

**2023**

Официальный журнал  
Российского Научного Общества Иммунологов

**РОССИЙСКИЙ  
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ  
ЖУРНАЛ**



**RUSSIAN JOURNAL  
OF IMMUNOLOGY**

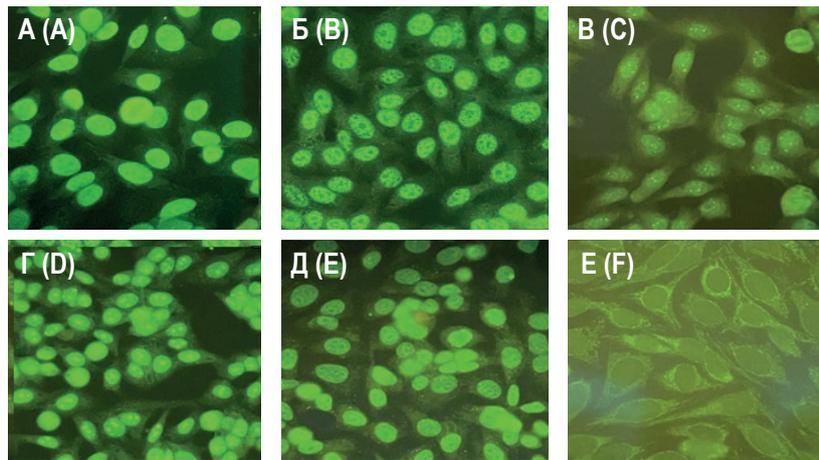
Official Journal  
of Russian Society of Immunology

Volume 26  
Number 3

**2023**

**ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ИНФОРМАТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ СИСТЕМНЫХ ПОРАЖЕНИЯХ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ У ДЕТЕЙ» (АВТОРЫ: ЖУЖУЛА А.А., КУРБАТОВА О.В., СНОВСКАЯ М.А., ПЕТРИЧУК С.В., КОМЯГИНА Т.М., ТРЯПОЧКИНА А.С. [с. 251-258])**

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "SIGNIFICANCE OF DETERMINING ANTINUCLEAR ANTIBODIES IN SYSTEMIC CONNECTIVE TISSUE DISORDERS IN CHILDREN" (AUTHORS: ZHUZHULA A.A., KURBATOVA O.V., SNOVSKAYA M.A., PETRICHUK S.V., KOMYAGINA T.M., TRYAPOCHKINA A.S. [pp. 251-258])



**Рисунок 1. АНА на клеточной линии HEp-2 (Immco Diagnostics, Inc., США)**

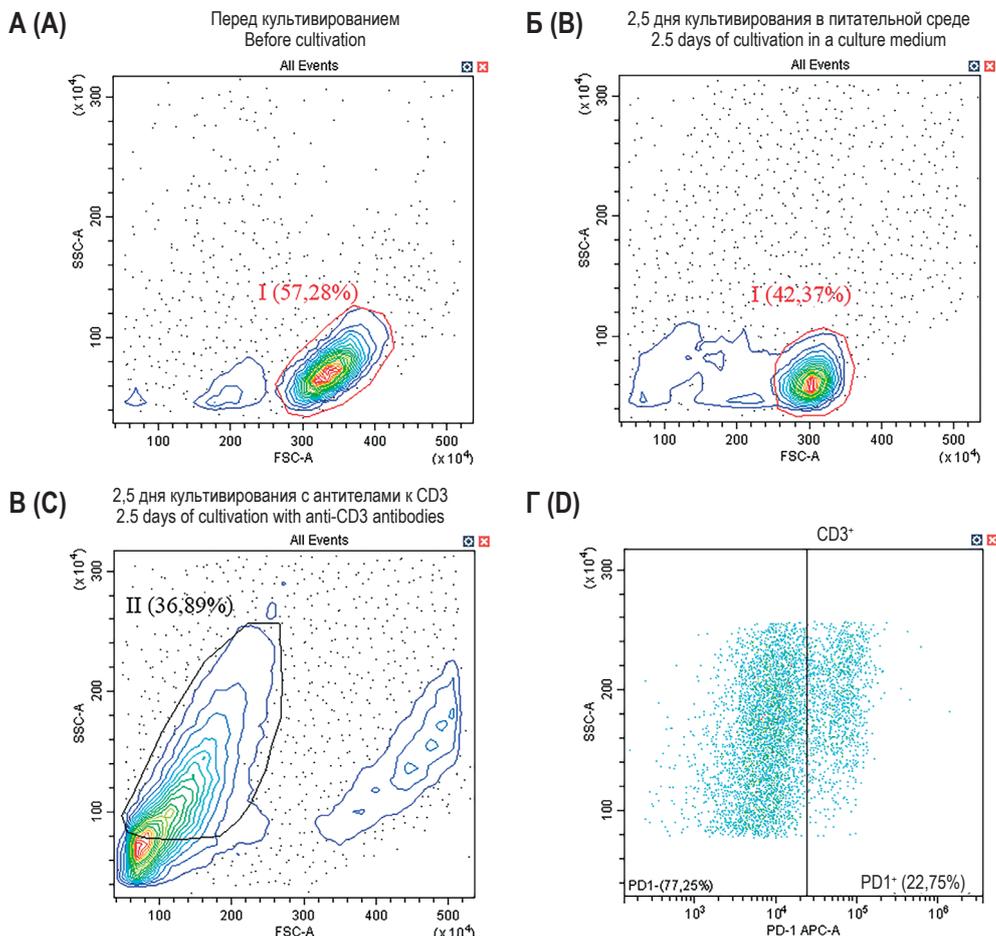
Примечание. А – гомогенный; Б – гранулярный; В – точки в ядре; Г – ядрышковый; Д – смешанный; Е – цитоплазматические типы свечения, флюоресцентная микроскопия, микроскоп Nikon Eclipse Ni (Япония), при  $\times 40$  увеличении.

Figure 1. ANA on the HEp-2 cell substrates (Immco Diagnostics, Inc., USA)

Note. A, homogenous; B, speckled; C, nuclear dots; D, nucleolar; E, homogenous+ speckled; F, cytoplasmic types of luminescence, fluorescence microscopy, Nikon Eclipse Ni microscope (Japan),  $\times 40$  magnification.

**ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ PD1 НА CD3<sup>+</sup> ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ КРЫСЫ, СТИМУЛИРОВАННЫХ АНТИТЕЛАМИ К CD3, МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ» (АВТОРЫ: ХРАМОВА Т.В., БЕДУЛЕВА Л.В., ФОМИНА К.В., АБИШЕВА Н.Н. [с. 415-420])**

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "FLOW CYTOMETRY ANALYSIS OF PD1 EXPRESSION ON RAT BLOOD CD3<sup>+</sup> LYMPHOCYTES STIMULATED BY CD3 ANTIBODIES" (AUTHORS: KHRAMOVA T.V., BEDULEVA L.V., FOMINA K.V., ABISHEVA N.N. [pp. 415-420])



**Рисунок 1. Репрезентативные диаграммы распределения лимфоцитов периферической крови крыс по параметрам прямого и бокового светорассеяния клеток перед культивированием (А), после 2,5-дневного инкубирования в питательной среде (Б) и после 2,5-дневного культивирования с иммобилизованными на дне лунок антителами к CD3 (В). Г – пример диаграммы для определения процента PD1<sup>+</sup> клеток среди CD3<sup>+</sup>Т-лимфоцитов**

Figure 1. Representative forward and side scatter plot of rat peripheral blood lymphocytes before cultivation (A), after 2,5 days of cultivation in a culture medium (B) and after 2,5 days of cultivation with anti-CD3 antibodies immobilized at the bottom of the wells (C). D is an example of a plot for determining the percentage of PD1<sup>+</sup> cells among CD3<sup>+</sup>T lymphocytes

РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИММУНОЛОГОВ  
(РНОИ)

---

# РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

июль-сентябрь

**2023, том 26**

**№. 3**

---

Основан в 1996 году

## Главный редактор

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

## Заместитель главного редактора

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

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

## Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

**Купраш Дмитрий Владимирович** – член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук, Институт молекулярной биологии имени В.А. 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 Михаил** – профессор, Институт наук Вейцмана, Реховот, Израиль

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

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

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

**Стокингер Ганс** – Венский медицинский университет, Центр патофизиологии, 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:

Чухловин А.Б., д.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 биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, старший научный сотрудник; ФГБУ Российская Детская Клиническая Больница, Центральная клиническая лаборатория, Москва, Россия

**Шварц Герберт** – Школа медицины Йонг Лу Лин Национального университета Сингапура

## Редакционный совет

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

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

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

**Свищч 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 11.08.2023 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

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

Заказ № 046

Напечатано в Издательском центре «Титул».

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

Тел.: (351) 230-67-37.

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

RUSSIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY  
(RSI)

---

# **RUSSIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY**

# **ROSSIYSKIY IMMUNOLOGICHESKIY ZHURNAL**

July-September

**2023, volume 26**

**No. 3**

---

Published since 1996

## Editor-in-chief

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

## Deputy Editor-in-Chief

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

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

## Editorial board

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

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

**Irina S. 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 Grigorova** – PhD, Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, United States

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

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

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

**Musa R. 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. Nevinsky** – Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

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

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

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

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

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

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

## Managing Editors:

Anna Rizopulu, PhD (Biology) (Moscow)

Natalia Rakitianskaia, (St. Petersburg)

E-mail: rusimmun@gmail.com

## Translation editor:

Alexey B. Chukhlovin, 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, Gabrichesky 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 11.08.2023. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 28.25. Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> edition – 1000 copies.)

Printed in Publishing Center «Title».

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

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

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

## СОДЕРЖАНИЕ

### Краткие сообщения

- Ахметьянов Р.Р., Давыдова Е.В., Сабирьянов А.Р., Щербакова И.Л.  
РОЛЬ ПАССИВНОЙ И АКТИВНОЙ МИОСТИМУЛЯЦИИ В ИЗМЕНЕНИИ УРОВНЕЙ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ ..... 211
- Беляева С.В., Суслова Т.А., Сташкевич Д.С., Баландина С.Э., Мякотина Д.Э., Милонченко М.С.  
ПОЛИМОРФИЗМ TLR-9 (-1237)\*T/C У БОЛЬНЫХ COVID-19 РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ ..... 217
- Бердюгина О.В., Гусев Е.Ю.  
НЕКОТОРЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ РИАМИЛОВИРА (ТРИАЗАВИРИНА) МЕДРАБОТНИКАМИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ COVID-19 ..... 223
- Валикова О.В., Здор В.В., Тихонов Я.Н., Борода А.В., Грачева А.М., Колбин К.Г.  
ИССЛЕДОВАНИЕ ГОРМОН- И ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ КУМУЛЮСНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЕЕ СВЯЗЬ С ФЕРТИЛЬНОСТЬЮ ПРИ СИНДРОМЕ ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ ..... 233
- Добрынина М.А., Зурочка А.В., Комелькова М.В., Зурочка В.А., Сарapulьцев А.П.  
НАРУШЕНИЕ В-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И СВЯЗАННЫХ С НИМ НАРУШЕНИЙ ИММУНИТЕТА У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ ..... 241
- Жужула А.А., Курбатова О.В., Сновская М.А., Петричук С.В., Комягина Т.М., Тряпочкина А.С.  
ИНФОРМАТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ СИСТЕМНЫХ ПОРАЖЕНИЯХ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ У ДЕТЕЙ ..... 251
- Забокрицкий Н.А.  
ИММУНОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ ИММУНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ НОВОГО БИОСОЕДИНЕНИЯ ..... 259
- Закиров Р.Ш., Петричук С.В., Фрейдлин Е.В., Купцова Д.Г., Янюшкина О.Г., Карасева О.В.  
ОЦЕНКА ОТНОШЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ В РАННЕМ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ У ДЕТЕЙ ..... 265
- Зотова Н.В., Соломатина Л.В., Журавлёва Ю.А., Бражников А.Ю., Гусев Е.Ю.  
ФАЗЫ СИСТЕМОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ СЕПТИЧЕСКОМ И ГЕМОРАГИЧЕСКОМ ШОКАХ ..... 273
- Иванова Е.В., Чайникова И.Н., Бекпергаенова А.В., Бондаренко Т.А., Челпаченко О.Е., Здвижкова И.А., Перунова Н.Б., Бухарин О.В.  
ЭФФЕКТ СОВМЕСТНОГО ВЛИЯНИЯ МЕТОТРЕКСАТА И МЕТАБОЛИТОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ НА ПРОДУКЦИЮ TNF $\alpha$  И IFN $\gamma$  МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ..... 281
- Ковалева С.В., Нестерова И.В., Пиктурно С.Н., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Тетерин Ю.В., Пирогова А.И., Просолупова Н.С., Чулкова А.М.  
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ СИНТЕТИЧЕСКИМ АНАЛОГОМ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГОРМОНА ТИМУСА ТИМОПОЭТИНА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА ..... 287
- Коркмазов А.М., Киселева Е.О., Фролова В.Д., Романюго Г.Д.  
ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У ЛИЦ ЮНОШЕСКОГО ВОЗРАСТА С РЕКУРРЕНТНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ И ПОЛИПОЗНЫМ РИНОСИНОСИТОМ, ПУТИ ИХ КОРРЕКЦИИ ..... 295
- Коркмазов М.Ю., Ленгина М.А., Дубинец И.Д., Кравченко А.Ю., Клепиков С.В.  
НЕКОТОРЫЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ПОЛИПОЗНОГО РИНОСИНОСИТА ..... 301
- Королевская Л.Б., Власова В.В., Шмагель Н.Г., Сайдакова Е.В.  
ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ И ГЛИКОЛИЗА В CD4<sup>+</sup>Т-ЛИМФОЦИТАХ ВИЧ/ВГС КОИНФИЦИРОВАННЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НЕОТВЕТЧИКОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ SEANORSE ..... 307
- Кропанева М.Д., Храмов П.В., Бочкова М.С., Раев М.Б.  
РАЗРАБОТКА МОДЕЛЬНОГО ИММУНОФИЛЬТРАЦИОННОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНЪЮГАТА НА ОСНОВЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА ..... 313
- Кузьмичева Н.А., Михайлова И.В., Смолягин А.И., Филиппова Ю.В., Лившиц Н.М., Мирошниченко И.В.  
ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ТЕТРАПЕПТИДА ACETYL-(D-LYS)-LYS-ARG-ARG-AMIDE НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС WISTAR НА МОДЕЛИ ПАССИВНОГО ТАБАКОКУРЕНИЯ ..... 321

