERIOD OF 2020-2021

Kostarev S.N.^{a, b, c}, Sereda T.G.^b

^a Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

^b Perm State Agro-Technological University named after Academician D. Pryanishnikov, Perm, Russian Federation

^c Perm Institute of the Federal Penitentiary Service, Perm, Russian Federation

Abstract. Changes of immune system in adolescents during the 2020-2021 pandemic have not been sufficiently studied. The paper concerns features of flow cytometric indexes among the children of different age groups and their immunoglobulin status. The cohort was classified into 12 categories (3 age subgroups, and 4 categories relative to immunoglobulin status). The aim of this work was to investigate changes in the immunograms among children and adolescents during the COVID pandemic evaluated by means of flow cytometry. The methodology of the present work was based on evaluation of immunograms including biochemical studies and flow cytometric analysis.

The results of immunological studies of the patients were classified into three age categories. Laboratory diagnostics of human immune system was performed by means of serological and flow cytometric analyses. A total of 250 samples were analyzed in the course of the study. Primary classification of immunograms was performed by immunoglobulin A, M and G status into four categories as follows: absence of disease (R₁); immunoglobulin A, M, G values within the reference ranges and active disease (R₂); immunoglobulin A and M beyond the reference ranges and passive disease stage (R₃); immunoglobulin G and M status and patient recovery process (R₄). Eight parameters of immune cells detectable by flow cytometry were chosen for evaluation: total leukocytes, lymphocytes, T lymphocytes (CD3⁺), B lymphocytes (CD19⁺), NK cells (CD16⁺CD56⁺), T helper cells (CD3⁺CD4⁺), NKT cells, and immunoregulation index (CD4⁺/CD8⁺). Quantitative assessment of deviations for these indices from the reference values was performed in three distinct age groups under 18 years of age living in the Perm region of the Russian Federation during the pandemic of 2020-2021.

The results showed that, in the R₁ category, exceeding of reference values was observed for T cells and B cells in the older and younger groups. For T helper cells and immunoregulation index, the reference thresholds were exceeded in the younger groups. The R₂ patients had higher leukocyte levels in the older group along with lower immunoglobulin levels. The immunoregulation index in the younger group was accompanied by higher immunoglobulin levels. T cell levels were decreased in the middle group, along with reduced immunoglobulin levels. B lymphocyte values were elevated in the middle group with decreased immunoglobulin levels. In R₃ children, a decrease was observed in the immunoregulation index for the older group, with decreased immunoglobulin levels. In the R₄ category, the decreased overall deviation of the main immunogram indexes was revealed.

Keywords: immunogram, immunoglobulins, flow cytometry, pediatrics, T helper cells, immunoregulation index

Введение

Большой круг вопросов и явлений, изучаемых в связи с иммунитетом, оказался сложным и многообразным. Иммунология изучает специфические и неспецифические защитно-адаптационные механизмы, обуславливающие и регулирующие гомеостаз среды организма. Кроме этого она изучает гуморальные факторы иммунитета (антитела, бактериоцидные свойства сывороток), клеточно-тканевые реакции (фагоцитоз, реактивность клеток) и общие физиологические процессы, обуславливающие состояние иммунитета. Большое внимание в иммунологии уделяется изучению природы и свойств антигенов, т. е. тех веществ, которые индуцируют общие иммунологические реакции (к ним относятся микробы, их токсины, белки, полисахариды и вирусы).

Исследованию иммунограмм в педиатрии в настоящее время уделяется большое внимание. Расшифровке показателей иммунограммы для определения стадии и завершенности инфекционно-воспалительного процесса посвящены работы [1, 2], в основе которой был проведен анализ отклонений иммуноглобулинов. Иммунные нарушения и обоснование их коррекции при гастроудените изучены в работе [5]. Исследованию влияния осложнений, связанной с коронавирусной инфекцией, посвящены работы [3, 4]. Распространенность новой коронавирусной инфекции среди детского населения изучалась в работах [6, 9]. Протекание коронавирусной инфекции у детей с избыточным весом изучалась в работе [7]. Исследованию пандемии в Пермском крае посвящена статья [8].

Были проведены исследования иммунограмм трех возрастных групп детей и подростков Пермского края в период пандемии 2020–2021 гг. При анализе иммунограмм также учитывалось отклонение норм иммуноглобулинов А, М и G. Состояние иммуноглобулинов показывает текущее состояние болезни, т. е. по взаимному количественному анализу иммуноглобулинов А, М и G был сделан вывод о переходном периоде прохождения болезни и выявлено отклонение лейкоцитарной формулы крови.

Материалы и методы

В исследованиях использовалась теория интерпретации иммунограмм при воспалительных процессах [2]. Исследование пациентов и формирование данных для заполнения иммунограмм проводилось медицинским центром «Философия красоты и здоровья» (г. Пермь). Заборные пункты

для сбора данных для иммунограмм находились на территории Пермского края, включая краевой город Пермь и районные центры: города Губаха, Краснокамск и Соликамск. За период пандемии 2020–2021 гг., вызванной новой коронавирусной инфекцией вирусом атипичной пневмонии SARS-CoV-2, было обследовано 250 чел. Исследования проводились на основе серологического и проточного цитофотометрического анализа с использованием автоматического анализатора ILab Taurus. Материалом для исследования служила венозная кровь пациентов. При анализе показателей иммунитета использовались количественные показатели референсных интервалов, используемых в лаборатории медицинского центра «Философия красоты и здоровья». Показатели иммунограмм изучались для четырех групп пациентов, проживающих в Пермском крае, в зависимости от взаимного состояния иммуноглобулинов А, М и G.

Результаты

Исследование пандемии в Пермском крае

За период 2020–2021 гг. в Пермском крае наблюдалось три волны ухудшения эпидемиологической ситуации. Отсчетом начала эпидемии в Пермском крае было принято 1 марта 2020 года, когда начались фиксироваться первые случаи коронавирусной инфекции. 2 апреля 2020 года В. Путин издал указ «О мерах по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения на территории Российской Федерации в связи с распространением новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Первая волна прошла весной 2020 года, при которой наблюдалось около 300 случаев инфицирования в сутки. Вторая волна выпала на осенний период 2021 года, при которой уже было свыше 3000 инфицированных людей в сутки. К пиковому периоду пандемии в Пермском крае можно отнести осенне-зимний период 2021–2022 года, где каждый день фиксировалось более 3000 случаев заболевших. В настоящее время (2022–2023) 27 декабря 2022 г. в Пермском крае был зафиксирован подштамм Омикрона, новый штамм «Кракен». В весенне-зимний период 2022–2023 гг. наблюдается повышение вирусной активности, в связи с чем наблюдение и принятие профилактических мер является актуальной задачей.

Кодировка параметров модели иммунограммы

Для формирования модели трансформации иммунограммы были взяты две группы параметров, характеризующие общую иммунную си-

стему человека. Состояние иммунной системы человека будет зависеть от состояния показателей проточной цифровой фотометрии (ПЦФМ) и также важным показателем является состояние системы иммуноглобулинов (Им), в зависимости от которого сформированы четыре категории иммунограмм. Для формализации элементов системы введены множества элементов (табл. 1).

В зависимости от набора показателей элементов системы иммунного анализа можно получать более точную картину иммунного состояния человека. Распишем упрощенную систему элементов, применяемую при составлении иммунограммы медицинским центром «Философия красоты и здоровья», г. Пермь. Для упрощения описания параметров иммунограммы была задана система идентификаторов (табл. 2).

Лабораторные исследования по изучению показателей иммунограмм иммунной системы

Возрастная группировка и исследование ПЦФМ от биохимических исследований на иммуноглобулины

Эксперименты были проведены на базе медицинского центра «Философия красоты и здоровья» (г. Пермь) в период 2020-2021 гг. Иммунограммы были отобраны для популяций детского и подросткового возраста от 0 до 18 лет. Для упрощения расчетов и лучшей обозримости результатов было сформировано три возрастные группы

с увеличением интервала, согласно закона Вебера–Фехнера. Исследования по анализу параметров ПЦФМ были сгруппированы по отклонениям иммуноглобулинов А, М и G от референтного интервала. Всего было исследовано 250 иммунограмм (табл. 3).

Далее был сделан анализ отклонения показателей ПЦФМ от биохимических исследований на иммуноглобулины для состояний иммунной системы R_1 , R_2 , R_3 и R_4 (табл. 4, 5, 6, 7). Для обозначения превышения референтного интервала (РИ) использован символ \uparrow , для обозначения занижения референтного интервала использован символ \downarrow .

Обсуждение

Анализ показателей ПЦФМ иммунограмм от биохимических исследований на иммуноглобулины

При нахождении иммуноглобулинов А, G и М в референтном интервале (состояние иммунной системы R_1) было обнаружено, что лейкоциты (n_1) имели превышение 20% у младшей и 15% у старшей возрастных групп. Понижение лейкоцитов было незначительно. Лимфоциты (n_2) достигали превышения до 50% у младшей возрастной группы. Понижение лимфоцитов было незначительно. Т-лимфоциты ($CD3^+$) достигали превышения до 80% у старшей и младшей возрастных групп. В-лимфоциты ($CD19^+$) дости-

ТАБЛИЦА 1. ФОРМИРОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНОГРАММЫ

TABLE 1. FORMATION OF IMMUNOGRAM PARAMETERS

Кодировка массива Array encoding	Множество элементов Lots of elements
ПЦФМ = $\{n_1, n_2, \dots, n_7\}$	Множество элементов ПЦФМ Array of flow photometry indicators
Им = $\{A, M, G\}$	Множество элементов иммуноглобулинов Array Immunoglobulin
$R = \{R_1, R_2, R_3, R_4\}$	Множество категорий иммунограмм Array Immunogram: R_1 – отсутствие заболевания (иммуноглобулины А, М и G находятся в референтном интервале) R_1 – NO disease (state of Immunoglobulin's A, M and G normal) R_2 – активная стадия болезни (иммуноглобулины А и М вышли за границы референтного интервала) R_2 – Primary stage of the disease (Immunoglobulin's A and M exceeded the reference interval) R_3 – пассивная стадия болезни (иммуноглобулины G и М вышли за границы референтного интервала) R_3 – Secondary stage of the disease (Immunoglobulin's G and M are outside the reference interval) R_4 – процесс выздоровления пациента (иммуноглобулин IgG вышел за границы референтного интервала) R_4 – Patient recovery (Immunoglobulin IgG exceeded)

ТАБЛИЦА 2. ИССЛЕДУЕМЫЕ ПАРАМЕТРЫ ИММУНОГРАММЫ

TABLE 2. INVESTIGATED PARAMETERS OF THE IMMUNOGRAM

Параметры Parameters	Единицы измерения Units	Мнемоника Mnemonics
Иммуноглобулин А Immunoglobulin A	г/л g/L	A
Иммуноглобулин М Immunoglobulin M	г/л g/L	M
Иммуноглобулин G Immunoglobulin G	г/л g/L	G
Лейкоциты Leukocytes	10⁹/л 10 ⁹ /L	n ₁
Лимфоциты Lymphocytes	10⁹/л 10 ⁹ /L	n ₂
Т-лимфоциты (CD3⁺) T lymphocytes (CD3 ⁺)	10⁹/л 10 ⁹ /L	n ₃
В-лимфоциты (CD19⁺) B lymphocytes (CD19 ⁺)	10⁹/л 10 ⁹ /L	n ₄
НК клетки (CD16⁺CD56⁺) NK cells (CD16 ⁺ CD56 ⁺)	10⁹/л 10 ⁹ /L	n ₅
Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺) T helpers (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	10⁹/л 10 ⁹ /L	n ₆
НКТ-клетки NKT cells	10⁹/л 10 ⁹ /L	n ₇
Индекс иммунорегуляции (CD4⁺/CD8⁺) Immunoregulation index (CD4 ⁺ /CD8 ⁺)		n ₈

ТАБЛИЦА 3. ГРУППИРОВКА ИММУНОГРАММ

TABLE 3. GROUPING OF IMMUNOGRAMS

Возрастной диапазон Age range	Группировка иммунограмм Grouping of immunograms							Количество Quantity
	R ₁	R ₂		R ₃		R ₄		
		↓	↑	↓	↑	↓	↑	
0-3	48	2	6	2	3	6	2	69
	69,57%	11,59%		7,25%		11,59%		
4-9	54	24	10	2	4	4	1	99
	70,1%	15,6%		7,8%		6,5%		
10-18	30	25	13	2	7	1	4	82
	36,5%	46,3%		10,9%		6,1%		
Всего по подкатегории Total by subcategory	132	51	29	6	14	11	7	250
Итого Total	132	80		20		18		250
	52,8%	32%		8%		7,2%		100%

ТАБЛИЦА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЦФМ ПРИ НАХОЖДЕНИИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В РЕФЕРЕНТНОМ ИНТЕРВАЛЕ (СОСТОЯНИЕ R₁)

TABLE 4. STUDY OF A FLOW CYTOMETRY INDICATORS WHEN IMMUNOGLOBULINS ARE IN THE REFERENCE INTERVAL (R₁ STATE)

Показатель Index	Отклонение Deviation	Возрастные группы Age groups					
		0-3		4-9		10-18	
		РИ RI	%	РИ RI	%	РИ RI	%
n ₁	РИ RI	35	72,92	52	96,30	25	83,33
	↑	13	27,08	1	1,85	4	13,33
	↓		0,00	1	1,85	1	3,33
n ₂	РИ RI	24	50,00	45	83,33	28	93,33
	↑	24	50,00	1	1,85	1	3,33
	↓		0,00	8	14,81	1	3,33
n ₃	РИ RI	13	27,08	12	22,22	3	10,00
	↑	35	72,92	28	51,85	24	80,00
	↓		0,00	14	25,93	3	10,00
n ₄	РИ RI	8	16,67	18	33,33	1	3,33
	↑	40	83,33	34	62,96	28	93,33
	↓		0,00	2	3,70	1	3,33
n ₅	РИ RI	45	93,75	45	83,33	24	80,00
	↑	3	6,25	2	3,70	1	3,33
	↓		0,00	7	12,96	5	16,67
n ₆	РИ RI	8	16,67	35	64,81	28	93,33
	↑	40	83,33	6	11,11	1	3,33
	↓		0,00	13	24,07	1	3,33
n ₇	РИ RI	48	100,00	37	68,52	28	93,33
	↑		0,00	15	27,78	1	3,33
	↓		0,00	2	3,70	1	3,33
n ₈	РИ RI	9	18,75	36	66,67	15	50,00
	↑	39	81,25	4	7,41	3	10,00
	↓		0,00	14	25,93	12	40,00

ТАБЛИЦА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЦФМ ДЛЯ СОСТОЯНИЯ R₂

TABLE 5. STUDY OF A FLOW CYTOMETRY INDICATORS FOR THE STATE R₂

Показатель Index	Отклонение Deviation	Возрастные диапазоны Age groups											
		0-3				4-9				10-18			
		↓	%	↑	%	↓	%	↑	%	↓	%	↑	%
n ₁	PI RI	1	12,5	7	87,5	17	50,00	17	50		0,00		0
	↑		0		0		0,00		0	38	100,00		0
	↓		0		0		0,00		0		0,00		0
n ₂	PI RI	2	25	6	75	15	44,12	19	55,88	28	73,68	10	26,32
	↑		0		0		0,00		0		0,00		0
	↓		0		0		0,00		0	14	36,84	8	21,05
n ₃	PI RI	3	37,5	5	62,5		0,00		0	25	65,79	13	34,21
	↑		0		0		0,00		0		0,00		0
	↓		0		0	25	73,53	9	26,47		0,00		0
n ₄	PI RI	2	25	6	75		0,00		0	19	50,00	19	50
	↑		0		0	30	88,24	4	11,76		0,00		0
	↓		0		0		0,00		0		0,00		0
n ₅	PI RI	4	50	4	50	17	50,00	17	50		0,00		0
	↑		0		0		0,00		0		0,00		0
	↓		0		0		0,00		0	26	68,42	12	31,58
n ₆	PI RI	1	12,5	7	87,5	18	52,94	16	47,06	12	31,58		0
	↑		0		0		0,00		0		0,00	14	36,84
	↓		0		0		0,00		0	12	31,58		0
n ₇	PI RI	4	50	4	50	30	88,24	4	11,76	29	76,32	9	23,68
	↑		0		0		0,00		0		0,00		0
	↓		0		0		0,00		0		0,00		0
n ₈	PI RI	1	12,5	2	25	16	47,06	18	52,94	13	34,21		0
	↑		0	5	62,5		0,00		0		0,00	11	28,95
	↓		0		0		0,00		0	14	36,84		0