Купцова Д.Г., Радыгина Т.В., Фрейдлин Е.В., Курбатова О.В., Мурашкин Н.Н., Петричук С.В. РОЛЬ КЛЕТОК-СУПРЕССОРОВ МИЕЛОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПРОГНОЗЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ У ДЕТЕЙ С ПСОРИАЗОМ.....	329
Курбатова О.В., Петричук С.В., Мовсисян Г.Б., Купцова Д.Г., Радыгина Т.В., Анушенко А.О., Семикина Е.Л., Потапов А.С. РОЛЬ МАЛЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ С ГЛИКОГЕНОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ .....	337
Латюшина Л.С., Малышева Л.Ю., Пиотрович А.В., Бережная Е.С., Лаптева А.В. ОСОБЕННОСТИ ЭФФЕКТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФАГОЦИТОВ И ВЛИЯНИЕ НА НИХ ТОПИЧЕСКОЙ ЦИТОКИНОТЕРАПИИ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ.....	345
Невежкина Т.А., Черникова М.А., Маркелова Е.В., Тулупова М.С., Костюшко А.В., Федянина Л.Н., Маркова Н.Ю. ДИНАМИКА МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ИХ ТКАНЕВЫХ ИНГИБИТОРОВ У ПАЦИЕНТОК С ГЕРПЕСВИРУСНОЙ И ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ .....	355
Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Атажахова М.Г., Матушкина В.А., Ковалева С.В., Чапурина В.Н. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD16 <sup>+</sup> IFN $\alpha$ /BR1 <sup>+</sup> CD119 <sup>+</sup> , CD16 <sup>+</sup> IFN $\alpha$ /BR1 <sup>+</sup> CD119 <sup>-</sup> И CD16 <sup>+</sup> IFN $\alpha$ /BR1 <sup>+</sup> CD119 <sup>+</sup> НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ.....	363
Пашинина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Гриценко В.А. ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ – ПЕПТИДА ZP2 НА АНТИЛИЗОЦИМННУЮ АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ РОДА <i>CANDIDA</i> .....	373
Пашкина Е.А., Актанова А.А., Коваленко Е.А., Козлов В.А. ВЛИЯНИЕ КУКУРБИТУРИЛОВ НА КОЛИЧЕСТВО И КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ <i>IN VIVO</i> .....	377
Радыгина Т.В., Купцова Д.Г., Петричук С.В., Потапов А.С., Мурашкин Н.Н., Абдуллаева Л.М., Курбатова О.В., Цветкова В.С. СОДЕРЖАНИЕ МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТОК-СУПРЕССОРОВ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ.....	381
Сафронова Э.А., Рябова Л.В. ОСОБЕННОСТИ Т-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ, БОЛЕВШИХ И НЕ БОЛЕВШИХ COVID-19, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ .....	389
Солодовник А.В., Вялова Т.А., Габова Е.В., Поздняков П.А., Бушуева Д.С. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ НА НЕМЕДИКАМЕНТОЗНУЮ ТЕРАПИЮ ХРОНИЧЕСКОГО АДЕНОИДИТА.....	397
Тимганова В.П., Шардина К.Ю., Гутина Е.В. ВЛИЯНИЕ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО $\beta$ 1-ГЛИКОПРОТЕИНА НА ЭКСПРЕССИЮ АРГИНАЗЫ-1 И ИНДОЛАМИН-2,3- ДИОКСИГЕНАЗЫ МИЕЛОИДНЫМИ СУПРЕССОРНЫМИ КЛЕТКАМИ .....	403
Усанина Д.И., Ужвиюк С.В., Заморина С.А. ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА АПОПТОЗ Т-ЛИМФОЦИТОВ И КЛЕТОК ЛИНИИ JURKAT .....	409
Храмова Т.В., Бедулева Л.В., Фомина К.В., Абишева Н.Н. АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ PD1 НА CD3 <sup>+</sup> ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ КРЫСЫ, СТИМУЛИРОВАННЫХ АНТИТЕЛАМИ К CD3, МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ .....	415
Чепурнова Н.С., Кныш С.В., Руднева А.В., Здор В.В., Маркелова Е.В., Романюк П.В., Саяпин С.И. СОДЕРЖАНИЕ УРОВНЕЙ ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ 1-го ТИПА, МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 7-го ТИПА И ПОКАЗАТЕЛИ АНТРОПОМЕТРИИ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И ЖЕНЩИН С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА .....	421
<b>Авторский указатель .....</b>	<b>427</b>
<b>Предметный указатель.....</b>	<b>428</b>

# CONTENTS

## Short communications

<i>Akhmetyanov R.R., Davydova E.V., Sabiryayev A.R., Shcherbakova I.L.</i> <b>ROLE OF PASSIVE AND ACTIVE MYOSTIMULATION FOR THE CHANGING LEVELS OF SOME CYTOKINES</b> .....	211
<i>Belyaeva S.V., Suslova T.A., Stashkevich D.S., Balandina S.E., Myakotina D.E., Milonchenko M.S.</i> <b>TLR-9 (-1237)*T/C POLYMORPHISM IN RUSSIAN COVID-19 PATIENTS FROM THE CHELYABINSK REGION</b> .....	217
<i>Berdiugina O.V., Gusev E.Yu.</i> <b>SOME RESULTS OF RIAMILOVIR (TRIAZAVIRINE) USAGE IN MEDICAL STAFF FOR PREVENTION AND TREATMENT OF COVID-19</b> .....	223
<i>Valikova O.V., Zdor V.V., Tikhonov Ya.N., Boroda A.V., Gracheva A.M., Kolbin K.G.</i> <b>STUDIES ON THE HORMONE AND CYTOKINE PRODUCING FUNCTION OF HUMAN CUMULUS CELLS AND ITS INTERRELATION WITH FERTILITY IN POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME</b> .....	233
<i>Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Komelkova M.V., Zurochka V.A., Sarapultsev A.P.</i> <b>DISTURBANCES IN THE B CELL COMPONENT OF IMMUNE SYSTEM AND ASSOCIATED IMMUNE ALTERATIONS IN POST-COVID PATIENTS</b> .....	241
<i>Zhuzhula A.A., Kurbatova O.V., Snovskaya M.A., Petrichuk S.V., Komyagina T.M., Tryapochkina A.S.</i> <b>SIGNIFICANCE OF DETERMINING ANTINUCLEAR ANTIBODIES IN SYSTEMIC CONNECTIVE TISSUE DISORDERS IN CHILDREN</b> .....	251
<i>Zabokritskiy N.A.</i> <b>IMMUNOPHARMACOLOGICAL ASPECTS OF STUDYING IMMUNOTROPIC PROPERTIES OF A NOVEL BIOCOMPOUND</b> .....	259
<i>Zakirov R.Sh., Petrichuk S.V., Freidlin E.V., Kuptsova D.G., Yanyushkina O.G., Karaseva O.V.</i> <b>T HELPER SUBSETS DURING THE ACUTE POST-TRAUMATIC PERIOD IN CHILDREN</b> .....	265
<i>Zotova N.V., Solomatina L.V., Zhuravleva Yu.A., Brazhnikov A.Yu., Gusev E.Yu.</i> <b>PHASES OF SYSTEMIC INFLAMMATION IN SEPTIC AND HAEMORRHAGIC SHOCKS</b> .....	273
<i>Ivanova E.V., Chainikova I.N., Bekpergenova A.V., Bondarenko T.A., Chelpachenko O.E., Zdvizhkova I.A., Perunova N.B., Bukharin O.V.</i> <b>COMBINED EFFECT OF METHOTREXATE AND BIFIDOBACTERIA METABOLITES ON TNF<math>\alpha</math> AND IFN<math>\gamma</math> PRODUCTION BY HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEARS</b> .....	281
<i>Kovaleva S.V., Nesterova I.V., Pikturko S.N., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Teterin Yu.V., Pirogova A.I., Prosolupova N.S., Chulkova A.M.</i> <b>EFFECTIVENESS OF IMMUNOMODULATORY THERAPY WITH A SYNTHETIC ANALOGUE OF THE ACTIVE CENTER OF THYMOPOIETIN IN THE COMPLEX TREATMENT OF IMMUNOCOMPROMISED WOMEN WITH CHRONIC INFECTIOUS AND INFLAMMATORY DISEASES OF THE PELVIC ORGANS</b> .....	287
<i>Korkmazov A.M., Kiseleva E.O., Frolova V.D., Romanyugo G.D.</i> <b>CYTOKINE PROFILE IN ADOLESCENTS WITH RECURRENT INFECTIONS AND POLYPOSIS SINUSITIS, WAYS OF THEIR CORRECTION</b> .....	295
<i>Korkmazov M.Yu., Lengina M.A., Dubinets I.D., Kravchenko A.Yu., Klepikov S.V.</i> <b>SOME IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF TARGETED THERAPY IN POLYPOUS RHINOSINUSITIS</b> .....	301
<i>Korolevskaya L.B., Vlasova V.V., Shmagel N.G., Saidakova E.V.</i> <b>STUDY OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION AND GLYCOLYSIS IN CD4<sup>+</sup>T LYMPHOCYTES OF HIV/HCV COINFECTED IMMUNOLOGICAL NON-RESPONDERS BY MEANS OF THE SEAHORSE TECHNOLOGY</b> .....	307
<i>Kropaneva M.D., Khramtsov P.V., Bochkova M.S., Rayev M.B.</i> <b>DEVELOPMENT OF A MODEL IMMUNOFILTRATION ASSAY USING A CONJUGATE BASED ON HORSERADISH PEROXIDASE</b> .....	313
<i>Kuzmicheva N.A., Mikhailova I.V., Filippova Yu.V., Smolyagin A.I., Livshits N.M., Miroshnichenko I.V.</i> <b>EFFECT OF TETRAPEPTIDE ACETYL-(D-LYS)-LYS-ARGARG-AMIDE ON IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF WISTAR RATS USING PASSIVE SMOKING MODELS</b> .....	321