ТАБЛИЦА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЦФМ ДЛЯ СОСТОЯНИЯ R₃

TABLE 6. STUDY OF A FLOW CYTOMETRY INDICATORS FOR THE STATE R₃

Показатель Index	Отклонение Deviation	Возрастные диапазоны Age groups											
		0-3				4-9				10-18			
		↓	%	↑	%	↓	%	↑	%	↓	%	↑	%
n ₁	PI RI	3	60,00	2	40,00	3	50,00	3	50,00		0,00		0,00
	↑		0,00		0,00		0,00		0,00	7	77,78	2	22,22
	↓		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00
n ₂	PI RI	3	60,00	2	40,00	3	50,00	3	50,00	6	66,67	3	33,33
	↑		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00
	↓		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00
n ₃	PI RI	2	40,00	3	60,00	3	50,00	2	33,33	3	33,33	3	33,33
	↑		0,00		0,00		0,00	1	16,67	3	33,33		0,00
	↓		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00
n ₄	PI RI	2	40,00	3	60,00		0,00		0,00	8	88,89	1	11,11
	↑		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00
	↓		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00
n ₅	PI RI	3	60,00	2	40,00	3	50,00	3	50,00	5	55,56	24	266,67
	↑		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00
	↓		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00
n ₆	PI RI	3	60,00	2	40,00		0,00	3	50,00		0,00	3	33,33
	↑		0,00		0,00	2	33,33	1	16,67	6	66,67		0,00
	↓		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00
n ₇	PI RI	3	60,00	2	40,00		0,00		0,00	5	55,56	4	44,44
	↑		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00
	↓		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00
n ₈	PI RI	2	40,00	3	60,00	1	16,67	3	50,00		0,00	2	22,22
	↑		0,00		0,00	2	33,33		0,00		0,00		0,00
	↓		0,00		0,00		0,00		0,00	7	77,78		0,00

ТАБЛИЦА 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЦФМ ДЛЯ СОСТОЯНИЯ R₄

TABLE 7. STUDY OF A FLOW CYTOMETRY INDICATORS FOR THE STATE R₄

Показатель Index	Отклонение Deviation	Возрастные диапазоны Age groups											
		0-3				4-9				10-18			
		↓	%	↑	%	↓	%	↑	%	↓	%	↑	%
n ₁	PI RI	4	50	4	50	2	40,00	1	20	1	20,00	4	80
	↑		0		0	2	40,00		0		0,00		0
	↓		0		0		0,00		0		0,00		0
n ₂	PI RI	4	50	4	50	2	40,00	1	20	1	20,00	4	80
	↑		0		0	2	40,00		0		0,00		0
	↓		0		0		0,00		0		0,00		0
n ₃	PI RI		0		0	1	20,00	2	40	2	40,00	2	40
	↑		0		0		0,00		0	1	20,00		0
	↓		0		0	2	40,00		0		0,00		0
n ₄	PI RI		0		0	4	80,00	1	20	3	60,00	2	40
	↑		0		0		0,00		0		0,00		0
	↓		0		0		0,00		0		0,00		0
n ₅	PI RI	4	50	4	50		0,00		0	1	20,00	4	80
	↑		0		0	2	40,00	1	20		0,00		0
	↓		0		0	1	20,00		0		0,00		0
n ₆	PI RI		0		0	3	60,00	2	40	1	20,00	4	80
	↑	4	50	4	50		0,00		0		0,00		0
	↓		0		0		0,00		0		0,00		0
n ₇	PI RI		0		0	3	60,00	2	40	3	60,00	2	40
	↑		0		0		0,00		0		0,00		0
	↓		0		0		0,00		0		0,00		0
n ₈	PI RI	4	50	4	50	4	80,00	1	20	1	20,00	4	80
	↑		0		0		0,00		0		0,00		0
	↓		0		0		0,00		0		0,00		0

гали превышение свыше 90% у старшей и свыше 80% младшей возрастных групп. По клеткам (CD16⁺CD56⁺) (n₅) особых отклонений выделено не было. NKT-клетки имели превышение до 27% у средней группы. Т-хелперы (n₆) и индекс иммунорегуляции (n₈) имели значительное превышение у младшей возрастной группы. Т-хелперы имели занижение показателя до 25% у средней возрастной группы.

При отклонении иммуноглобулинов А и М – активная стадия болезни (состояние иммунной системы R₂) было обнаружено, что лейкоциты (n₁) были сильно завышены при пониженном уровне иммуноглобулинов у старшей возрастной группы. Лимфоциты (n₂) имели понижение до 40% у старшей группы. Т-лимфоциты (CD3⁺) имели понижение свыше 70% у средней возрастной группы при пониженном уровне иммуноглобулинов. В-лимфоциты (CD19⁺) имели превышение свыше 88% у средней возрастной группы при пониженном уровне иммуноглобулинов. Клетки (CD16⁺CD56⁺) (n₅) также имели понижение до 75% при низком уровне иммуноглобулинов. Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺) (n₆) имели занижение 32% при пониженном уровне и завышение 36% при повышенном уровне иммуноглобулинов у старшей группы. Отклонений NKT – клеток обнаружено не было. Индекс иммунорегуляции (CD4⁺/CD8⁺) (n₈) достиг превышения 62% у младшей возрастной группы и 30% у старшей возрастной группы при превышении уровня иммуноглобулинов. Понижение индекса иммунорегуляции (до 35%) наблюдалось у старшей возрастной группы при пониженном уровне иммуноглобулинов.

При отклонении иммуноглобулинов G и M за границы референтного интервала, пассивная стадия болезни (состояние иммунной системы R₃) было обнаружено, что лейкоциты (n₁) имели большое превышение (свыше 75%) у старшей группы при пониженном уровне иммуноглобулинов. Отклонения у лимфоцитов (n₂) и клеток (CD16⁺CD56⁺) (n₅) не было обнаружено. Т-лимфоциты (CD3⁺) имели повышенное отклонение и старшей возрастной группы при повышенном уровне иммуноглобулинов. Отклонений В-лимфоцитов (CD19⁺) обнаружено не было. Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺) (n₆) имели превышения 35% и 65% у средней и старшей групп при пониженном уровне иммуноглобулинов, а также превышение 15% у средней группы при повышенном уровне иммуноглобулинов. Индекс иммунорегуляции (CD4⁺/CD8⁺) (n₈) имел понижение 75% у старшей группы и повышение 35% у средней воз-

растной группы при пониженном уровне иммуноглобулинов.

При процессе выздоровления пациента (иммуноглобулин IgG вышел за границы референтного интервала) (состояние иммунной системы R₄) было обнаружено, что показания по лейкоцитам и лимфоцитам были идентичны, которые имели превышение до 35% у средней группы при пониженном уровне иммуноглобулинов. Т-лимфоциты (CD3⁺) имели повышенное отклонение у старшей возрастной группы при повышенном уровне иммуноглобулинов и понижение до 40% при пониженном уровне иммуноглобулинов. У В-лимфоцитов (CD19⁺) отклонений не выявлено. Клетки (CD16⁺CD56⁺) (n₅) имели превышение (50%) и понижение уровней (35%) у средней возрастной группы при пониженном уровне иммуноглобулинов. Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺) (n₆) имели превышение у младшей группы при повышенном и пониженном уровне иммуноглобулинов. Отклонений у Индекса иммунорегуляции (CD4⁺/CD8⁺) (n₈) обнаружено не было.

Заключение

Было проведено исследование трансформации иммунной системы детей и подростков в период 2020-2021 годов на примере Пермского края Российской Федерации. Исследование проводилось по трем возрастным группам по 8 показателям проточного цитофотометрического анализа. От взаимного состояния иммуноглобулинов иммунограммы были разбиты на четыре группы, по которым проведено исследование отклонения показателей проточного цитофотометрического анализа.

Результаты исследований показали, что в категории R₁ (при отсутствии отклонений иммуноглобулинов А, М и G от референтного интервала) наибольшие превышения от референтного интервала наблюдались у Т-лимфоцитов (CD3⁺) у старшей и младшей возрастных групп, у В-лимфоцитов (CD19⁺) достигали у старшей и младшей возрастных групп. У младших возрастных групп по Т-хелперам (CD3⁺CD4⁺) и Индексу иммунорегуляции (CD4⁺/CD8⁺), что свидетельствует о гиперактивности иммунитета. У пациентов категории R₂ (находящихся в активной стадии болезни) наблюдалось также наибольшее превышение референтного интервала по лейкоцитам у старшей возрастной группы при пониженном уровне иммуноглобулинов, а также по Индексу иммунорегуляции (CD4⁺/CD8⁺) у млад-

шей возрастной группы при повышенном уровне иммуноглобулинов. Т-лимфоциты (CD3⁺) имели понижение у средней возрастной группы при пониженном уровне иммуноглобулинов. В-лимфоциты (CD19⁺) имели превышение у средней возрастной группы при пониженном уровне иммуноглобулинов. У детей, находящихся в пассивной стадии болезни (R₃), наблюдаются у Индекса иммунорегуляции (CD4⁺/CD8⁺) для старшей возрастной группы при пониженном уровне иммуноглобулинов. Т-лимфоциты (CD3⁺) имели повышенное отклонение у старшей возрастной группы при повышенном уровне иммуноглобулинов. Наибольшие превышения от референтного интервала были обнаружены у старшей возрастной группы по лейкоцитам и Т-хелперам. При состоянии R₄ (процесс выздоровления пациента) общее отклонение основных

показателей иммунограммы уменьшается. В некоторых случаях зафиксировано одновременно превышение и понижение однотипных показателей при одинаковых условиях.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Пермского национального исследовательского политехнического университета в рамках реализации программы деятельности НОЦ мирового уровня «Рациональное недропользование».

Благодарности

Выражается благодарность руководителю отдела продаж Медицинского центра «Философия красоты и здоровья» Оксане Владимировне Комягиной за консультационные услуги и информационную поддержку.

Список литературы / References

1. Ананьина О.С. Значение иммунограммы для определения стадии и завершенности инфекционно-воспалительного процесса // Электронный сборник научных трудов «Здоровье и образование в XXI веке», 2008. Т. 10, № 1. С. 33-34. [Ananyina O.S. The value of the immunogram for determining the stage and completeness of the infectious-inflammatory process. *Elektronnyy sbornik nauchnykh trudov "Zdorovye i obrazovanie v XXI veke"* = *Electronic Collection of Scientific Papers "Health and Education in the XXI Century"*, 2008, Vol. 10, no. 1, pp. 33-34. (In Russ.)]
2. Зуева Е.Е., Русанова Е.Б., Куртова А.В., Рыжак А.П., Горчакова М.В., Галкина О.В. Иммунная система, иммунограмма: рекомендации по назначению и применению в лечебно-диагностическом процессе. СПб. – Тверь: Триада, 2008. 60 с. [Zueva E.E., Rusanova E.B., Kurtova A.V., Ryzhak A.P., Gorchakova M.V., Galkina O.V. Immune system, immunogram: recommendations for the appointment and use in the diagnostic and treatment process]. St. Petersburg –Tver: Triada, 2008. 60 p.
3. Иванова О.Н. Постковидный синдром у детей // Международный научно-исследовательский журнал, 2021. № 9-2 (111). С. 35-39. [Ivanova O.N. Post-covid syndrome in children. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal* = *International Research Journal*, 2021, no. 9-2 (111), pp. 35-39. (In Russ.)]
4. Иванова О.Н., Иванова И.С. Спектр осложнений у пациентов после инфекции SARS-CoV-2 // Наукосфера, 2022. № 11-1. С. 58-63. [Ivanova O.N., Ivanova I.S. Spectrum of complications in patients after SARS-CoV-2 infection. *Naukosfera* = *Science Sphere*, 2022, no. 11-1, pp. 58-63. (In Russ.)]
5. Щербак В.А., Витковский Ю.А., Кузник Б.И. Иммунные нарушения и обоснование их коррекции при хроническом гастродуодените у детей // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 1. С. 59-66. [Shcherbak V.A., Vitkovsky Yu.A., Kuznik B.I. Immune disturbances and substantiation of their correction in the children with chronic gastroduodenitis. *Meditinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 1, pp. 59-66. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-1-59-66.
6. Cai J., Xu J., Lin D., Zhi Y., Lei X., Zhenghai Q., Yuehua Z., Hua Z., Ran J., Pengcheng L., Xiangshi W., Yanling G., Aimei X., He T., Hailing C., Chuning W., Jingjing L., Jianshe W., Mei Z. A case series of children with 2019 novel coronavirus infection: clinical and epidemiological features. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 71, no. 6, pp. 1547-1551.
7. D'Auria E., Calcaterra V., Verduci E., Ghezzi M., Lamberti R., Vizzuso S., Baldassarre P., Pendezza E., Perico V., Bosetti A., Zuccotti G.V. Immunonutrition and SARS-CoV-2 infection in children with obesity. *Nutrients*, 2022, Vol. 14, no. 9, 1701. doi: 10.3390/nu14091701.

8. Kostarev S.N., Kochetova O.V., Tatarnikova N.A., Sereda T.G. Study of the human infectious safety model under the influence of SARS-CoV-2 on the example of the Perm Krai of the Russian Federation. *E3S Web of Conferences*, 2021, Vol. 282, 06005. doi: 10.1051/e3sconf/202128206005.

9. Zare-Zardini H., Alemi A., Taheri-Kafrani A., Ahmad Hosseini S., Soltaninejad H., Hamidieh A.A., Karamallah M.H., Farrokhifar M., Farrokhifar M. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in children: prevalence, diagnosis, clinical symptoms, and treatment. *Int. J. Gen. Med.* 2020, Vol. 13, pp. 477-482.

Авторы:

Костарев С.Н. – д.т.н., профессор кафедры Информационных технологий и автоматизированных систем ФГАОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»; профессор кафедры безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО «Пермский государственный аграрно-технологический университет имени академика Д.Н. Прянишникова»; профессор кафедры зоотехнии ФКОУ ВО «Пермский институт Федеральной службы исполнения наказаний», г. Пермь, Россия

Серeda Т.Г. – д.т.н., профессор кафедры безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО «Пермский государственный аграрно-технологический университет имени академика Д.Н. Прянишникова», г. Пермь, Россия

Authors:

Kostarev S.N., PhD, MD (Technique), Professor, Department of Information Technology and Automated Systems, Perm National Research Polytechnic University; Professor, Department of Life Safety, Perm State Agro-Technological University named after Academician D. Pryanishnikov; Professor, Department of Animal Science, Perm Institute of the Federal Penitentiary Service, Perm, Russian Federation

Sereda T.G., PhD, MD (Technique), Professor, Department of Life Safety, Perm State Agro-Technological University named after Academician D. Pryanishnikov, Perm, Russian Federation

Поступила 26.12.2022
Отправлена на доработку 17.01.2023
Принята к печати 26.05.2023

Received 26.12.2022
Revision received 17.01.2023
Accepted 26.05.2023

МОЖЕТ ЛИ ДИСФУНКЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА РАССМАТРИВАТЬСЯ КАК ПРИЗНАК ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА?

Асфандиярова Н.С.¹, Рубцова М.А.²

¹ ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения РФ, г. Рязань, Россия

² ГБУ РО «Областная клиническая больница», г. Рязань, Россия

Резюме. Цель — изучить ассоциацию пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови после перенесенной коронавирусной инфекции с постковидным синдромом и определить, может ли дисфункция клеточного иммунитета рассматриваться как его признак.

В ретроспективное когортное исследование были включены 242 пациента (56 муж, 186 жен, в возрасте 18-85 лет), перенесшие новую коронавирусную инфекцию; у 180 из них выявлен постковидный синдром, продолжающийся более 3 мес. Больные также были разделены на группы в зависимости от тяжести течения коронавирусной инфекции в острый период (ОРВИ и пневмония) и уровня бласттрансформации лимфоцитов в ответ на ФГА. Исследовали уровень пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на ФГА и активность клеток, синтезирующих циклооксигеназу (ЦОГ) (морфологический метод оценки реакции). Контрольную группу составили 200 практически здоровых лица без признаков коронавирусной инфекции. Все больные прошли анкетирование и были обследованы у врачей различных специальностей, в зависимости от предъявляемых жалоб. Исследовали частоту коморбидной патологии, ассоциированной с иммунодефицитом по клеточному типу.

У пациентов с постковидным синдромом пролиферативная активность лимфоцитов в ответ на ФГА снижена при сравнении с контрольной группой ($p < 0,01$ при ОРВИ и $p < 0,05$ при пневмонии), активность клеток, синтезирующих циклооксигеназу одинакова во всех группах (вне зависимости от наличия постковидного синдрома). Дифференциация больных, в зависимости от наличия дисфункции иммунитета по клеточному типу (РБТЛ в ответ на ФГА $\leq 50\%$), позволила установить более высокую активность клеток, синтезирующих циклооксигеназу, принимающую участие в развитие воспаления и обуславливающую иммунодефицит, что находит свое клиническое проявление в активации герпесвирусной инфекции после перенесенного COVID-19. Активность клеток, синтезирующих ЦОГ, выше при ПКС, развившимся после средне-тяжелой и тяжелой формы новой коронавирусной инфекции, протекающей в виде пневмонии.

Хроническое воспаление при ПКС, ассоциированное с высокой активностью клеток, синтезирующих ЦОГ, обуславливает развитие дисфункции клеточного иммунитета, что является не только причиной развития синдрома, но и является немаловажным его признаком.

Адрес для переписки:

Асфандиярова Наиля Сайфуллаевна
ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения РФ
390026, Россия, г. Рязань, ул. Высоковольтная, 9.
Тел.: 8 (4912) 98-40-67.
Факс: 8 (4912) 44-08-08.
E-mail: n.asfandiyarova2010@yandex.ru

Address for correspondence:

Nailya S. Asfandiyarova
I. Pavlov Ryazan State Medical University
9 Visokovoltmaya St
Ryazan
390026 Russian Federation
Phone: +7 (4912) 98-40-67.
Fax: +7 (4912) 44-08-08.
E-mail: n.asfandiyarova2010@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.С. Асфандиярова, М.А. Рубцова «Может ли дисфункция клеточного иммунитета рассматриваться как признак постковидного синдрома?» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 2. С. 173-180. doi: 10.46235/1028-7221-2067-MBD

© Асфандиярова Н.С., Рубцова М.А., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.S. Asfandiyarova, M.A. Rubtsova "May be dysfunction of cellular immunity considered a sign of post-COVID syndrome?", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 2, pp. 173-180. doi: 10.46235/1028-7221-2067-MBD

© Asfandiyarova N.S., Rubtsova M.A., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-2067-MBD

Отсутствие в списке признаков постковидного синдрома дисфункции клеточного иммунитета, приводит к снижению числа пациентов с постковидным синдромом и ошибочной трактовке полученных результатов.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, постковидный синдром, дисфункция клеточного иммунитета, пролиферативная активность лимфоцитов на ФГА, синтезирующие циклооксигеназу клетки, воспаление

MAY BE DYSFUNCTION OF CELLULAR IMMUNITY CONSIDERED A SIGN OF POST-COVID SYNDROME?

Asfandiyarova N.S.^a, Rubtsova M.A.^b

^a I. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

^b City Clinical Hospital No. 10, Affiliation of Regional Clinical Hospital, Ryazan, Russian Federation

Abstract. Our aim was to study association between proliferative activity of peripheral blood lymphocytes after COVID, and developing post-COVID syndrome, and to determine whether the cell immunity dysfunction may be regarded as its marker.

The retrospective cohort study involved 242 patients (56 males, 186 females, 18 to 85 years old) who contracted new coronavirus infection. Of them, post-COVID syndrome was diagnosed in 180 cases (duration over 3 months). The patients were classified by severity of clinical course of COVID (i.e., presence of acute respiratory disease and pneumonias), and PHA-induced blast transformation of lymphocytes. Along with PHA-induced response, we studied cyclooxygenase (COG)-producing cells by morphological method. Control group consisted of 200 healthy people without any features of coronavirus infection. All patients were questioned and examined by multidisciplinary medical team, dependent on their complaints. We also registered incidence of comorbidities associated with cellular immune deficiency.

The patients with post-COVID syndrome exhibited a decrease of PHA-induced lymphocyte proliferation as compared with control group (significant at $p < 0.01$ in cases of acute respiratory infection, and $p < 0.05$ in patients with pneumonia). Activity of COG-producing cells was similar in all groups, independently on presence of post-COVID syndrome. Classification of patients by presence of cellular immune dysfunction (PHA-induced blast transformation $\leq 50\%$) allowed to detect higher activity of COG-producing cells. This enzyme is known to participate in development of inflammation promoting immune deficiency, thus, probably, manifesting in clinical activation of herpesvirus infection following COVID-19. Activity of COG-synthesizing cells was found to be higher in post-COVID syndrome which evolves after middle-severe and severe forms of new coronavirus infection complicated by pneumonias.

Chronic inflammation in post-COVID syndrome associated with high activity of COG-producing cells may promote dysfunction of cell immunity, thus being a cause of evolving syndrome, like as its biomarker. Absence of the immune cell dysfunction markers among other post-COVID features leads to decreased registration of post-COVID patients and misinterpretation of the results obtained.

Keywords: coronavirus infection, post-COVID syndrome, cellular immunity, dysfunction, PHA-induced lymphocyte proliferation, cyclooxygenase-synthesizing cells, inflammation

Введение

Одной из основных проблем, после перенесенной новой коронавирусной инфекции (coronavirus disease 2019 – COVID-19) остается многоликий постковидный синдром (ПКС), снижающий качество жизни и тяжесть которого обусловлена в первую очередь выраженностью симптомов и количеством признаков его формирующих. Механизм развития ПКС остается неясным и носит многофакторный характер, с

вовлечением множества причин, определяющим клинические проявления. Большинство исследователей полагает, что, помимо продолжающегося эффекта самого коронавируса имеют значения и сами последствия перенесенной вирусной инфекции: развитие, т. н. синдрома хронической усталости. Наряду с генетической предрасположенностью, в развитии ПКС могут играть роль последствия поражения различных органов и систем в острый период (нарушение коагуляции,

дисфункция эндокринных органов, сердечно-сосудистой, нервной, пищеварительной, иммунной систем и пр.) [3, 5, 23]. Не исключена возможность развития аутоиммунных заболеваний, таких как аутоиммунный тиреоидит, ревматоидный артрит, системная красная волчанка [8, 12, 21]. Помимо этого интенсивное лечение, не всегда оправданное (например, использование антибиотиков на первых этапах пандемии), способствующих дисбиозу кишечника и влияющего не только на микробиоту, систему иммунитета, но и на организм в целом, также может способствовать развитию ПКС. Не исключен и вариант, когда вирус элиминируется из организма, но запускает ряд механизмов, способствующих проявлению ПКС.

Особое место, среди факторов патогенеза, участвующих в развитии ПКС занимает система иммунитета, при этом, подчеркивается значимость именно клеточного иммунитета [15]. Установлено, что у пациентов с ПКС отмечается увеличение активности клеток с цитотоксической активностью ($CD8^+$), нарушение функции Т-регуляторных клеток (Treg), увеличение числа Т-хелперов 17 (Th17) [2, 10, 13].

Несмотря на то, что факт развития различных синдромов после коронавирусной инфекции (COVID-19) у ряда пациентов был установлен достаточно быстро, тем не менее остается много нерешенных вопросов, среди которых, важным, с нашей точки зрения остается вопрос, можно ли рассматривать дисфункцию клеточного иммунитета, как признак постковидного синдрома, а не только как важный фактор развития COVID-19 и ПКС в последующем. Множество исследований посвящено вопросу состояния системы иммунитета при COVID-19 [9, 17, 19], однако лишь небольшое количество исследований посвящены изучению иммунной системы при ПКС. При этом они часто носят противоречивый характер и в работе обычно указываются сроки исследования без ссылки на факт наличия постковидного синдрома [14, 19]. Это и определило основную **цель настоящего исследования** – изучить ассоциацию пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови после перенесенной коронавирусной инфекции с постковидным синдромом, и определить, может ли дисфункция клеточного иммунитета рассматриваться как его признак.

Материалы и методы

Согласно поставленной задаче, в ретроспективное когортное исследование были включены 242 пациента (из них 56 мужчин, 186 женщин в возрасте 18-85 лет), перенесшие новую коронавирусную инфекцию; 180 из них предъявляли

различные жалобы, которые продолжались более 3 мес. после перенесенного заболевания и которые, согласно критериям ВОЗ [6], были включены в группу пациентов с ПКС. Все больные дали добровольное согласие на проведение исследования, прошли анкетирование и были обследованы у врачей различных специальностей, включая и врача аллерголога-иммунолога, в зависимости от предъявляемых жалоб. Диагноз заболеваний устанавливался в соответствии критериям национальных рекомендаций.

Диагноз коронавирусной инфекции подтверждался идентификацией коронавируса с помощью полимеразной цепной реакции и/или антител класса IgM к нему в острый период заболевания (у большинства больных) или выявлением антител класса IgG в период реконвалесценции (без профилактических прививок от коронавирусной инфекции).

Состояние клеточного иммунитета оценивалось с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) периферической крови в ответ на неспецифический митоген фитогемагглютинин П (морфологический метод оценки реакции). Для определения функциональной активности клеток, синтезирующих циклооксигеназу (КС ЦОГ), к фитогемагглютинину П (ФГА) добавлялся индометацин, являющийся ингибитором синтеза ЦОГ, принимающей участие в развитии воспаления. Контролем служила культура клеток с ФГА без добавления индометацина. Также нами обследована группа практически здоровых лиц (N 200) без наличия РНК коронавируса и антител к нему. Пролиферативная активность лимфоцитов в ответ на ФГА у последних была в пределах 50-80% ($56,6 \pm 14,4\%$), а индекс стимуляции (соотношение числа бластных и переходных клеток в ответ на ФГА + индометацин / + ФГА), характеризующих активность КС ЦОГ колебался в пределах $1,0 \pm 0,1$.

У больных анализировалась частота коморбидной патологии, ассоциированная с иммунодефицитом по клеточному типу: герпесвирусная инфекция (вирус простого герпеса 1, 2 и 4 серотипов), онкологические заболевания, аутоиммунные заболевания.

Дизайн исследования

В зависимости от наличия признаков ПКС больные были разделены на 2 группы: ПКС+ 180 пациентов (89 из них перенесли COVID-19 в легкой форме в виде острой респираторной инфекции и 91 пациент, перенесли заболевание в средне-тяжелой или тяжелой форме в виде пневмонии) и без проявлений ПКС 62 пациента (46 из них перенесли COVID-19 в легкой форме в виде острой респираторной инфекции и 16 пациентов перенесли заболевание в средне-тяжелой или

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ БОЛЬНЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ НОВУЮ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА

TABLE 1. INDICATORS OF PATIENTS WHO HAVE UNDERGONE A NEW CORONAVIRUS INFECTION, DEPENDING ON THE PRESENCE OF POST-COVID SYNDROME (PCS)

Постковидный синдром post-COVID syndrome	Пациенты, перенесшие COVID-19 в легкой форме Patients with mild COVID-19 in past		Пациенты, перенесшие COVID-19 в среднетяжелой и тяжелой форме Patients with moderate or severe COVID-19 in past	
	ПКС+ PCS+	ПКС- PCS-	ПКС+ PCS+	ПКС- PCS-
N	89	46	91	16
Возраст, лет Age, years	48,3±15,3	46,0±15,8	56,8±12,9**	43,7±16,2
Муж. Male	15,7%**	39,1%	19,8%	37,5%
РБТЛ на ФГА (%) LBTT on PHA (%)	50,4±10,1*	53,7±8,2	52,2±9,2*	43,6±10,3
Индекс стимуляции КС ЦОГ Stimulation index of CS COX	1,1±0,2	1,0±0,1	1,1±0,2	1,1±0,2
Коморбидная патология, ассоциированная с иммунодефицитом по клеточному типу Comorbid pathology associated with immunodeficiency by cell type	41,6%*	23,9%	35,2%*	68,8%

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ при сравнении с пациентами без постковидного синдрома. КС ЦОГ – клетки, синтезирующие циклооксигеназу; ПКС – постковидный синдром; РБТЛ – реакция бласттрансформации лимфоцитов.

Note. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ when compared with patients without post-COVID syndrome. CS COX, cells that synthesize cyclooxygenase; PCS, post-COVID syndrome (long covid); LBTT, lymphocyte blast transformation test.

тяжелой форме в виде пневмонии). Различий по полу и возрасту внутри групп не было (табл. 1).

Пациенты каждой из групп также были разделены на 2 подгруппы: с РБТЛ на ФГА $\leq 50\%$ и РБТЛ на ФГА $> 50\%$.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Statistica 8.0. Различия в группах считались достоверными при уровне значимости менее 5% ($p < 0,05$). Результаты исследования представлены в виде их средних значений \pm среднеквадратичное отклонение.

Результаты

Результаты проведенных исследований представлены в таблицах 1, 2, 3.

Пролиферативная активность лимфоцитов в ответ на ФГА у пациентов с ПКС после перенесенной коронавирусной инфекции в легкой форме была ниже, чем при отсутствии признаков ПКС, в отличие от аналогичной группы пациентов, перенесших пневмонию и без признаков ПКС, у которых отмечалось снижение уровня бласттрансформации клеток. Именно в груп-

пе больных без ПКС с признаками дисфункции клеточного типа, перенесших пневмонию, отмечались клинические признаки активации герпесвирусной инфекции.

Функциональная активность клеток, синтезирующих циклооксигеназу не зависит ни от тяжести перенесенной коронавирусной инфекции в острый период, ни от наличия ПКС. Однако, если провести дифференциацию исследуемых групп в зависимости от уровня пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на ФГА, то можно отметить, что пациенты с дисфункцией клеточного иммунитета (РБТЛ на ФГА $\leq 50\%$) как с признаками ПКС, так и без него имеют более высокую активность КС ЦОГ, о чем свидетельствуют более высокие показатели индекса стимуляции; и встречаются они значительно чаще (табл. 2, 3). Это указывает на более выраженное воспаление у пациентов, при этом после пневмонии эти показатели выше.

Обсуждение

Анализ результатов проведенных исследований свидетельствует, что у пациентов, перенес-

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ В ОТВЕТ НА ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИН

TABLE 2. INDICATORS OF PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME DEPENDING ON THE LEVEL OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF LYMPHOCYTES IN RESPONSE TO PHYTOHEMAGGLUTININ

	Пациенты, перенесшие COVID-19 в легкой форме Patients with mild COVID-19 in past		Пациенты, перенесшие COVID-19 в среднетяжелой и тяжелой форме Patients with moderate or severe COVID-19 in past	
	≤ 50%	> 50%	≤ 50%	> 50%
РБТЛ на ФГА (%) LBTT on PHA (%)	≤ 50%	> 50%	≤ 50%	> 50%
Индекс стимуляции КС ЦОГ Stimulation index of CS COX	1,2±0,2*	1,0±0,1	1,3±0,2**	1,0±0,1
Частота встречаемости индекса стимуляции КС ЦОГ ≥ 1,2 Frequency of occurrence of the CS COX index of stimulation ≥ 1.2	56,4%***	14,3%	68,2%***	10,3%

Примечание. * – $p < 0,05$ при сравнении с пациентами с РБТЛ на ФГА > 50%; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$. КС ЦОГ – клетки, синтезирующие циклооксигеназу; РБТЛ – реакция бласттрансформации лимфоцитов.

Note. *, $p < 0.05$ when compared with patients with LBTT on PHA > 50%; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. CS COX, cells that synthesize cyclooxygenase; LBTT, lymphocyte blast transformation test.

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ ПАЦИЕНТОВ БЕЗ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ В ОТВЕТ НА ФГА

TABLE 3. INDICATORS OF PATIENTS WITHOUT POST-COVID SYNDROME DEPENDING ON THE LEVEL OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF LYMPHOCYTES IN RESPONSE TO PHYTOHEMAGGLUTININ

	Пациенты, перенесшие COVID-19 в легкой форме Patients with mild COVID-19 in past		Пациенты, перенесшие COVID-19 в среднетяжелой и тяжелой форме Patients with moderate or severe COVID-19 in past	
	≤ 50%	> 50%	≤ 50%	> 50%
РБТЛ на ФГА (%) LBTT on PHA (%)	≤ 50%	> 50%	≤ 50%	> 50%
Индекс стимуляции КС ЦОГ Stimulation index of CS COX	1,2±0,2**	1,0±0,1	1,3±0,2**	1,0±0,1
Частота встречаемости индекса стимуляции ≥ 1,2 Frequency of occurrence of the CS COX index of stimulation ≥ 1.2	7/15**	2/31	9/11*	0/4

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ших легкую форму коронавирусной инфекции в острый период и развитием ПКС отмечается снижение пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на ФГА. У пациентов с показателями РБТЛ в ответ на ФГА ≤ 50% выявляется более высокая активность КС ЦОГ, принимающих участие в развитии воспаления. Именно у этих пациентов чаще наблюдается и активация герпесвирусной инфекции.

Таким образом, после легкого течения COVID-19 в острый период ПКС ассоциируется

с дисфункцией клеточного иммунитета, проявляющейся в снижении пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на неспецифический митоген, что, видимо, обусловлено повышением активности клеток, синтезирующих ЦОГ, и не только определяет развитие ПКС, но и является его признаком. Возможно, пациенты с дисфункцией клеточного иммунитета попали в группу пациентов без признаков последствий COVID-19 ошибочно, ввиду отсутствия в списке признаков ПКС иммунодефицита по клеточному типу, след-

ствием которого явилась активация герпесвирусной инфекции, после перенесенного COVID-19.