<i>Kuptsova D.G., Radigina T.V., Freidlin E.V., Kurbatova O.V., Murashkin N.N., Petrichuk S.V.</i> <b>ROLE OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS IN PREDICTION OF THE EFFECTIVENESS OF BIOLOGICS IN CHILDREN WITH PSORIASIS.....</b>	<b>329</b>
<i>Kurbatova O.V., Petrichuk S.V., Movsisyan G.B., Kuptsova D.G., Radygina T.V., Anushenko A.O., Semikina E.L., Potapov A.S.</i> <b>ROLE OF MINOR LYMPHOCYTE POPULATIONS IN DEVELOPMENT OF LIVER FIBROSIS IN CHILDREN WITH GLYCOGEN STORAGE DISEASE .....</b>	<b>337</b>
<i>Latyushina L.S., Malysheva L.Yu., Piotrovich A.V., Berezhnaya E.S., Lapteva A.V.</i> <b>CHARACTERISTICS OF THE PHAGOCYTE EFFECTOR INDEXES AND EFFECT OF LOCAL CYTOKINE THERAPY ON THEIR PARAMETERS IN INFLAMMATORY DISEASES OF THE MAXILLOFACIAL REGION .....</b>	<b>345</b>
<i>Nevezhkina T.A., Chernikova M.A., Markelova E.V., Tulupova M.S., Kostyushko A.V., Fedyanina L.N., Markova N.I.</i> <b>DYNAMICS OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR TISSUE INHIBITORS IN PATIENTS WITH HERPESVIRUS AND PAPILOMAVIRUS INFECTION .....</b>	<b>355</b>
<i>Nesterova I.V., Chudilova G.A., Atazhakhova M.G., Matushkina V.A., Kovaleva S.V., Chapurina V.N.</i> <b>QUANTITATIVE AND PHENOTYPIC TRANSFORMATION OF CD16<sup>+</sup>IFN<math>\alpha</math>/BR1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN<math>\alpha</math>/BR1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup> AND CD16<sup>+</sup>IFN<math>\alpha</math>/BR1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup> NEUTROPHIL GRANULOCYTES SUBSETS IN PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME .....</b>	<b>363</b>
<i>Pashinina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M., Gritsenko V.A.</i> <b>EFFECT OF SYNTHETIC ANALOGUE OF ZP2 PEPTIDE, AN ACTIVE CENTER OF GM-CSF, UPON ANTILYSOZYME ACTIVITY OF <i>CANDIDA</i>.....</b>	<b>373</b>
<i>Pashkina E.A., Aktanova A.A., Kovalenko E.A., Kozlov V.A.</i> <b>EFFECT OF CUCURBITURILS ON THE NUMBERS AND DIFFERENTIAL COUNTS OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN LABORATORY ANIMALS AFTER <i>IN VIVO</i> PARENTERAL ADMINISTRATION.....</b>	<b>377</b>
<i>Radygina T.V., Kuptsova D.G., Petrichuk S.V., Potapov A.S., Murashkin N.N., Abdullaeva L.M., Kurbatova O.V.a, Tsvetkova V.S.</i> <b>CONTENT OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS IN AUTOIMMUNE DISEASES IN CHILDREN.....</b>	<b>381</b>
<i>Safronova E.A., Ryabova L.V.</i> <b>FEATURES OF T CELL IMMUNITY DEPENDING ON THE CONTENT OF NATURAL KILLER CELLS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME FOLLOWING COVID-19.....</b>	<b>389</b>
<i>Solodvnik A.V., Vyalova T.A., Gabov E.V., Pozdnyakov P.A., Bushueva D.S.</i> <b>INDICATORS OF IMMUNOLOGICAL RESPONSE TO NONDRUG THERAPY OF CHRONIC ADENOIDITIS .....</b>	<b>397</b>
<i>Timganova V.P., Shardina K.Yu., Gutina E.V.</i> <b>EFFECTS OF PREGNANCY-SPECIFIC <math>\beta</math>1-GLYCOPROTEIN ON EXPRESSION OF ARGINASE 1 AND INDOLEAMINE 2,3-DIOXYGENASE BY MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS .....</b>	<b>403</b>
<i>Usanina D.I., Uzhviyuk S.V., Zamorina S.A.</i> <b>EFFECT OF GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON APOPTOSIS OF T LYMPHOCYTES AND JURKAT CELLS.....</b>	<b>409</b>
<i>Khramova T.V., Beduleva L.V., Fomina K.V., Abisheva N.N.</i> <b>FLOW CYTOMETRY ANALYSIS OF PD1 EXPRESSION ON RAT BLOOD CD3<sup>+</sup> LYMPHOCYTES STIMULATED BY CD3 ANTIBODIES .....</b>	<b>415</b>
<i>Chepurnova N.S., Knysh S.V., Rudneva A.V., Zdor V.V., Markelova E.V., Romanyuk P.V., Sayapin S.I.</i> <b>LEVELS OF TISSUE INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEINASES TYPE 1, MATRIX METALLOPROTEINASE TYPE 7 AND ANTHROPOMETRIC PARAMETERS IN PRACTICALLY HEALTHY WOMEN AND WOMEN WITH ARTERIAL HYPERTENSION IN THE OLDER AGE GROUP .....</b>	<b>421</b>
<b>Author index .....</b>	<b>427</b>
<b>Subject index .....</b>	<b>428</b>

## РОЛЬ ПАССИВНОЙ И АКТИВНОЙ МИОСТИМУЛЯЦИИ В ИЗМЕНЕНИИ УРОВНЕЙ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ

Ахметьянов Р.Р.<sup>1</sup>, Давыдова Е.В.<sup>1,2</sup>, Сабирьянов А.Р.<sup>2</sup>,  
Щербакова И.Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Резюме.** Травма передней крестообразной связки (ПКС) коленного сустава сопровождается развитием артрогенного мышечного торможения, вследствие дизрегулирующих афферентных влияний на возбудимость спинномозговых и супраспинальных путей. Цель — изучение показателей электромиографии, уровней миокинов на фоне миостимуляции при травматическом повреждении ПКС.

Принимали участие 28 мужчин-спортсменов с травматическим повреждением ПКС. Все пациенты при поступлении проходили электромиографическое исследование травмированной конечности на аппарате ЭМГ/ВП Viking Quest (Nicolet, США). Части пациентов за 10 дней до начала оперативного лечения, проводили пассивную электромиостимуляцию (ЭМС) четырехглавой мышцы бедра на аппарате INTELECT® Advanced (Chattanooga (DJO), США). Далее всем пациентам проводили артропластику на артроскопе Karl Storz (Германия). В послеоперационный период на протяжении 2-недельной иммобилизации все пациенты получали ЭМС, после снятия ортеза пациенты переходили к режиму активных тренировок. Уровни цитокина IL-6 исследовали с помощью набора реагентов для ИФА (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), трансформирующего фактора роста —  $\beta$  (Cloud-Clone Corp., Китай). Статистическая обработка материала проводилась при помощи пакета Statistica. vers.10.0 (StatSoft Inc., США).

Наиболее высокая средняя амплитуда (мкВ) при проведении электромиографии регистрировалась у здоровых лиц, у пациентов основной группы фиксировались значительно меньшие величины средней амплитуды. После проведения 10-дневной ЭМС отмечено значимое увеличение показателя до значений здоровых лиц. В динамике после оперативного вмешательства показатели ЭМГ без ЭМС оставались на прежнем низком уровне, значения, регистрируемые на фоне ЭМС, были сравнимы со здоровыми лицами, что отражает более быстрое и качественное восстановление мышц после травмы. Уровни цитокинов — миокинов IL-6 и TGF- $\beta$ 1 значительно превысили исходные уровни на фоне ЭМС. Биологическое значение повышения уровня IL-6 при мышечной нагрузке заключается в активации на уровне скелетной мускулатуры АМФ-киназы и/или фосфатидилинозитол-3-киназы и более эф-

### Адрес для переписки:

Ахметьянов Рустам Рафисович  
ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница»  
454048, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 70.  
Тел.: 8 (908) 060-92-06.  
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

### Address for correspondence:

Rustam R. Akhmetyanov  
Chelyabinsk Regional Clinical Hospital  
70 Vorovsky St  
Chelyabinsk  
454048 Russian Federation  
Phone: +7 (908) 060-92-06.  
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

### Образец цитирования:

Р.Р. Ахметьянов, Е.В. Давыдова, А.Р. Сабирьянов,  
И.Л. Щербакова «Роль пассивной и активной  
миостимуляции в изменении уровней некоторых  
цитокинов» // Российский иммунологический журнал,  
2023. Т. 26, № 3. С. 211–216.  
doi: 10.46235/1028-7221-9907-ROP

© Ахметьянов Р.Р. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

R.R. Akhmetyanov, E.V. Davydova, A.R. Sabiryanov,  
I.L. Shcherbakova "Role of passive and active myostimulation  
for the changing levels of some cytokines", Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,  
Vol. 26, no. 3, pp. 211–216.  
doi: 10.46235/1028-7221-9907-ROP

© Akhmetyanov R.R. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-9907-ROP

фективном обеспечении мышц энергетическим субстратом. TGF- $\beta$ 1 способствует пролиферации фибробластов, увеличивает содержание коллагена.

Проведение пассивной и активной ЭМС приводит к улучшению показателей электромиографии, повышению концентрации в крови миокинов — IL-6 и TGF- $\beta$ , что способствует улучшению энергетического баланса, повышению противовоспалительного и репаративного потенциала поврежденных тканей.

*Ключевые слова:* повреждение связок, электромиостимуляция, электромиография, цитокины, миокины

## ROLE OF PASSIVE AND ACTIVE MYOSTIMULATION FOR THE CHANGING LEVELS OF SOME CYTOKINES

Akhmetyanov R.R.<sup>a</sup>, Davydova E.V.<sup>a,b</sup>, Sabiryanov A.R.<sup>b</sup>,  
Shcherbakova I.L.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

<sup>b</sup> South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Abstract.** Injury to the anterior cruciate ligament (ACL) of the knee joint is complicated by development of arthrogenic muscle inhibition due to disregulating afferent influences on the excitability of the spinal and supraspinal tracts. The aim of our work was to study electromyography parameters, and myokine levels in the course of myostimulation in traumatic ACL injury.

28 male athletes with traumatic ACL injuries participated in the study. On admission to the clinic, all patients underwent electromyographic examination of the injured limb by the means of Viking Quest EMG/EP apparatus (Nicolet, USA). Some patients, 10 days before starting the surgical treatment, underwent passive electrical myostimulation (EMS) of the *quadriceps femoris* muscle using the INTELECT® Advanced device (Chattanooga (DJO), USA). Further on, all patients underwent arthroplasty using a Karl Storz arthroscope (Germany). In the postoperative period, during immobilization for 2-weeks, the patients received EMS. After removing the orthosis, the patients switched to active training. The cytokine levels were studied using ELISA reagent kits from Vector-Best, Novosibirsk (IL-6), or from Cloud-Clone Corp. (China) for TGF- $\beta$  assays. Statistical processing of the material was carried out using the Statistica package. vers.10.0 (StatSoft Inc., USA).

The highest average amplitude ( $\mu$ V) was recorded by electromyography in healthy individuals. In patients of the main group, significantly lower values of the average amplitude were recorded. After a 10-day EMS, a significant increase to the reference values of healthy individuals was noted. In the postsurgical dynamics, EMG indicators without EMS treatment remained at the same low levels. Meanwhile, the values following EMS treatment were comparable with those in healthy individuals, thus reflecting a faster and better muscle recovery after injury. The levels of IL-6 and TGF- $\beta$ 1 cytokines (myokines) significantly exceeded the initial levels in the course of EMS. The biological significance of increased IL-6 levels during the muscle exercise may consist the activation of AMP kinase and/or phosphatidylinositol-3-kinase at the level of skeletal muscles thus providing more efficient supply of energy substrate to the muscles. TGF- $\beta$ 1 promotes fibroblast proliferation, thus increasing collagen content.

Passive and active EMS leads to an improvement in electromyography parameters, along with increased concentration of myokines (IL-6 and TGF- $\beta$ ) in peripheral blood, thus promoting improvement of energy balance, increasing the anti-inflammatory and repair potential of the damaged tissues.