Анализ результатов проведенных исследований свидетельствует, что у пациентов, перенесших средне-тяжелую или тяжелую форму коронавирусной инфекции в острый период и развитие ПКС, также отмечается снижение пролиферативной активности лимфоцитов при сравнении с практически здоровыми лицами ($p < 0,01$), однако, как ни парадоксально, у пациентов без ПКС, пролиферативная активность еще ниже. Возникает вопрос: в чем же причина этого парадокса? Лишь дифференциация пациентов в зависимости от наличия дисфункции клеточного иммунитета позволяет установить, что у большинства пациентов группы без признаков ПКС (РБТЛ в ответ на ФГА $\leq 50\%$) выявляется высокая активность КС ЦОГ (табл. 3) и клинические признаки герпесвирусной инфекции, активизирующейся после COVID-19, свидетельствующих о дисфункции клеточного иммунитета. При этом у пациентов с показателями РБТЛ в ответ на ФГА $> 50\%$ функциональная активность КС ЦОГ в пределах показателей здоровых лиц. Возможно, что больные с дисфункцией клеточного иммунитета в группу пациентов без ПКС были включены ошибочно, так как в список проявлений ПКС не был включен такой важный признак, как дисфункция клеточного иммунитета, а именно снижение пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на неспецифический митоген, или его клинических проявлений в виде герпесвирусной инфекции.

Большинство исследователей, занимающихся проблемами COVID-19 и признающих значимость состояния системы иммунитета в развитии заболевания, к проявлениям ПКС относят: общую слабость, снижение работоспособности, когнитивные нарушения, бессонницу, депрессию, аносмию, дисгевзию, артралгии, миалгии, боль в груди, одышку, кашель и др. [4, 11, 16, 18, 20], однако не включают в список признаков дисфункцию клеточного иммунитета. Безусловно, при проведении клинических исследований, определенные трудности вызывает получение информации о состоянии клеточного иммунитета. Однако клиническим проявлением дисфункции клеточного иммунитета является герпесвирусная инфекция [1], которая может быть выявлена и при клиническом обследовании.

Таким образом, мы полагаем, что в патогенезе ПКС важная роль принадлежит дисфункции клеточного иммунитета, взаимосвязанная с продолжающимся хроническим воспалением и проявляющаяся в снижении пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на ФГА и высокой активностью клеток, синтезирующих циклооксигеназу. Мы согласны с точкой зрения Shin

Jie Yong [23], который полагает, что ПКС это следствие продолжающегося хронического воспаления, индуцированное коронавирусом, дисбиозом к-ка, дисрегуляцией иммунной системы. Однако на вопрос Апауа J. и соавт. [7] является ли ПКС аутоиммунным заболеванием отвечаем отрицательно, так как считаем, что COVID-19 — это системное заболевание, характеризующееся поражением многих органов и систем. И аутоиммунные изменения могут быть как вторичным проявлением деструкции тканей организма, так и следствием дисфункции клеточного иммунитета.

Заключение

Исследование пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на ФГА, в зависимости от наличия ПКС, позволило установить снижение их функции, что может свидетельствовать о значимости этого явления в патогенезе развития синдрома. Отсутствие в списке признаков ПКС дисфункции клеточного иммунитета приводит к снижению числа пациентов с ним и ошибочной трактовке полученных результатов. Дифференциация больных в зависимости от наличия дисфункции иммунитета по клеточному типу (РБТЛ в ответ на ФГА $\leq 50\%$) позволила установить более высокую активность клеток, синтезирующих циклооксигеназу, принимающую участие в развитии воспаления и обуславливающую иммунодефицит, что находит свое клиническое проявление в активации герпесвирусной инфекции после перенесенного COVID-19. Активность клеток, синтезирующих ЦОГ выше при ПКС, развившимся после средне-тяжелой и тяжелой формы новой коронавирусной инфекции, протекающей в виде пневмонии.

Таким образом, хроническое воспаление при ПКС, ассоциированное с высокой активностью клеток, синтезирующих ЦОГ, обуславливает развитие дисфункции клеточного иммунитета, что является не только причиной развития синдрома, но и немаловажным его признаком.

Финансирование

Тема НИР была утверждена 8.04.2021 на заседании научно-планового совета РязГМУ (Протокол № 8).

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол № 9, от 05.04.2021 г.).

Список литературы / References

1. Викулов Г.Х. Иммунологические аспекты герпес-вирусных инфекций // Клиническая дерматология и венерология, 2015. Т. 14, № 5. С. 104-114. [Vikulov G.Kh. Immunological aspects of herpesvirus infections. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya = Clinical Dermatology and Venereology*, 2015, Vol. 14, no. 5, pp. 104-114. (In Russ.)]
2. Глазанова Т.В., Шилова Е.Р. Нарушения в системе иммунитета после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 // Журнал инфектологии, 2022. Т. 14, № 4. С. 26-37. [Glazanova T.V., Shilova E.R. Immune system disturbances after a new coronavirus infection COVID-19. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2022, Vol. 14, no. 4, pp. 26-37. (In Russ.)]
3. Добин В.Л., Горбунов А.В., Муратов Е.Н. Клиническое наблюдение необычного течения коронавирусной инфекции у больного с хроническим диссеминированным туберкулезом легких и ВИЧ // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова, 2021. Т. 29, № 4. С. 539-543. [Dobin V.L., Gorbunov A.V., Muratov E.N. Clinical case of an unusual course of coronavirus infection in patient with chronic disseminated pulmonary tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik im. akad. I.P. Pavlova = I. Pavlov Russian Medical Biological Herald*, 2021, Vol. 29, no. 4, pp. 539-543. (In Russ.)]
4. Доценко Э.А., Доценко М.Л. Постковидный синдром // Рецепт, 2021. Т. 24, № 4, Ч. 2. С. 5-21. [Dotsenko E.A., Dotsenko M.L. Post-COVID syndrome. *Retsept = Recipe*, 2021, Vol. 24, no. 4, pp. 5-21. (In Russ.)]
5. Любавин А.В., Котляров С.Н. Особенности течения острого коронарного синдрома у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 // Наука молодых (Eruditio Juvenium), 2022. Т. 10, № 1. С.101-112. [Lyubavin A.V., Kotlyarov S.N. Peculiarities of the course of acute coronary syndrome in patients with new coronavirus infection. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium) = Science of the Young (Eruditio Juvenium)*, 2022, Vol. 10, no. 1, pp. 101-112. (In Russ.)]
6. A clinical case definition of post COVID-19 condition by a Delphi consensus, 6 October 2021". www.who.int. Archived from the original on 2022-04-23. Retrieved 2022-01-07. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Post_COVID-19_condition-Clinical_case_definition-2021.1.
7. Anaya J., Herrán M., Beltrán S., Rojas M. Is post-COVID syndrome an autoimmune disease? *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2022, Vol. 18, no. 7, pp. 653-666.
8. Ehrenfeld M., Tincani A., Andreoli L., Cattalini M., Greenbaum A., Kanduc D., Alijotas-Reig J., Zinserling V., Semenova N., Amital H., Shoenfeld Y. Covid-19 and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2020, Vol. 19, no. 8, 102597. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102597.
9. Guihot A., Litvinova E., Autran B., Debré P., Vieillard V. Cell-mediated immune responses to COVID-19 Infection. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1662. doi: 10.3389/fimmu.2020.01662.
10. Haunhorst S., Bloch W., Javelle F., Krüger K., Baumgart S., Drube S., Lemhöfer C., Reuken P., Stallmach A., Müller M., Zielinski C.E., Pletz M.W., Gabriel H.H.W., Puta C. A scoping review of regulatory T cell dynamics in convalescent COVID-19 patients – indications for their potential involvement in the development of Long COVID? *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1070994. doi: 10.3389/fimmu.2022.1070994.
11. Huang C., Huang L., Wang Y., Li X., Ren L., Gu X., Kang L., Guo L., Liu M., Zhou X., Luo J., Huang Z., Tu S., Zhao Y., Chen L., Xu D., Li Y., Li C., Peng L., Li Y., Xie W., Cui D., Shang L., Fan G., Xu J., Wang G., Wang Y., Zhong J., Wang C., Wang J., Zhang D., Cao B. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10270, pp 220-232.
12. Lui D.T.W., Lee C.H., Chow W.S., Lee A.C.H., Tam A.R., Fong C.H.Y., Law C.Y., Leung E.K.H., To K.K.W., Tan K.C.B., Woo Y.C., Lam C.W., Hung I.F.N., Lam K.S.L. Thyroid dysfunction in relation to immune profile, disease status, and outcome in 191 Patients with COVID-19. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2021, Vol. 106, no. 2, pp. e926-e935.
13. Maamari K.A., Busaidi I.A., Kindi M.A., Zadjali F., BaAlawi F., Anesta W., Amri K.A., Albalushi W., Balushi H.A., Amri A.A., Aljufaili M., Al-Busaidi M., Muharrmi Z.A., Balkhair A., Riyami N.A., Ghanim Z., Alshekaili J. Short and long-term immune changes in different severity groups of COVID-19 disease. *Int. J. Infect. Dis.*, 2022, Vol. 122, pp. 776-784.
14. Mitsuyama Y., Yamakawa K., Fujimi S. Residual persistence of cytotoxicity lymphocytes and regulatory T cells in patients with severe coronavirus disease 2019 over a 1-year recovery process. *Acute Med. Surg.*, 2022, Vol. 9, no. 1, e803. doi: 10.1002/ams2.803.
15. Montes N., Doménech È., Guerrero S., Oliván-Blázquez B., Magallón-Botaya R. Analysis of cell-mediated immunity in people with long COVID. *medRxiv*, 202106.09.21258553. doi: 10.1101/2021.06.09.21258553.
16. National Institute for Health and Care Excellence. COVID-19 rapid guideline: managing the long-term effects of COVID-19. 2020. Available at: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng188>.
17. Ni L., Cheng M.-L., Feng Y., Zhao H., Liu J., Ye F., Ye Q., Zhu G., Li X., Wang P., Shao J., Deng Y.-Q., Wei P., Chen F., Qin C.-F., Wang G., Li F., Zeng H., Dong C. Impaired Cellular Immunity to SARS-CoV-2 in Severe COVID-19 Patients. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 603563. doi: 10.3389/fimmu.2021.603563.
18. Pavli A., Theodoridou M., Maltezou HC. Post-COVID syndrome: Incidence, clinical spectrum, and challenges for primary healthcare professionals. *Arch. Med. Res.*, 2021, Vol. 52, no. 6, pp. 575-581.

19. Shuwa H.A., Shaw T.N., Knight S.B., Wemyss K., McClure F.A., Pearmain L., Prise I., Jagger C., Morgan D.J., Khan S., Brand O., Mann E.R., Ustianowski A., Bakerly N.D., Dark P., Brightling C.E., Brij S., CIRCO, Felton T., Simpson A., Grainger J.R., Hussel T., Konkel J.E., Menon M. Alterations in T and B cell function persist in convalescent COVID-19 patients. *Med*, 2021, Vol. 2, no 6, pp 720-735.
20. Sudre C.H., Murray B., Varsavsky T., Graham M.S., Penfold R.S., Bowyer R.C., Pujol J.C., Klaser K., Antonelli M., Canas L.S., Molteni E., Modat M., Jorge Cardoso M., May A., Ganesh S., Davies R., Nguyen L.H., Drew D.A., Astley C.M., Joshi A.D., Merino J., Tsereteli N., Fall T., Gomez M.F., Duncan E.L., Menni C., Williams F.M.K., Franks P.W., Chan A.T., Wolf J., Ourselin S., Spector T., Steves C.J. Attributes and predictors of long COVID. *Nat. Med.*, 2021, Vol. 27, no. 4, pp. 626-631.
21. Vlachoyiannopoulos P.G., Magira E., Alexopoulos H., Jahaj E., Theophilopoulou K., Kotanidou A., Tzioufas A.G. Autoantibodies related to systemic autoimmune rheumatic diseases in severely ill patients with COVID-19. *Ann. Rheum. Dis.*, 2020, Vol. 79, no. 12, pp. 1661-1663.
22. Willi S., Lüthold R., Hunt A., Hänggi N.V., Sejdiu D., Scaff C., Bender N., Staub K., Schlagenhauf P. COVID-19 sequelae in adults aged less than 50 years: a systematic review. *Travel Med. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 40, 101995. doi: 10.1016/j.tmaid.2021.101995.
23. Yong S.J. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. *Infect. Dis. (Lond.)*, 2021, Vol. 53, no. 10, pp. 737-754.

Авторы:

Асфандиярова Н.С. — д.м.н., старший научный сотрудник, доцент ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, г. Рязань, Россия

Рубцова М.А. — заведующая лечебно-диагностическим отделением, подразделение ГКБ № 10 ГБУ РО «Областная клиническая больница», г. Рязань, Россия

Authors:

Asfandiyarova N.S., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Associate Professor, I. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

Rubtsova M.A., Head, Medical and Diagnostic Department, City Clinical Hospital No. 10, Affiliation of Regional Clinical Hospital, Ryazan, Russian Federation

Поступила 06.02.2023
Принята к печати 26.05.2023

Received 06.02.2023
Accepted 26.05.2023

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ: ПРОЦЕССЫ, МОДЕЛИ И УСВОЕНИЕ ДАННЫХ

Гребенников Д.С., Желткова В.В., Савинков Р.С.,
Бочаров Г.А.

ФГБУН «Институт вычислительной математики имени Г.И. Марчука» Российской академии наук, Москва, Россия

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

Резюме. Иммунная система представляет собой многомасштабный мультифизический объект, изучение закономерностей функционирования которого, в рамках системного подхода, предполагает активное использование математического моделирования. Разработка математических моделей иммунологических процессов требует решения следующих задач: построение системы уравнений, выбор содержательного критерия близости модели и данных наблюдений, идентификация и оценка неопределенности параметров, выбор оптимальной модели. В данной работе излагаются перспективные подходы, связанные с моделированием нового класса мультифизических процессов иммунной системы: миграция клеток в лимфатических узлах, лимфодинамика, гомеостатическая регуляция иммунного ответа при хронических инфекциях.

Для описания пространственно-временной динамики иммунного ответа в лимфатических узлах (ЛУ), построена математическая модель движения лимфоцитов на основе II закона Ньютона, в которой учтено действие трех видов сил. Для калибровки модели использованы эмпирические распределения трех характеристик движения лимфоцитов в ЛУ. В качестве критерия согласия между данными и предсказаниями модели использовалось расстояние Колмогорова–Смирнова между соответствующей эмпирической и модельной функциями распределения.

Предсказание характеристик течения лимфы в ЛУ с учетом разнообразия размеров, форм, структур внутренней организации ЛУ и граничных условий, является вычислительно затратным процессом. Предложен подход к моделированию лимфотока в ЛУ с замещением полноценной расчетной физической модели на искусственную нейронную сеть, обученную на наборе заранее сформированных результатов вычислений исходной модели. Использование нейронной сети позволяет на 4 порядка уменьшить время расчета некоторых характеристик ЛУ.

Проведена калибровка модели противовирусного иммунного ответа Марчука–Петрова при инфекции SARS-CoV-2. Для калибровки использовались опубликованные данные кинетики вирусной

Адрес для переписки:

Желткова Валерия Валерьевна
ФГБУН «Институт вычислительной математики
имени Г.И. Марчука» Российской академии наук
119333, Россия, Москва, ул. Губкина, 8.
Тел.: 8 (495) 989-80-24.
Факс: 8 (495) 989-80-23.
E-mail: zheltkova_v_v@staff.sechenov.ru

Address for correspondence:

Valeriya V. Zheltkova
G. Marchuk Institute of Numerical Mathematics,
Russian Academy of Sciences
8 Gubkin St
Moscow
119333 Russian Federation
Phone: 7 (495) 989-80-24.
Fax: 7 (495) 989-80-23.
E-mail: zheltkova_v_v@staff.sechenov.ru

Образец цитирования:

Д.С. Гребенников, В.В. Желткова, Р.С. Савинков,
Г.А. Бочаров «Математическая иммунология:
процессы, модели и усвоение данных» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 2. С. 181–188.
doi: 10.46235/1028-7221-1210-MIP

© Гребенников Д.С. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.S. Grebennikov, V.V. Zheltkova, R.S. Savinkov,
G.A. Bocharov “Mathematical immunology: processes, models
and data assimilation”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 2,
pp. 181–188.
doi: 10.46235/1028-7221-1210-MIP

© Grebennikov D.S. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-1210-MIP

нагрузки в носоглотке инфицированных добровольцев и данные о диапазоне значений концентрации интерферона, антител и цитотоксических лимфоцитов в крови. Определены параметры, оказывающие наибольшее влияние на разные стадии развития инфекции.

Отличительным признаком хронических вирусных инфекций и онкологических заболеваний являются нарушения работы иммунных механизмов, в частности истощение Т-лимфоцитов. Предложена модель для исследования параметров регуляции 4 субпопуляций истощенных Т-лимфоцитов, баланс деления и дифференцировки которых поддерживается за счет взаимодействия с дендритными клетками SIRPα⁺ PD-L1⁺ DC и XCR⁺1 DC. Оценены параметры модели для исследования влияния терапии (например, aPD-L1) на процессы поддержания гомеостаза истощенных клеток.