*Keywords:* ligament damage, electromyostimulation, electromyography, cytokines, myokines

### Введение

Повреждение передней крестообразной связки (ПКС) у спортсменов происходит с частотой около 4-5 случаев на 1000 человек в год [1], по данным зарубежных авторов, в среднем 69 случаев на 100000 человек в год, у мужчин-спортсменов чаще примерно 82 случая на 100000, у женщин — 59 случаев на 100000. При сопостав-

лении данных показателей по возрасту и полу у женщин-спортсменок в возрасте 14-18 лет самый высокий уровень травм — 227,6 на 100 000, у мужчин пик травм ПКС регистрируется в возрасте от 19 до 24 лет — 241 на 100 000 [12].

Спортсменки в восемь раз чаще напрягают переднюю крестообразную связку в тех видах спорта, которые включают в себя прыжки, при

этом самый высокий процент травм ПКС был зафиксирован в спортивной гимнастике 33 случая на 1000 спортсменов в год. Гендерные различия травматизма ПКС обусловлены, с одной стороны преобладанием эстрогенового фона у женщин и высокой степенью рыхлостью и разволокненностью связок, с другой — различиями в выравнивании ног/таза при движении [7].

Артрогенное мышечное торможение (АМТ), возникающее вследствие травмы передней крестообразной связки, продолжает оставаться ограничивающим фактором в успешном оперативном лечении и последующей реабилитации, вследствие неспособности произвольной активации четырехглавой мышцы, что значительно замедляет восстановление [8, 9].

Аномальные суставные афферентные выбросы, являющиеся причиной АМТ при травме ПКС, влияют на возбудимость спинномозговых и супраспинальных путей, ограничивая мышечную активацию, и могут оказывать тормозное влияние на центральную нервную систему, в частности на кортикомоторные и внутрикорковые пути. Игнорирование дисфункции четырехглавой мышцы бедра приводит к стойкой гипокинезии, атрофии мышц, увеличивает риск повторного травмирования и способствует развитию посттравматического остеоартрита коленного сустава [10, 11]. Ряд исследований показывает эффективность пассивной электромиостимуляции в качестве дооперационной подготовки, обусловленную выбросом в кровь особых цитокинов, продуцируемых активно работающими мышечными клетками — миокинами, обладающими богатым спектром биологического действия, включающего противовоспалительный и репаративный эффекты [4].

В связи с вышеизложенным целью исследования явилось изучение показателей электромиографии, уровней некоторых цитокинов-миокинов при пассивной и активной миостимуляции при травматическом повреждении передней крестообразной связки.

## Материалы и методы

В исследовании принимали участие 28 мужчин, занимающихся анаэробными видами спорта (легкая атлетика, плавание, баскетбол) с диагнозом по МКБ-10 S83.5. Растяжение, разрыв и перенапряжение передней крестообразной связки коленного сустава с давностью травмы менее 3-4 месяцев, поступивших для реконструктивного хирургического вмешательства в отделение травматологии и ортопедии ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница». Средний

возраст пациентов основной группы составил  $35,2 \pm 2,3$  года. Верификация диагноза осуществлялась при наличии положительных тестов Лахмана, «переднего выдвижного ящика» при сгибании 90 градусов и рентгенологическом исследовании КС.

Среди жалоб преобладали умеренные болевые ощущения (65%), чувство нестабильности в поврежденном коленном суставе (93%), слабость в мышцах поврежденной конечности (48%). Все пациенты при поступлении проходили электромиографическое (ЭМГ) исследование прямой головки четырехглавой мышцы бедра травмированной конечности на 4-канальной системе ЭМГ/ВП Viking Quest (Nicolet, США). Проводилась суммарная поверхностная ЭМГ при развитии максимального произвольного мышечного напряжения с оценкой среднеквадратичной амплитуды (Root Mean Square amplitude), мкВ. Далее, лица, имеющие сниженные показатели по ЭМГ, методом простой рандомизации были разделены на две равновеликие группы. Группу 2 составили 14 пациентов, которым за 10 дней до начала артроскопического оперативного вмешательства проводили пассивную электромиостимуляцию (ЭМС) четырехглавой мышцы бедра в ежедневном режиме, рабочий цикл 10 с стимуляция / 10 с расслабление, в течение 20 мин на аппарате комбинированной терапии INTELECT® Advanced (Chattanooga (DJO), США). Силу тока наращивали через каждые 2-3 цикла после начала воздействия, до появления ощутимых мышечных сокращений. В третью группу вошли 14 пациентов, которым оперативное вмешательство проводилось без предварительной ЭМС. После реконструктивной артроскопической операции, заключающейся в аутопластике ПКС при помощи артроскопа Karl Storz (Германия), пациенты 2-й и 3-й групп на протяжении 2-недельной иммобилизации конечности получали ЭМС в описанном выше режиме, с 3-й недели после достижения угла сгибания в коленном суставе более 90 градусов и снятия ортеза все пациенты перешли к режиму активных тренировок. В динамике ЭМГ проводили через 2 и 7 недель после операции.

Контрольную группу 1 составили 12 здоровых мужчин, средний возраст  $34,2 \pm 2,4$  года. ЭМГ прямой головки четырехглавой мышцы бедра и забор крови у здоровых лиц проводился однократно.

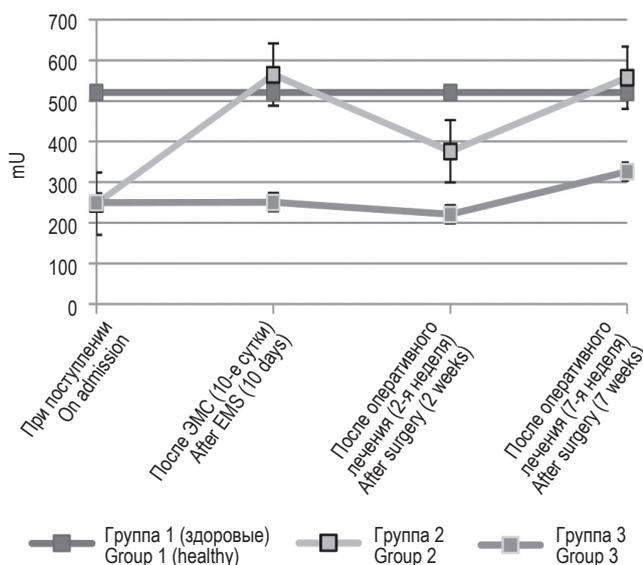
Уровни цитокинов IL-6 и TGF- $\beta$  в сыворотке венозной крови исследовали у здоровых лиц, в основной группе при поступлении, в динамике после 10-дневной пассивной ЭМС в группе 2, через 2 и 7 недель после оперативного вмеша-

тельства с помощью набора реагентов для иммуоферментного анализа (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) в диапазоне концентраций 0-300 пг/мл, при длине волны 450 нм; концентрацию трансформирующего фактора роста  $\beta$  с помощью набора фирмы Cloud-Clone Corp. (China) в диапазоне концентраций 5,8-1000 пг/мл, при длине волны 450 нм.