Ключевые слова: математическая иммунология, усвоение данных, обратные задачи, миграция клеток, противовирусный иммунный ответ, лимфодинамика, Т-клеточный гомеостаз

MATHEMATICAL IMMUNOLOGY: PROCESSES, MODELS AND DATA ASSIMILATION

Grebennikov D.S., Zheltkova V.V., Savinkov R.S., Bocharov G.A.

*G. Marchuk Institute of Numerical Mathematics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation*

Abstract. The immune system is a complex multiscale multiphysical object. Understanding its functioning in the frame of systemic analysis implies the use of mathematical modelling, formulation of data consistency criterion, estimation of parameters, uncertainty analysis, and optimal model selection. In this work, we present some promising approaches to modelling the multi-physics immune processes, i.e., cell migration in lymph nodes (LN), lymph flow, homeostatic regulation of immune responses in chronic infections.

To describe the spatial-temporal dynamics of immune responses in lymph LN, we propose a model of lymphocyte migration, based on the second Newton's law and considering three kinds of forces. The empirical distributions of three lymphocytes motility characteristics were used for model calibration using the Kolmogorov–Smirnov metric.

Prediction of lymph flow in a lymph node requires costly computations, due to diversity of sizes, forms, inner structure of LNs and boundary conditions. We proposed an approach to lymph flow modelling based on replacing the full-fledged computational physics-based model with an artificial neural network (ANN), trained on the set of pre-formed results computed using an initial mechanistic model. The ANN-based model reduces the computational time for some lymph flow characteristics by four orders of magnitude.

Calibration of Marchuk–Petrov model of antiviral immune response for SARS-CoV-2 infection was performed. To this end, we used previously published data on the viral load kinetics in nasopharynx of volunteers, and data on the observed ranges of interferon, antibodies and CTLs in the blood. The parameters, which have the most significant impact at different stages of infection process, were identified.

Inhibition of immune mechanisms, e.g., T cell exhaustion, is a distinctive feature of chronic viral infections and malignant diseases. We propose a mathematical model for the studies of regulation parameters of four exhausted T cell subsets in order to examine the balance of their proliferation and differentiation determined by interaction with SIRPα⁺ PD-L1⁺ and XCR⁺1 dendritic cells. The model parameters are evaluated, in order to study the reinvigoration effect of aPD-L1 therapy on the homeostasis of exhausted cells.

Keywords: mathematical immunology, data assimilation, inverse problems, cell migration, antiviral immune response, lymphodynamics, T cell homeostasis

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 18-11-00171, <https://rscf.ru/project/18-11-00171/>.

Введение

Иммунная система представляет собой сложный многомасштабный и мультифизический

объект, изучение закономерностей функционирования которого, в рамках системного подхода, предполагает активное использование методов математического моделирования. Разработка математических моделей иммунологических процессов связана с решением следующих задач: (1) построение системы уравнений, (2) выбор

содержательного критерия близости модели и данных наблюдений, (3) идентификация параметров и оценка неопределенности параметров, (4) выбор оптимальной модели и (5) исследование локальной и глобальной чувствительности. В данной работе излагаются перспективные подходы в этой области, связанные с моделированием нового класса мультифизических процессов иммунной системы: миграция клеток в лимфатических узлах, лимфодинамика, гомеостатическая регуляция иммунного ответа при хронических инфекциях. В силу различия природы данных процессов, для их описания применяются различные классы математических моделей, при построении которых используются системы обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ), стохастических дифференциальных уравнений (СДУ), клеточные автоматы (КА) и нейронные сети (НС). Активное использование данных технологий моделирования позволит существенно расширить спектр вычислительных инструментов для решения задач моделирования и анализа системной иммунологии.

Материалы и методы

Разработка математической модели основана на выделении механизменно-значимых компонент иммунных процессов (переменные пространства состояний системы), формирования причинно-следственных взаимоотношений между ними в виде биологической схемы взаимодействий и переходов между состояниями [3]. Преобразование схемы в систему уравнений математической модели характеризуется множественностью возможных реализаций, и желательно сузить класс возможных решений. Наличие экспериментальных и клинических данных существенно влияет на объективизацию этого перехода, позволяя найти оптимальный баланс между сложностью модели и информационным содержанием блока эмпирических данных, которые необходимо описать или усвоить с помощью модели. Усвоение данных наблюдений в математической модели относится к процедуре идентификации или решения обратной задачи. Задачи идентификации делятся на коэффициентные обратные задачи, когда параметры модели определяются по значениям переменных, и проблемы структурной идентификации, каждая из которых реализуется в рамках определенной методологии.

Метод максимального правдоподобия (ММП)

Основной подход к идентификации параметров математических моделей заключается в формировании количественного критерия

(функция правдоподобия) согласия (невязки) между решениями модели и данными наблюдений, например, в виде метода наименьших квадратов. При этом вид вектор-функции или функционала согласия должен определяться с учетом характера ошибок наблюдений (нормальность, лог-нормальность и др.). В последнем случае мы приходим к методу максимального правдоподобия. Однако обратные задачи отличаются неустойчивостью, когда небольшие изменения данных приводят к большим изменениям оценок параметров. В этом случае важной становится возможность привлечения дополнительной информации [1].

Байесовский метод (БП)

В отличие от ММП, в рамках которого неизвестный параметр считается детерминированной величиной, в Байесовском подходе искомый параметр модели считается случайной величиной с некоторым законом распределения. При этом для нахождения Байесовской оценки используется дополнительная априорная информация. Сочетание априорной информации о параметрах и информации о данных наблюдений позволяет получить апостериорную оценку их закона распределения.

Матрица Фишера

Информационная матрица Фишера, представляющая собой дисперсию чувствительности функции правдоподобия модели к вариации ее параметров, может использоваться для построения доверительных интервалов параметров, т. е. для оценки степени неопределенности полученных в рамках ММП точечных оценок. Также матрица Фишера применяется в БМ для построения априорных распределений параметров модели, инвариантных по отношению к репараметризации модели [6].

Критерии сложности моделей

Использование ММП или БП предполагает фиксированную структуру модели, т. е. способ параметризации в виде уравнений описываемых моделью процессов. В случае наличия разных гипотез о свойствах процессов иммунной системы можно сформировать множество соответствующих им моделей. Для выбора оптимальной по степени сложности модели существуют информационные критерии, такие как критерий Акаике и критерий минимальной длины описания. Оптимальной моделью является наиболее простая по сложности модель, которая тем не менее обладает хорошей степенью согласия с экспериментальными данными. Для использования критерия минимальной длины описания требуется вычисление матрицы Фишера [6].

Результаты и обсуждение

Миграция клеток – многокритериальный подход

Для описания пространственно-временной динамики развития иммунного ответа в лимфатических узлах (ЛУ), требуется построение математических моделей подвижности и миграции клеток. В работе [4] была реализована и откалибрована математическая модель движения лимфоцитов на основе II закона Ньютона. На каждую клетку действуют три вида сил: (1) стохастическая сила активной подвижности клетки, неявно описывающая взаимодействия с ретикулярными структурами лимфоидной ткани, (2) силы специфических и неспецифических взаимодействий с другими клетками, параметризованная сила адгезии между мембранами клеток, (3) диссипативная сила трения в вязкой среде, пропорциональная значению мгновенной скорости клетки. Для калибровки модели необходимо выбрать критерий согласия с экспериментальными данными. Для описания траекторий клеток были использованы доступные в литературе эмпирические распределения трех характеристик движения лимфоцитов в ЛУ: поступательных скоростей клеток, скоростей углов поворота клеток, индек-

сов меандрирования клеток (рис. 1). Для набора статистики значения характеристик рассчитывались раз в 30 секунд в течение продолжительного времени (5 часов). Для оценки степени отклонения между экспериментальными и предсказанными моделью характеристиками использовалось расстояние Колмогорова–Смирнова между соответствующими эмпирическими функциями распределений.

Таким образом, задача оценки параметров модели представляет собой задачу многокритериальной оптимизации – минимизации отклонения для трех распределений. Использование распределений трех различных характеристик движения клеток позволило провести калибровку модели в отсутствие данных измерений отдельных траекторий клеток.

Лимфоток через ЛУ – обучение нейронной сети

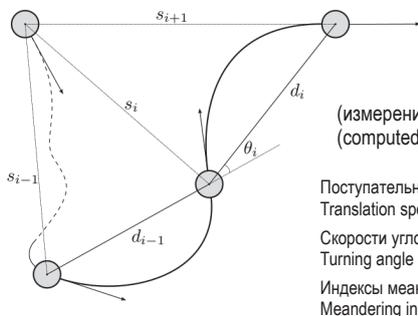
Расчет задачи течения лимфы в ЛУ является сложным с вычислительной точки зрения процессом. Учитывая разнообразие размеров, форм и структур внутренней организации, а также вариативность граничных условий, таких как поступающий в лимфатический узел поток лимфы и баланс давлений на выходе из него и во внутренней кровеносной системе, решение задач

Модель движения клеток
Model of cell motion

$$m_i \mathbf{a}_i = \mathbf{f}_i^{\text{mot}} + \sum_{j \neq i} \mathbf{f}_{ij}^{\text{int}} - \mu \mathbf{v}_i = \mathbf{F}_i(\mathbf{p})$$

Стохастическая сила активной подвижности
Stochastic force of active motility
 Сила взаимодействия с контактирующими клетками
Force due to interactions with cells in contact
 Сила трения в вязкой среде
Friction force

Рассчитываемые характеристики траектории движения клеток:
Computed characteristics of cell trajectories:

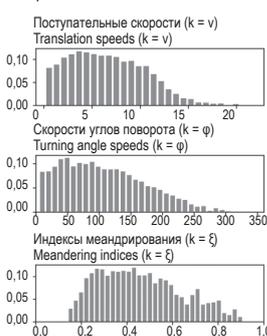


(измерения раз в Δt)
(computed every Δt)

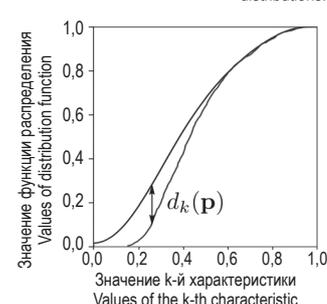
Поступательные скорости:
Translation speeds: $v_i = d_{i-1}/\Delta t$
Скорости углов поворота:
Turning angle speeds: $\varphi_i = \theta_i/\Delta t$
Индексы меандрирования:
Meandering indices: $\xi_i = s_i / \sum_{k=0}^{i-1} d_k$

Определение расстояний между экспериментальными и модельными распределениями характеристик:
Determination of distances between experimental and modelled distribution of the characteristics:

Эмпирические распределения:
Empirical distributions:



Расстояние Колмогорова–Смирнова между распределениями:
Kolmogorov–Smirnov distance between distributions:



Многокритериальная задача оптимизации
Multiobjective optimization problem

$$\mathbf{p}^* = \arg \min \Phi(\mathbf{p})$$

$$\Phi(\mathbf{p}) = d_v(\mathbf{p}) + d_\varphi(\mathbf{p}) + d_\xi(\mathbf{p})$$

Рисунок 1. Калибровка модели движения иммунных клеток в лимфоузле по трем характеристикам траекторий: поступательным скоростям, скоростям углов поворота и индексам меандрирования

Figure 1. Calibration of the model of immune cell motility in lymph node by the three characteristics of cell trajectories: translation speeds, turning angle speeds, meandering indices

течения лимфы в ЛУ становится существенным препятствием для проведения расчетов лимфодинамики и связанных с ней процессов в организме человека. В работе [7] предложен подход к моделированию лимфотока в ЛУ с замещением полноценной расчетной физической модели, требующей построения сеточной аппроксимации лимфатического узла и решения системы уравнений, на искусственную нейронную сеть (ИНС), обученную на наборе заранее сформированных результатов вычислений исходной модели. Зафиксировав форму лимфатического узла, определяющими результаты расчетов можно считать всего лишь 6 параметров: L – скорость абсорбции лимфы в капиллярах; α_1 – гидравлическое сопротивление в субкапсулярном синусе; α_2 – гидравлическое сопротивление в кортексе и медуллярной зоне лимфатического узла; Q_1 – афферентный (входящий) поток лимфы; P_2 – давление в эфферентном (выходящем) сосуде; P – давление в кровеносных капиллярах (рис. 2).

Используя их как входные параметры, была сформирована схема искусственной нейронной сети, содержащей: 6 нейронов входного слоя

(по числу определяющих результат параметров), 6 нейронов скрытого слоя с нелинейной функцией активации (сигмоидальная неотрицательная) и двух нейронов выходного слоя, с которых снимались результаты вычислений физической модели – поток в эфферентном сосуде и давление в афферентном. При этом использовался классический принцип построения связей между нейронами: каждый нейрон последующего слоя имел связи со всеми нейронами слоя предыдущего плюс свободный коэффициент. Величина функции ошибки, т. е. невязка между решением физической и нейросетевой модели, оценивалась как относительное отклонение полученного решения от целевого.

Результаты, полученные при тестировании обученной сети на данных, не принадлежащих обучающей выборке, показали, что при несущественном ухудшении качества результатов, использование нейронной сети позволяет многократно ускорить последующие расчеты: вместо 4-4,5 минуты на решение методом интегральных уравнений, ИНС позволяет получить результат всего за несколько микросекунд, что дает воз-

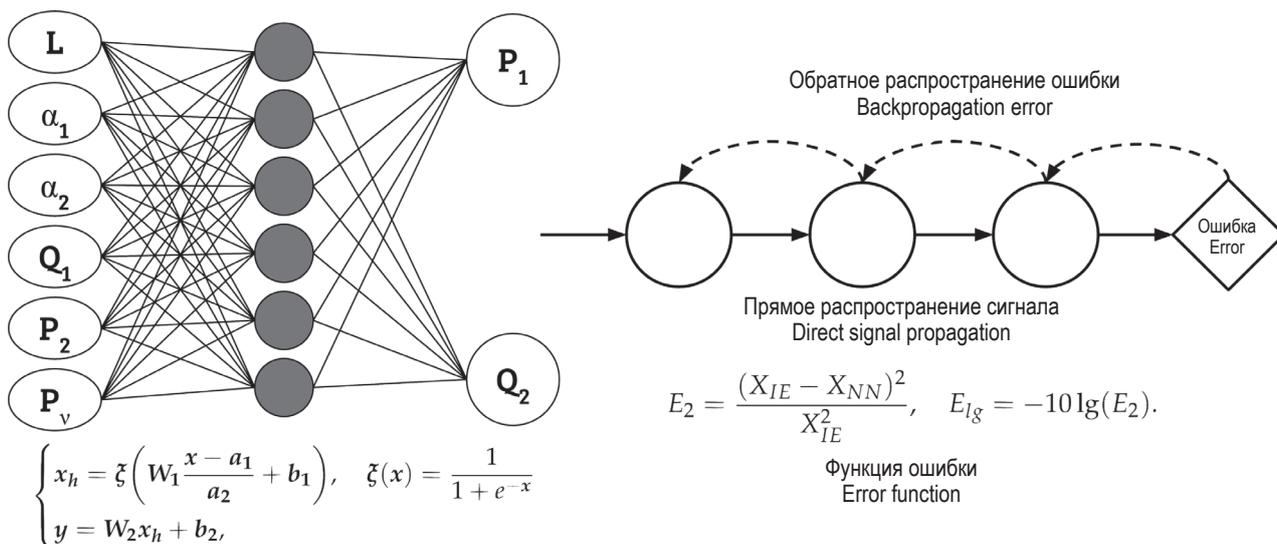


Рисунок 2. Схема модели на основе искусственной нейронной сети и процедура идентификации ее параметров путем минимизации отклонений предсказания нейросети X_{NN} от решения X_{IE} механизменной модели

Примечание. На рисунке слева приведены: схема нейросети, система реализующих ее уравнений (x_h – выходные значения скрытого слоя, W_1, W_2 – матрицы весовых коэффициентов для скрытого и результирующего слоя, b_1, b_2 – свободные коэффициенты для скрытого и результирующего слоя, a_1, a_2 – нормализующие коэффициенты для входных значений, $\zeta(x)$ – нелинейная функция активации); справа представлены принцип обучения нейронной сети методом обратного распространения ошибки, формула оценки ошибки результата вычислений.

Figure 2. ANN-based model scheme and its parameter identification procedure by minimization of the difference between network prediction X_{NN} from initial mechanistic model solution X_{IE}

Note. Figure on the left shows: a topological scheme of a neural network, a system of equations that implements it (x_h , output values of the hidden layer; W_1, W_2 , matrices of weight coefficients for the hidden and resulting layers; b_1, b_2 , free coefficients for the hidden and resulting layers; a_1, a_2 , normalizing coefficients for input values; $\zeta(x)$, non-linear activation function); on the right are the principle of training the neural network by the method of error backpropagation, the formula for estimating the error of the calculation result.

возможность использовать подобные методы приближения результатов в составных проектах, включающих дренаж лимфатических узлов как один из элементов более комплексных моделей (ЛС человека).

Противовирусный иммунный ответ – приближение данных кинетики и допустимые целевые множества

Для решения обратной задачи идентификации параметров модели по экспериментальным данным часто требуется задание, в том или ином виде, дополнительных ограничений. В работе [5] была проведена калибровка модели противовирусного иммунного ответа Марчука–Петрова для описания динамики новой коронавирусной инфекции COVID-19. Модель представляет собой систему ОДУ с запаздывающими аргументами из 13 переменных, описывающую вирусную нагрузку, врожденный интерфероновый ответ, развитие Т-клеточного и гуморального специфического иммунного ответа. В модели параметризовано усиление специфического иммунного ответа за счет воспаления и его подавление за счет разрушения клеток легких. В качестве экспериментальных данных для калибровки использовались опубликованные данные кинетики вирусной нагрузки в носоглотке инфицированных добровольцев, а также дополнительные литературные данные о диапазоне значений концентрации интерферона, антител и цитотоксических лимфоцитов в крови в некоторые моменты времени. Для оценки параметров модели решалась задача минимизации функционала относительных отклонений вирусной нагрузки Φ . Для всех параметров модели были оценены диапазоны допустимых значений параметров на основании литературных данных о скоростях иммунных процессов. Значения большинства параметров модели были зафиксированы равными оценкам параметров модели, откалиброванной ранее для описания динамики инфекции вирусами гриппа А, либо равными оценкам на основе литературных данных. Для оставшихся параметров был проведен локальный анализ чувствительности функционала Φ и его частей, учитывающих отклонения вирусной нагрузки на разных временных интервалах. Были выделены параметры, наиболее влияющие на разные стадии развития инфекции. Для калибровки решалась серия задач оптимизации с двухсторонними ограничениями для подгрупп параметров, влияющих на Φ последовательно на каждом временном интервале. Для валидации корректности получаемых оценок параметров проводилось сравнение решений мо-

дели с экспериментальными данными по другим переменным модели.

Т-клеточный гомеостаз – регуляции баланса деления и дифференцировки

Отличительным признаком хронических вирусных инфекций и онкологических заболеваний являются нарушения работы иммунных механизмов, в частности, истощение Т-лимфоцитов. Истощенные Т-лимфоциты экспрессируют ингибиторные рецепторы (такие как PD1, TIM3), обладают сниженной способностью к пролиферации, выделяют меньше цитокинов. В недавней работе [2] были выделены 4 субпопуляции истощенных Т-лимфоцитов, которые соответствуют различным стадиям дифференцировки и обладают различными характеристиками: $T_{\text{PROG}1}$ (LY108⁺CD69⁺) – покоящиеся, резидентные, $T_{\text{PROG}2}$: (LY108⁺ CD69⁻) – циркулирующие, пролиферирующие, $T_{\text{EX}INT}$: (LY108-CD69⁻) – циркулирующие, обладающие слабым цитотоксическим эффектом, $T_{\text{EX}TER}$: (LY108-CD69⁺) – покоящиеся, терминально истощенные. Баланс деления и дифференцировки данных субпопуляций поддерживается, в частности, за счет взаимодействия с дендритными клетками (DC). Так, SIRPα⁺ PD-L1⁺ DC ингибируют пролиферацию, а XCR1⁺ DC частично восстанавливают функциональность истощенных Т-лимфоцитов, способствуют делению их вместо дифференцировки. Истощение Т-лимфоцитов является частично обратимым за счет применения антител, блокирующих взаимодействие ингибиторных рецепторов и их лигандов. Предполагаемая биологическая схема регуляции дифференцировки и деления может быть сформулирована в виде системы ОДУ (рис. 3). Построенную математическую модель можно использовать, например, для анализа экспериментальных данных, описывающих гомеостаз системы. Для этого требуется идентифицировать параметры системы ОДУ, соответствующие ее стационарному состоянию. Описанный подход можно применить для оценки влияния терапии (например, aPD-L1) на параметры модели, характеризующие те или иные биологические процессы. Применение математического моделирования для прогнозирования эффекта иммунотерапии при ВИЧ-инфекции описано, например, в [8]. В случае анализа стационарных состояний системы нам требуется найти значения параметров, при которых правая часть системы равна нулю. В случае, если построенная модель является линейной, для решения задачи может применяться метод линейного программирования. В отличие от решения системы линейных алгебраических уравнений, при использовании этого подхода решается задача оп-

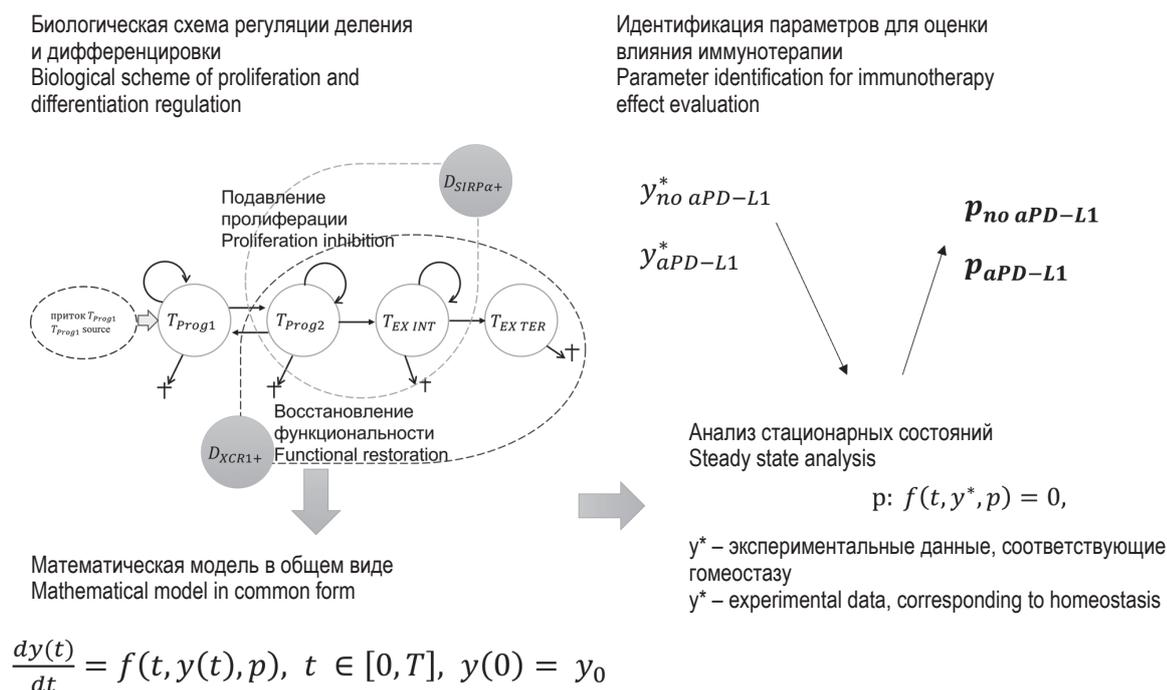


Рисунок 3. Применение математического моделирования для оценки влияния иммунотерапии на параметры Т-клеточного гомеостаза

Figure 3. Application of mathematical modelling for estimation of immunotherapy effect on T cell homeostasis parameters

тимизации с условиями, что, с одной стороны, позволяет учесть ограничения на параметры, с другой – искать вектор с минимальной нормой. Схема математического моделирования эффекта применения иммунотерапии на основе идентификации параметров Т-клеточного гомеостаза приведена на рисунке 3.

Заключение

Представлены современные подходы к разработке математических моделей, количественно согласованных с эмпирическими данными и характеристиками иммунных процессов различной природы.

Список литературы / References

1. Теребиж В.Ю. Введение в статистическую теорию обратных задач. М.: Физматлит, 2005. 375 с. [Terebyzh V.Yu. Introduction to the statistical theory of inverse problems]. Moscow: Fizmatlit, 2005. 375 p.
2. Beltra J.C., Manne S., Abdel-Hakeem M.S., Kurachi M., Giles J.R., Chen Z., Casella V., Ngiow S.F., Khan O., Huang Y.J., Yan P., Nzingha K., Xu W., Amaravadi R.K., Xu X., Karakousis G.C., Mitchell T.C., Schuchter L.M., Huang A.C., Wherry E.J. Developmental relationships of four exhausted CD8⁺ T cell subsets reveals underlying transcriptional and epigenetic landscape control mechanisms. *Immunity*, 2020, Vol. 52, no. 5, pp. 825-841.e8.
3. Bocharov G., Volpert V., Ludewig B., Meyerhans A. Mathematical immunology of virus infections. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2018. 245 p.
4. Grebennikov D., Bouchnita A., Volpert V., Bessonov N., Meyerhans A., Bocharov G. Spatial lymphocyte dynamics in lymph nodes predicts the cytotoxic T cell frequency needed for HIV infection control. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1213. doi: 10.3389/fimmu.2019.01213.
5. Grebennikov D., Karsonova A., Loguinova M., Casella V., Meyerhans A., Bocharov G. Predicting the kinetic coordination of immune response dynamics in SARS-CoV-2 infection: implications for disease pathogenesis. *Mathematics*, 2022, Vol. 10, no. 17, 3154. doi: 10.3390/math10173154.

6. Grebennikov D., Zheltkova V., Bocharov, G. Application of minimum description length criterion to assess the complexity of models in mathematical immunology. *Russian Journal of Numerical Analysis and Mathematical Modelling*, 2022, Vol. 37, no. 5, pp 253-261.

7. Tretiakova R., Setukha A., Savinkov R., Grebennikov D., Bocharov G. Mathematical modeling of lymph node drainage function by neural network. *Mathematics*, 2021, Vol. 9, no. 23, 3093. doi: 10.3390/math9233093.

8. Zheltkova V., Argilaguat J., Peligero C., Bocharov G., Meyerhans A. Prediction of PD-L1 inhibition effects for HIV-infected individuals. *PLoS Comput. Biol.*, 2019, Vol. 15, no. 11, e1007401. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007401.

Авторы:

Гребенников Д.С. — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт вычислительной математики имени Г.И. Марчука» Российской академии наук; научный сотрудник ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Желткова В.В. — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт вычислительной математики имени Г.И. Марчука» Российской академии наук; младший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Савинков Р.С. — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт вычислительной математики имени Г.И. Марчука» Российской академии наук; младший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Боcharov Г.А. — д.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт вычислительной математики имени Г.И. Марчука» Российской академии наук; профессор ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Authors:

Grebennikov D.S., Junior Research Associate, G. Marchuk Institute of Numerical Mathematics, Russian Academy of Sciences; Research Associate, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Zheltkova V.V., Junior Research Associate, G. Marchuk Institute of Numerical Mathematics, Russian Academy of Sciences; Junior Research Associate, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Savinkov R.S., Junior Research Associate, G. Marchuk Institute of Numerical Mathematics, Russian Academy of Sciences; Junior Research Associate, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Bocharov G.A., PhD, MD (Phys.-Math.), Leading Research Associate, G. Marchuk Institute of Numerical Mathematics, Russian Academy of Sciences; Professor, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ВАГИНАЛЬНОМ СЕКРЕТЕ БОЛЬНЫХ ГЕНИТАЛЬНЫМ МИКОПЛАЗМОЗОМ КОРОВ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ ТУЛАТРОМИЦИНОМ

Васильев Р.М., Васильева С.В.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Современная концепция развития промышленного животноводства предусматривает поддержание репродуктивного здоровья самок. Сдерживающим фактором в достижении этой цели являются вялотекущие заболевания репродуктивных органов. На сегодняшний день имеется мало сведений об иммунопатогенезе генитального микоплазмоза, что затрудняет разработку рациональных схем лечения животных. В условиях промышленного животноводства основным способом лечения микоплазмоза остается антибиотикотерапия препаратами тетрациклиновой, макролидной или фторхинолоновой групп.

Исходя из этого, целью нашей работы явилось изучение динамики содержания классов иммуноглобулинов в сыворотке крови и вагинальном секрете коров с генитальным микоплазмозом при использовании для лечения полусинтетического антибиотика макролидной группы тулатромицина.

В эксперименте участвовали сухостойные коровы в возрасте 3-4 лет. Из них было сформировано две группы по 8 животных в каждой. Контрольная группа – клинически здоровые коровы. Опытная группа – коровы с клиническими признаками хронического вагинита, либо имевшие их в течение беременности с подтвержденной микоплазменной инфекцией. Опытной группе коров для лечения генитального микоплазмоза применяли антибиотик траксовет 100 (тулатромицин) в дозе 2,5 мг на 1 кг массы тела животного, подкожно, однократно за 40 дней до предполагаемых родов. У обеих групп животных получали сыворотку крови и вагинальный секрет в которых определяли содержание иммуноглобулинов классов G, M, A и sIgA в вагинальном секрете методом радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини.

Экспериментально установлено, что на 14-й день после введения тулатромицина у больных генитальным микоплазмозом коров в сыворотке крови наблюдалось достоверное увеличение содержания IgG и снижение уровней IgM и IgA, однако данные показатели оставались ниже, чем у здоровых коров. В вагинальном секрете происходило достоверное снижение количества IgM и sIgA и иммуноглобулиновый состав секрета после антибиотикотерапии практически не отличался от здоровых коров.

Адрес для переписки:

Васильев Роман Михайлович
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
университет ветеринарной медицины»
196084, Россия, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5.
Тел.: 8 (921) 909-70-03.
E-mail: rmpvcvet@yandex.ru

Address for correspondence:

Roman M. Vasiliev
St. Petersburg State University of Veterinary Medicine
5 Chernigovskaya St
St. Petersburg
196084 Russian Federation
Phone: +7 (921) 909-70-03.
E-mail: rmpvcvet@yandex.ru

Образец цитирования:

Р.М. Васильев, С.В. Васильева «Динамика содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови и вагинальном секрете больных генитальным микоплазмозом коров на фоне лечения тулатромицином» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 2. С. 189-194.
doi: 10.46235/1028-7221-12045-DOT

© Васильев Р.М., Васильева С.В., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

R.M. Vasiliev, S.V. Vasilieva "Dynamics of the content of immunoglobulins in the blood serum and vaginal secretion of cows with genital mycoplasmosis during treatment with tulathromycin", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 2, pp. 189-194.
doi: 10.46235/1028-7221-12045-DOT

© Vasiliev R.M., Vasilieva S.V., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-12045-DOT

Таким образом, применение тулатромицина при генитальном микоплазмозе у стельных коров помимо высокой терапевтической эффективности приводит лишь к частичной нормализации их иммуноглобулинового статуса. Полученные в ходе эксперимента данные позволят совершенствовать схему лечения генитального микоплазмоза крупного рогатого скота.

Ключевые слова: коровы, иммуноглобулины, вагинальный секрет, микоплазмоз, тулатромицин

DYNAMICS OF THE CONTENT OF IMMUNOGLOBULINS IN THE BLOOD SERUM AND VAGINAL SECRETION OF COWS WITH GENITAL MYCOPLASMOSIS DURING TREATMENT WITH TULATHROMYCIN

Vasiliev R.M., Vasilieva S.V.

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. An important task of industrial animal husbandry is to maintain the reproductive health of female animals. Indolent diseases of the reproductive system remain a big problem. Little information is available on the immunopathogenesis of genital mycoplasmosis. Antibiotic treatment with drugs from tetracycline, macrolide or fluoroquinolone groups is the main approach to treatment of mycoplasmosis. The aim of the present work was to study the dynamics of immunoglobulin contents in blood serum and vaginal secretions of cows with genital mycoplasmosis during therapy with tulathromycin, a semi-synthetic macrolide antibiotic drug.

We studied two groups of cows at their interlactation period ($n = 8$), aged 3-4 years. Control group consisted of clinically healthy cows. The cows from experimental group had confirmed genital mycoplasmosis. They were treated with Traxovet 100 antibiotic (tulathromycin) at a dose of 2.5 mg per 1 kg of animal body weight, by subcutaneous route, 40 days before the expected delivery. Blood serum and vaginal secretions were collected in both groups of animals. The contents of IgG, IgM, IgA immunoglobulins, and sIgA in the vaginal secretion were determined by radial immunodiffusion (Mancini technique).

On the 14th day of the experiment, a significant increase in the IgG contents and decreased levels of IgM and IgA were observed in the blood of the cows from experimental group. However, these indexes still remained lower than in healthy cows. In vaginal secretions, a significant decrease in the IgM and sIgA amounts was detected. The immunoglobulin levels in vaginal secretions after antibiotic therapy did not differ from the healthy cows.

The use of tulathromycin for treatment of genital mycoplasmosis in pregnant cows shows high therapeutic efficacy, but does not lead to a complete normalization of their immunoglobulin status.

Keywords: cows, immunoglobulins, vaginal secretions, mycoplasmosis, tulathromycin

Введение

Сохранение репродуктивного здоровья коров является одной из приоритетных задач на современном этапе развития животноводства в нашей стране. Успешную реализацию этой задачи сдерживают заболевания, характеризующиеся длительным латентным периодом и неспецифической клинической картиной, что существенно растягивает срок постановки окончательного диагноза и назначение соответствующей терапии. В результате в организме больных животных могут развиваться необратимые морфофункциональные изменения, приводящие к преждевременному их исключению из хозяйственного оборота. Как следствие, животноводческие предприятия несут убытки, складывающиеся из за-

трат на лечение, ограничений в реализации продукции и преждевременной выбраковки коров, что отражается на повышении себестоимости молока и мяса. Этиология заболеваний, составляющих эту группу, достаточно широка – от обменных нарушений до хронических инфекций [2, 3].

Одним из таких заболеваний является генитальный микоплазмоз крупного рогатого скота. Генитальный микоплазмоз характеризуется длительным латентным периодом и стертой клинической картиной, что способствует его распространению в популяции [1, 5, 11, 14]. Со временем в животноводческих хозяйствах начинают отмечать снижение показателей воспроизводства стада. Проведение стандартной гинекологической диспансеризации не позволяет установить причины снижения репродуктивной

способности коров, и это ставит в тупик ветеринарных специалистов. На значимость проблемы генитального микоплазмоза крупного рогатого скота указывают зарубежные и отечественные исследователи [5, 11]. Мониторинг животноводческих хозяйств Северо-Западного региона Российской Федерации показал, что урогенитальный микоплазмоз в них широко распространен и имеет четкую корреляцию с низкими показателями воспроизводства [2].

На сегодняшний день основными препаратами для лечения генитального микоплазмоза у коров являются антибиотики тетрациклиновой, макролидной, фторхинолоновой групп [5, 6, 8, 9, 12]. Однако следует учитывать, что антибиотикотерапия не всегда дает ожидаемый эффект, поскольку устойчивость микоплазм к применяемым препаратам со временем увеличивается [10]. Поскольку микоплазмы являются мембранными паразитами эпителиальных клеток слизистых оболочек, то не всегда эффективность антибиотика *in vitro* и *in vivo* будут аналогичными. Как показывает практика, наибольшую терапевтическую эффективность показывают препараты, накапливающиеся в высокой концентрации в лимфе, трансудатах и экссудатах.

Другим важным фактором в успешной терапии генитального микоплазмоза является состояние иммунной системы животного и, прежде всего, комплекса защитных механизмов, обеспечивающих локальный иммунитет слизистых оболочек. В частности, в комплексной защите слизистой оболочки влагалища значительную роль играют: количественный и качественный состав аутофлоры, кислотность вагинального секрета, содержание в нем иммуноглобулинов и лизоцима [3, 16]. Несмотря на многоуровневую защиту слизистых оболочек, микоплазмы за счет синтеза иммуносупрессивных метаболитов и вариабельности поверхностных антигенов способны уклоняться от иммунного ответа, что позволяет им длительно персистировать в организме животных [13, 15]. Одним из важных факторов иммунитета слизистой оболочки влагалища является содержание в ее секрете иммуноглобулинов. Иммуноглобулины, а особенно секреторный иммуноглобулин А (sIgA), препятствуют адгезии инфекционных агентов к эпителиальным клеткам за счет образования иммунных комплексов, а также активируют систему комплемента, нейтрализуя биологическую активность возбудителей.

Опираясь на изложенное выше, определенный интерес представляет изучение терапевтической эффективности полусинтетического антибиотика группы макролидов пролонгированного действия тулатромицин и его влияния на концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке кро-

ви и вагинальном секрете коров с генитальным микоплазмозом.

Материалы и методы

Исследования проводились на базе ЗАО «Осьминское» Сланцевского района Ленинградской области на сухостойных коровах возрастом 3-4 года. Из них были сформированы 2 группы по 8 животных в каждой. Первая группа – клинически здоровые коровы не инфицированные микоплазмозом (контроль). Вторая группа – коровы с клиническими признаками хронического вагинита, либо имевшие их в течение беременности с подтвержденной микоплазменной инфекцией (опыт). Наличие микоплазменной инфекции устанавливали методом ПСР. Для проведения теста с верхнего свода влагалища с помощью цитощетки получали эпителий слизистой оболочки. Выделение ДНК микоплазм из материала проводилось с применением комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ», производства ООО «ИнтерЛабСервис» (Россия). Амплификацию проводили с использованием тест системы «МИК-КОМ» (выявление *Mycoplasma* spp.), ООО «ИнтерЛабСервис» (Россия), на амплификаторе MJ Mini, Bio-Rad (США). Детекция осуществлялась методом электрофореза в агарозном геле с применением комплекта реагентов «ЭФ» производства ООО «ИнтерЛабСервис» (Россия). У положительно реагирующих на *Mycoplasma* spp. коров, дополнительно проводилась серологическая типизация возбудителя методом непрямой гемагглютинации (РНГА) – установлена *M. bovis genitalium*.

Опытной группе коров для лечения генитального микоплазмоза применяли антибиотик траксовет 100 (тулатромицин) в дозе 2,5 мг на 1 кг массы тела животного, подкожно, однократно за 40 дней до предполагаемых родов.

Контроль терапевтической эффективности траксовета 100 осуществлялся путем повторного ПСР-теста на *Mycoplasma* spp. через 14 дней после введения препарата.

У опытной и контрольной групп коров брали кровь из яремной вены для получения сыворотки, а также с помощью специальной ложки в области шейки матки со стенок влагалища собирали вагинальный секрет. У опытной группы материал отбирали дважды – до начала терапии и через 14 дней после введения антибиотика. У контрольной группы однократно – за 25-27 дней до предполагаемых родов.

В сыворотке крови исследовали концентрацию иммуноглобулинов классов IgG, IgM, IgA и их общее содержание, в вагинальном секрете исследовали IgG, IgM, IgA, sIgA и их общее содержание. Определение классов иммуноглобулинов проводили методом радиальной иммуно-

диффузии в геле по Манчини, с использованием антисывороток к иммуноглобулинам крупного рогатого скота производства Hangzhou Sunlong Biotech Co., Ltd. China. Полученные результаты статистически обработаны с использованием компьютерной программы SPSS 22.0.

Результаты и обсуждение

Экспериментальные данные демонстрируют высокую терапевтическую эффективность тулатромицина при генитальном микоплазмозе крупного рогатого скота. Повторное PCR-тестирование через 14 дней после инъекции тулатромицина выявило наличие возбудителя только у 2 животных из 8, что составляет 75%.

Количественные изменения классов иммуноглобулинов в сыворотке крови и вагинальном секрете на фоне применения тулатромицина коровам с генитальным микоплазмозом представлены в таблице 1.

Терапия тулатромицином приводила к значительному росту содержания IgG в сыворотке крови больных генитальным микоплазмозом коров с $9,3 \pm 0,41$ г/л на 44% ($p < 0,001$), однако значение данного показателя оставалось ниже, чем у здоровых животных. Изменения иного характера наблюдались в отношении IgM и IgA. Так, до начала терапии количество IgM в сыворотке крови коров с микоплазмозом составляло $3,34 \pm 0,14$ г/л и снижалось на 14-й день от начала терапии на 37% ($p < 0,001$). Исходно высокий уровень IgA — $6,15 \pm 0,13$ г/л через две недели после введения антибиотика снижался на 31,5% ($p < 0,001$), но оставался существенно выше, чем у клинически здоровых животных. Следует отметить, что общее содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови коров с генитальным микоплазмозом на фоне применения тулатромицина практически не претерпело изменений и было на $3,96$ г/л ниже, чем у здоровых животных.

Изучение динамики иммуноглобулинов в вагинальном секрете коров с генитальным микоплазмозом показало, что применение тулатромицина вызывало недостоверное повышение уровня IgG через 2 недели от его применения на 9%. Антибиотикотерапия больных микоплазмозом коров приводила к достоверному снижению количества IgM в вагинальном секрете с $0,054 \pm 0,003$ г/л на $0,014$ г/л, и оно достигало значения данного показателя у здоровых животных. Исходно низкий уровень IgA в вагинальном секрете инфицированных животных через 2 недели после введения тулатромицина повышался на 22% и приближался к его значению у здоровых коров, однако изменения оказались статистически недостоверными. Высокое содержание секреторного IgA, составлявшее у коров с

генитальным микоплазмозом до начала лечения $0,096 \pm 0,007$ г/л, в результате проведенной терапии достоверно снижалось на $0,023$ г/л и соответствовало уровню здоровых животных. Заболевание коров генитальным микоплазмозом не отражалось на общем содержании иммуноглобулинов в вагинальном секрете. Применение тулатромицина для лечения этих животных вызывало лишь незначительные колебания данного показателя, и он был идентичен уровню здоровых коров.

В эксперименте установлена высокая терапевтическая эффективность полусинтетического антибиотика макролидной группы тулатромицин в отношении *M. bovigenitalium* которая составила 75%. О высокой эффективности антибиотиков данной группы при генитальном микоплазмозе у животных, достигающей 90%, свидетельствуют работы отечественных и зарубежных специалистов [6, 8].

Применение тулатромицина для лечения коров с генитальным микоплазмозом оказывало существенное позитивное влияние на иммуноглобулиновый спектр сыворотки крови. Наблюдаемое снижение IgM может говорить о снижении антигенной стимуляции организма коров вследствие элиминации микоплазм из генитального тракта. Аналогичного характера изменения наблюдались и в отношении IgA, что можно связать со снижением его миграции в слизистую оболочку влагалища для трансформации в секреторный IgA. На этом фоне отмечалось существенное повышение количества IgG, вероятно, являющееся результатом снижения его потребности в реализации иммунологических реакций и снижением супрессивного воздействия микоплазменных метаболитов [13, 15]. Отсутствие достоверной динамики в общем содержании иммуноглобулинов указывает, что изменения в классовом составе происходили путем перераспределения их количества.

В меньшей степени применение тулатромицина при генитальном микоплазмозе крупного рогатого скота повлияло на иммуноглобулиновый состав вагинального секрета. Мы не наблюдали достоверных изменений в концентрации IgG и IgA на 14-й день после введения антибиотика, что может быть связано с отсутствием опосредованного влияния тулатромицина на механизмы транспорта этих иммуноглобулинов через слизистую оболочку. Снижение в вагинальном секрете IgM до уровня здоровых животных является результатом прекращения антигенной стимуляции в связи с элиминацией микоплазм со слизистой оболочки. Значительное снижение в результате проведенной антибиотикотерапии претерпел sIgA и его содержание достигало значения данного показателя в вагинальном секрете здоровых

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ ТУЛАТРОМИЦИНОМ БОЛЬНЫХ ГЕНИТАЛЬНЫМ МИКОПЛАЗМОЗОМ КОРОВ НА СОДЕРЖАНИЕ КЛАССОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ВАГИНАЛЬНОМ СЕКРЕТЕ

TABLE 1. INFLUENCE OF THERAPY WITH TULATHROMYCIN IN COWS WITH GENITAL MYCOPLASMOSIS ON THE CONTENT OF IMMUNOGLOBULIN CLASSES IN BLOOD SERUM AND VAGINAL SECRETION

Показатели Indicators	Генитальный микоплазмоз Genital mycoplasmosis		Клинически здоровые Clinically healthy
	До лечения Before treatment	На 14-й день после After 14 days	
Сыворотка крови Blood serum			
IgG, г/л IgG, g/L	9,30±0,41	13,40±0,54***	17,40±0,63
IgM, г/л IgM, g/L	3,34±0,14	2,10±0,06***	3,41±0,17
IgA, г/л IgA, g/L	6,15±0,13	4,21±0,34***	2,80±0,09
Ig, г/л Ig, g/L	18,76±0,38	19,70±0,71	23,66±0,60
Вагинальный секрет Vaginal secret			
IgG, г/л IgG, g/L	0,183±0,008	0,200±0,005	0,190±0,008
IgM, г/л IgM, g/L	0,054±0,003	0,040±0,003**	0,039±0,003
IgA, г/л IgA, g/L	0,018±0,001	0,022±0,002	0,024±0,003
sIgA, г/л sIgA, g/L	0,096±0,007	0,063±0,002**	0,067±0,005
Ig, г/л Ig, g/L	0,350±0,013	0,32±0,01	0,320±0,011

Примечание. * – уровень достоверности между больными животными получавшими тулатромицин в динамике (** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$).

Note. *, the level of significance between sick animals treated with tulathromycin in dynamics (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

коров. Данное изменение указывает на резкое снижение колонизации микоплазмами слизистой оболочки влагалища и может являться косвенным подтверждением терапевтической эффективности тулатромицина. Общее содержание иммуноглобулинов в вагинальном секрете на фоне проведенной антибиотикотерапии не претерпело существенных изменений и достоверно не отличалось от их количества у здоровых коров. Это свидетельствует о том, что *M. bovis genitalium* не вызывает резкого повышения иммунологической реактивности слизистой оболочки влагалища и реализация иммунного ответа происходит в основном за счет количественного перераспределения классов иммуноглобулинов [16].

Заключение

Проведенное исследование показало высокую терапевтическую эффективность полусинтети-

ческого антибиотика макролидной группы тулатромицина при лечении коров с генитальным микоплазмозом. Наряду с этим, его применение приводит только к частичной нормализации иммуноглобулинового состава сыворотки крови, главным образом за счет количественного перераспределения их классов. Более выраженное позитивное влияние антибиотикотерапия оказала на локальное содержание иммуноглобулинов в вагинальном секрете, где наблюдалась полная нормализация их классового состава. Обнаруженные изменения указывают на целесообразность сочетанного применения в схеме лечения генитального микоплазмоза крупного рогатого скота антибиотика и иммуномодулятора для полной нормализации иммунного статуса животных и предотвращения возможных рецидивов заболевания.

Список литературы / References

1. Алхуссен А.М., Кирпиченко В.В., Алхуссен А.М., Кирпиченко В.В., Яцентюк С.П., Нестеров А.А., Бьядовская О.П., Жбанова Т.В., Спрыгин А.В. Патогенные микоплазмы крупного рогатого скота *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* и *M. dispar*: краткая характеристика возбудителей // Сельскохозяйственная биология, 2021. Т. 56, № 2. С. 245-260. [Alkhussen A.M., Kirpichenko V.V., Yatsenyuk S.P., Nesterov A.A., Byadovskaya O.P., Zhbhanova T.V., Sprygin A.V. Pathogenic mycoplasmas of cattle *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* and *M. dispar*: a brief description of pathogens. *Selskokhozyaystvennaya biologiya = Agricultural Biology*, 2021, Vol. 56, no. 2, pp. 245-260. (In Russ.)]
2. Васильев Р.М. Роль хламидийной и микоплазменной инфекции в этиологии бесплодия у крупного рогатого скота // Международный вестник ветеринарии, 2008. № 3. С. 15-16. [Vasiliev R.M. The role of chlamydia and mycoplasma infection in the etiology of infertility in cattle. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii = International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2008, no. 3, pp. 15-16. (In Russ.)]
3. Васильев Р.М., Васильева С.В. Иммунобиологические свойства вагинального секрета у здоровых и больных микоплазмозом коров // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 4. С. 987-990. [Vasiliev R.M., Vasilieva S.V. Immuno-biological properties of vaginal discharge in healthy and mycoplasmosis-infected cows. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 4, pp. 987-990. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IBP-2278.
4. Васильева С.В., Васильев Р.М. Влияние субклинического кетоза коров на формирование колострального иммунитета телят // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 4. С. 981-986. [Vasilieva S.V., Vasiliev R.M. Influence of subclinical ketosis in cows on formation of colostrum immunity in calves. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 4, pp. 981-986. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IOS-2274.
5. Красиков А.П., Рудаков Н.В. Микоплазмозы человека и животных и их эпидемиологическое и эпизоотологическое значение. Омск: Омский научный вестник, 2015. 717 с. [Krasikov A.P., Rudakov N.V. Mycoplasmoses of humans and animals and their epidemiological and epizootological significance]. *Omsk: Omskiy nauchnyy vestnik*, 2015. 717 p.
6. Лещинский И.И. Макролиды – препараты выбора для борьбы с микоплазмозами животных // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные, 2009. № 1. С. 44-45. [Leshchinsky I.I. Macrolides – drugs of choice for combating mycoplasmosis of animals. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Selskokhozyaystvennyye zhivotnye = Russian Veterinary Journal. Farm Animals*, 2009, no. 1, pp. 44-45. (In Russ.)]
7. Chambaud L., Wróblewski H., Blanchard A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends Microbiol.*, 1999, Vol. 7, no. 12, pp. 493-499.
8. Cooper A.C., Fuller J.R., Fuller M.K., Whittlestone P., Wise D.R. *In vitro* activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against mycoplasmas of veterinary importance. *Res. Vet. Sci.*, 1993, Vol. 54, Iss. 3, pp. 329-334.
9. Gautier-Bouchardon A.V. Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiol. Spectr.*, 2018, Vol. 6, no. 4. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018.
10. Kong L.C., Gao D., Jia B.Y., Wang Z., Gao Y.H., Pei Z.H., Liu S.M., Xin J.Q., Ma H.X. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of macrolide resistance of *Mycoplasma bovis* isolates from multiple provinces in China. *J. Vet. Med. Sci.*, 2016, Vol. 78, no. 2, pp. 293-296.
11. Lysnyansky I., Brenner J., Alpert N., Benjamin A., Bernstein M., Elad D., Blum S., Friedgut O., Rotenberg D. Identification of *Mycoplasma bovis genitalium* and *Mycoplasma canadense* from outbreaks of granulopapular vulvovaginitis in dairy cattle in Israel. *Vet. Rec.*, 2009, Vol. 165, no. 11, pp. 319-322.
12. Lluch-Senar M., Luong K., Lloréns-Rico V., Delgado J., Fang G., Spittle K., Clark T.A., Schadt E., Turner S.W., Korlach J., Serrano L. Comprehensive methylome characterization of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae* at single-base resolution. *PLoS Genet.*, 2013, Vol. 9, no. 1, e1003191. doi: 10.1371/journal.pgen.1003191.
13. Maunsell F.P., Chase C. *Mycoplasma bovis*: Interactions with the immune system and failure to generate an effective immune response. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 2019, Vol. 35, no. 3, pp. 471-483.
14. Nicholas R.A.J., Ayling R.D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res. Vet. Sci.*, 2003, Vol. 74, Iss. 2, pp. 105-112.
15. Pilo P., Vilei E.M., Peterhans E., Bonvin-Klotz L., Stoffel M.H., Dobbelaere D., Frey J. A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J. Bacteriol.*, 2005, Vol. 187, no. 19, pp. 6824-6831.
16. Vasiliev R. Concentration of immunoglobulins in vaginal secretion in healthy cows and with mycoplasmosis. *FASEB J.*, 2021, Vol. 35, no. S1, 01622. doi: 10.1096/fasebj.2021.35.S1.01622.

Авторы:

Васильев Р.М. – к.вет.н., доцент кафедры клинической диагностики ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Васильева С.В. – к.вет.н., доцент кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Vasiliev R.M., PhD (Veterinary Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Diagnostics, St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Vasilieva S.V., PhD (Veterinary Medicine), Associate Professor, Department of Biochemistry and Physiology, St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 07.05.2023
Принята к печати 19.06.2023

Received 07.05.2023
Accepted 19.06.2023

ПРОФЕССОР ГЕОРГИЙ ОЛЕГОВИЧ ГУДИМА



2 мая 2023 года отметил свой 65-летний юбилей Георгий Олегович Гудима – доктор биологических наук, заведующий лабораторией физиологии иммунитета и аллергии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, профессор кафедры иммунопатологии и иммунодиагностики ФГБОУ «Институт повышения квалификации» ФМБА России.

В 1983 г. Г.О. Гудима окончил аспирантуру на биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, где защитил кандидатскую диссертацию. После окончания аспирантуры Г.О. Гудима поступил на работу в Институт иммунологии, с которым связана его последующая научная деятельность. Он прошел путь от младшего научного сотрудника до заведующего лабораторией. В сферу научных интересов Г.О. Гудимы входят патогенез иммунозависимых и аллергических заболеваний, механизмы иммунорегуляции, вопросы иммунопрофилактики и иммунотерапии, разработка вакцин против социально значимых инфекционных заболеваний.

Г.О. Гудима и сотрудники отдела иммунологии СПИДа организовали первые в нашей стране клинические испытания оригинальной отечественной анти-ВИЧ/СПИД-вакцины «ВИЧРЕПОЛ», созданной в Институте иммунологии. Результаты этой работы легли в основу его докторской диссертации. В настоящее время Г.О. Гудима участвует в исследованиях постинфекционного и поствакцинального иммунитета против новой коронавирусной инфекции.

Результаты его научных исследований опубликованы в ведущих научных изданиях. В числе его публикаций более 200 статей, 7 монографий и глав в монографиях, учебные издания, 2 патента. Г.О. Гудима является членом ученого совета и ученым секретарем диссертационного совета в Институте иммунологии.

Георгий Олегович постоянно повышает свою профессиональную квалификацию. Он участвует в работе ведущих российских и международных конгрессов, конференций и школ, выступает с докладами. Г.О. Гудима прошел обучение по международным программам Всемирной организации здравоохранения в области организации доклинических и клинических исследований, окончил курс повышения квалификации преподавательского состава по специальности «Аллергология и иммунология» с сертификацией в Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

Профессор Г.О. Гудима уделяет большое внимание подготовке научных кадров. Под его научным руководством и при научном консультировании защищены 3 кандидатские и 2 докторские диссертации. Он ведет активную преподавательскую работу. В Институте иммунологии он читает лекции по дисциплинам «Аллергология и иммунология» и «Теория и практика научных исследований в биологии и медицине». На кафедре иммунопатологии и иммунодиагностики Академии постдипломного образования ФНКЦ ФМБА России Г.О. Гудима читает лекции по иммунологии СПИДа, современным стратегиям иммунопрофилактики и лечения ВИЧ-инфекции/СПИДа, разработке и применению вакцин против SARS-CoV-2/COVID-19. На протяжении многих лет он в качестве постоянного лектора участвует в работе общероссийской научно-практической школы-конференции «Аллергология и клиническая иммунология (иммунодиагностика, иммунопрофилактика, иммунотерапия иммунозависимых и инфекционных болезней)». Долгое время он активно работал экспертом РАН.

Г.О. Гудима принимает активное участие в деятельности ведущих отечественных и международных научных обществ. Георгий Олегович является членом Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов (РААКИ), в течение 17 лет (1996–2013) занимал пост генерального секретаря ассоциации. В настоящее время он является вице-президентом ассоциации и членом президиума РААКИ. При его непосредственном участии организованы многочисленные всероссийские и международные конгрессы и конференции, в том числе 13 международных конгрессов «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии» (1997–2015), 4 международных форума «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы» (2010–2014), 4 международных совместные сессии РААКИ. Г.О. Гудима постоянно выступает с докладами на научных мероприятиях, проводимых под эгидой РААКИ – Международных междисциплинарных конгрессах по клинической иммунологии и аллергологии, Международных конгрессах по молекулярной аллергологии и иммунологии и др.

Г.О. Гудима внес большой вклад в организацию Международного рабочего совещания стран-участниц Азиатско-Тихоокеанского экономического сотрудничества «Анти-ВИЧ-вакцины как часть комплексного подхода к предотвращению и контролю СПИДа в регионе АТЭС» (2012 г., Москва; 2013 г., Сурабая, Индонезия) в рамках международной программы по борьбе с ВИЧ-инфекцией/СПИДом в странах АТЭС. Георгий Олегович входил в состав оргкомитета 1-й Международной конференции «ВИЧ/СПИД в Восточной Европе и странах СНГ» (2011), принимал активное участие в организации международного симпозиума по ВИЧ-инфекции/СПИДу «Московская международная неделя вирусологии» (2013), организованном совместно с Институтом вирусологии человека (Балтимор). На всех этих мероприятиях он выступал с докладами. В течение 10 лет (2005–2015) Г.О. Гудима был членом исполнительного комитета Всемирной аллергологической организации. Его деятельность дважды отмечена наградой президента WAO. В 2017–2019 гг. он был избран в состав исполнительного комитета Глобальной ассоциации по исследованию астмы Interasma (GAA Interasma).

Г.О. Гудима входит в состав редакционных коллегий ведущих отечественных научных журналов в области иммунологии и аллергологии. Членом редколлегии «Российского аллергологического журнала» он является с момента основания этого издания (2004). В 2014 г. Г.О. Гудима стал ответственным секретарем редколлегии журнала «Иммунология», а в 2017 г. был назначен заместителем главного редактора. Его работа внесла существенный вклад в поддержание высокого уровня журнала, который уже более 40 лет является ведущим отечественным научным изданием в области иммунологии, индексируется в российских и международных системах цитирования, имеет высокий импакт-фактор.

Успехи научной деятельности Г.О. Гудимы отмечены рядом государственных и ведомственных наград и знаков отличия. Он награжден медалью «В память 850-летия Москвы», почетной грамотой ФМБА России, знаком отличия «Ветеран атомной энергетики и промышленности», памятной медалью «За доблестный труд “А.И. Бурназян”» ФМБА России.

Редакционная коллегия «Российского иммунологического журнала» поздравляет Георгия Олеговича с юбилеем, желает ему крепкого здоровья, новых успехов и научных достижений!

АКАДЕМИК РАН АЛЕКСАНДР ВИКТОРОВИЧ КАРАУЛОВ



11 мая 2023 г. исполнилось 70 лет со дня рождения Александра Викторовича Караулова — академика РАН, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой клинической иммунологии и аллергологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Вся научная деятельность А.В. Караулова связана с иммунологией. Он получил классическое образование в области медицины, выбрав иммунологию своей специальностью, окончил аспирантуру и защитил последовательно кандидатскую (1979) и докторскую диссертации (1988).

В 1988 г. А.В. Караулов был назначен заместителем директора Института иммунологии по научной работе. Одновременно он руководил популяционными исследованиями в рамках программы Всесоюзного научного центра молекулярной диагностики и лечения, являясь главным научным сотрудником и директором одного из институтов в этом Центре. В 1990 г. Александр Викторович стал инициатором создания кафедры клинической иммунологии и аллергологии в Первом МГМУ имени И.М. Сеченова, которой он заведует до настоящего времени. В 2018 г. он также организовал международную лабораторию иммунопатологии в рамках проектов по повышению конкурентоспособности ведущих российских университетов среди передовых мировых научно-образовательных центров «5–100» и программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

Уже первые научные исследования А.В. Караулова позволили выявить биологические характеристики различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, что позволило создать и внедрить оригинальную методологию оценки состояния иммунной системы человека и животных. В дальнейшем им были получены новые данные о регуляции иммунных реакций в норме и при патологии человека, установлены новые клеточные и молекулярные механизмы развития иммунологических нарушений и показаны возможности их коррекции. Работы А.В. Караулова в последние два десятилетия посвящены исследованию механизмов мукозального иммунитета респираторного и урогенитального тракта, изучению иммунорегуляторной роли растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы человека и созданию инновационных технологий диагностики, профилактики и лечения иммунозависимых и аллергических заболеваний.

А.В. Караулов активно участвовал в реализации научно-технического сотрудничества с ведущими биомедицинскими центрами, работал в Институте Пастера в Париже в рамках программы ЮНЕСКО «Человек против вируса», в Тропическом центре. Он успешно окончил Гарвардские курсы по менеджменту биомедицинских исследований, курсы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по клиническим исследованиям, являлся активным участником и приглашенным лектором на международных форумах, школах и семинарах по иммунологии и аллергологии, входил в состав редколлегии международных журналов «Медикал Маркет» и «Практикующий врач». В настоящее время А.В. Караулов является членом редколлегии ряда научных журналов, в том числе журнала «Иммунология», с которым сотрудничает с 1980 г.

Александр Викторович проявил себя как активный ученый и педагог: он – соавтор первых в России учебников, атласов и учебных пособий по клинической иммунологии и аллергологии, 30 монографий и книг, 14 патентов и двух открытий. Под его руководством защищено 18 докторских и 30 кандидатских диссертаций, он руководит научной школой по иммунологии, отмеченной грантом Президента Российской Федерации, грантом Сеченовского Университета и грантом РНФ по проведению исследований научными лабораториями мирового уровня. А.В. Караулов является победителем открытого конкурса Совета ректоров медицинских вузов страны «Лучший преподаватель медицинского вуза» в номинации «За подготовку научно-педагогических кадров» и ежегодной премии в сфере медицинского и фармацевтического образования в номинации «За лучшее учебное издание в 2015 году».

А.В. Караулов – заместитель председателя специализированного диссертационного совета, на протяжении многих лет он – председатель Экспертного совета ВАК по медико-профилактическим наукам, в настоящее время – член Президиума ВАК РФ. Является заместителем руководителя секции медико-биологических наук Отделения медицинских наук РАН, экспертом РАН, РНФ, Минобрнауки, членом секции по присуждению премий Правительства в области науки и техники. На протяжении многих лет А.В. Караулов работал в качестве главного внештатного специалиста по клинической иммунологии и аллергологии Третьего Главного управления при Минздраве СССР, Медицинского центра АН СССР, консультантом 4-го Главного управления при Минздраве СССР, Медицинского центра Управления делами Президента РФ и научным руководителем ЦКБ 4-го Главного управления при Минздраве РСФСР.

Александр Викторович – председатель комиссии здравоохранения Российской ассоциации содействия ООН. В качестве советника и эксперта он входил в состав российских делегаций на исполкомах, генассамблеях, комитетах ВОЗ. Он активно участвует в работе международных форумов и съездов, был представителем стран Восточной Европы в комитете ВОЗ/ЮНФПА/ЮНИСЕФ. А.В. Караулов является почетным профессором ряда университетов, отмечен высшим знаком Первого МГМУ имени И.М. Сеченова «За заслуги перед Первым МГМУ», удостоен звания «Заслуженного профессора Сеченовского университета», имеет ведомственные награды («Отличник здравоохранения», «За заслуги перед отечественным здравоохранением», «250 лет МИД России», грамоты Минздрава, РАМН, РАН, ВАК РФ), а также медали и дипломы общественных академий и научных обществ.

Научные заслуги А.В. Караулова были отмечены на государственном уровне рядом правительственных наград, в числе которых медаль ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени, орден Почета, звание «Заслуженный деятель науки РФ», медаль «850 лет Москвы». А.В. Караулов – лауреат премии Москвы в области медицины (2009), премии Правительства Российской Федерации в области образования (2012), премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники (2017), премии имени И.И. Мечникова РАН (2020).

Редколлегия «Российского иммунологического журнала» поздравляет Александра Викторовича с юбилеем и желает ему здоровья, благополучия и дальнейших творческих успехов!

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

Агеев Ю.И.	123	Катаева Н.Н.	105	Савинков Р.С.	181
Агеева А.А.	123	Костарев С.Н.	161	Саркисян Н.Г.	105
Акунеева Т.В.	115	Костоломова Е.Г.	115	Серебрякова М.К.	149
Асфандиярова Н.С.	173	Кудрявцев И.В.	149	Серета Т.Г.	161
Бойко М.С.	123	Лебедев В.М.	149	Стрелин С.А.	115
Бочаров Г.А.	181	Марков А.А.	115	Суховой Ю.Г.	115
Васильев Р.М.	189	Микрюкова Н.В.	141	Унгер И.Г.	115
Васильева С.В.	189	Новоселова О.М.	149	Хлыстова К.А.	105
Гребенников Д.С.	181	Осиков М.В.	123	Haoyang Wang.....	130
Желткова В.В.	181	Полянских Е.Д.	115	Xinyu Hu.....	130
Ильвес А.Г.	149	Прахова Л.Н.	149		
Калинина Н.М.	141	Рубцова М.А.	173		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

антимикробное действие	106	резидентные Т-клетки	116
вагинальный секрет	190	синтезирующие циклооксигеназу клетки	174
воспаление	174	синтетические пептиды	106
гистамин	142	спинно-мозговая жидкость	150
дисфункция клеточного иммунитета	174	стресс	142
заживление ран	116	термическая травма	124
иммуноглобулины	162, 190	триггер	142
иммунограмма	162	трипсин	129
иммуномодулирующие свойства	106	триптаза	129
индекс иммунорегуляции	162	тулатромицин	190
кожа	116	усвоение данных	182
коровы	190	хроническая крапивница	142
коронавирусная инфекция	174	цитотоксические Т-лимфоциты	150
лимфодинамика	182	эластаза	129
математическая иммунология	182	эозинофилы	129
медиатор воспаления	129	эпителизация	124
мелатонин	124	CD45RA	150
миграция клеток	182	CD62L	150
микоплазмоз	190	IGF-1	116
обратные задачи	182	IL-2	116
педиатрия	162	IL-4	124
периферическая кровь	150	IL-17	116
постковидный синдром	174	IL-22	116
природные пептиды	106	PAR2	129
пролиферативная активность лимфоцитов на ФГА	174	Substance P	142
противовирусный иммунный ответ	182	Т-клеточный гомеостаз	182
противовоспалительная активность	106	Т-хелперы	162
проточная цитометрия	116, 150	TNF α	124
проточный цитофотометрический анализ	162		
рассеянный склероз	150		