Статистическая обработка материала проводилась с помощью пакета лицензионных программ Statistica. Vers. 10.0 (StatSoft Inc., США). При сравнении данных использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, в динамике ЭМС с помощью критерия Вилкоксона. Данные представлены в виде медианы (Me) и значений интерквартильного размаха ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). Сравнение групп производили, используя непараметрический критерий Манна–Уитни, с учетом поправки Бонферрони, значимыми считали различия при  $p \leq 0,02$ .

## Результаты и обсуждение

Наиболее высокая средняя амплитуда (мкВ) при проведении ЭМГ регистрировалась у здоровых лиц и составила по медиане 521,4 (489,3; 562,4) (рис. 1). При поступлении в стационар у пациентов 2-й и 3-й групп зафиксированы значительно меньшие величины средней амплитуды, соответственно, 247,3 (197,3-275,6) и 250,2 (196,5-321,3). После проведения 10-дневной ЭМС во



**Рисунок 1. Показатели ЭМГ в динамике пассивной и активной миостимуляции**

Figure 1. EMG parameters in the dynamics of passive and active myostimulation

второй группе отмечено значимое увеличение показателя до значений здоровых лиц. В динамике после оперативного вмешательства показатели ЭМГ через 2 и 7 недель в 3-й группе оставались на прежнем низком уровне, в то время как показатели ЭМГ второй группы были сравнимы со здоровыми лицами, что отражает более быстрое и качественное восстановление мышц после травмы, позволяющее спустя 7 недель после оперативного вмешательства перейти в тренирующий режим нагрузок.

Известно, что во время ЭМС и активных физических нагрузок мышцы проявляют эндокринную активность за счет продукции миоцитами и сателлитными клетками ряда цитокинов, называемых миокинами, таких как IL-6, иризин, IGF-1, FGF2, TGF- $\beta$ , миостатина, декорина и др., выполняющих как аутокринную функцию регуляции мышечного метаболизма, так и паракринную/эндокринную регулирующую функцию в отдаленных органах и тканях, таких как кость, жировая ткань, мозг и печень, проявляя в определенных концентрациях противовоспалительные и репаративные свойства [6].

Нами наглядно показаны исходно низкие концентрации IL-6 в группах 2 и 3 при поступлении (соответственно по медиане 1,4 (1,2-1,6) и 2,2 (1,2-2,3) в сравнении с уровнем здоровых лиц 6,2 (4,2-7,1) и значимое повышение концентрации IL-6 крови пациентов группы 2, получающей процедуру пассивной ЭМС до оперативного вмешательства до уровня здоровых лиц (рис. 2).

Через 2 и 7 недель после оперативного вмешательства уровень миокина во второй группе не имел различий со здоровыми лицами, в отличие от группы 3, где он оставался на уровне 3,2 (2,5-4,5). Биологическое значение повышения уровня IL-6, не превышающее референсные значения здоровых лиц, при мышечной нагрузке заключается в активации на уровне скелетной мускулатуры АМФ-киназы и/или фосфатидилинозитол-3-киназы через рецептор  $gp130\beta/IL-6ra$ , что приводит к увеличению поглощения глюкозы и окислению жирных кислот, обеспечивая энергетическим субстратом сокращающиеся мышцы. Эндокринное действие циркулирующего IL-6 направлено на мобилизацию энергетических ресурсов организма в виде липолитического эффекта за счет повышения активности липопротеинлипазы. Также IL-6 способен проявлять ингибирующее влияние на продукцию инсулина за счет угнетения синтеза SOSC-3 (suppressor of cytokine signaling),

реципрочно отвечающего за сигнальный путь IL-6. SOSC-3 может связываться и угнетать активность как мембранного рецептора инсулина, так и IRS-1, и препятствовать проведению инсулинового сигнала. Формируя таким образом инсулинорезистентность, IL-6 способствует более эффективной мобилизации глюкозы и жирных кислот в качестве источников энергии [2]. Некоторые авторы отмечают, что контролируемые физические упражнения также способны модулировать иммунный ответ, уменьшая выраженность воспалительных изменений в виде снижения в крови уровней CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, IFN $\gamma$  с параллельным повышением концентраций IL-2, IL-6, IL-4 и IL-10 [5].

Исследования последних лет показали важнейшую роль в процессах воспаления, ремоделирования и репарации тканей трансформирующего фактора роста  $\beta$ , полимодального цитокина, активирующего ряд каскадных сигнальных путей как в иммунных, так и в других типах клеток [3]. Нами изучены уровни данного цитокина в динамике пассивной и активной миостимуляции. Установлено, что в условиях вынужденной гипокинезии в крови значительно снижается уровень TGF- $\beta$  в сравнении со здоровыми лицами, что демонстрирует рисунок 3. После проведения предоперационной пассивной ЭМС и в динамике пассивной и активной миостимуляции во 2-й группе пациентов концентрация TGF- $\beta$  увеличилась до значений здоровых лиц.

Известна способность TGF- $\beta$  принимать участие в процессах репарации, путем запуска каскада сигнальных путей, в частности Smad-белков, Erk1/2, JNK и p38, PI3K, а также посредством активации рецептора эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Отмечено, что повышенное содержание TGF- $\beta$ 1 снижает активность NO-синтазы, приводящее к падению генерации NO, и как следствие – NO-радикалов, снижая риск развития нитрозативного клеточного стресса. Кроме того, описано, что TGF- $\beta$ 1 способствует пролиферации фибробластов, увеличивает содержание коллагена, путем регуляции экспрессии генов, кодирующих фибриллярный коллаген I и III типов.

## Заключение

Таким образом, проведение пассивной ЭМС до начала оперативного лечения травматического повреждения ПКС, после оперативного лечения в течение 2 недель и активной ЭМС после

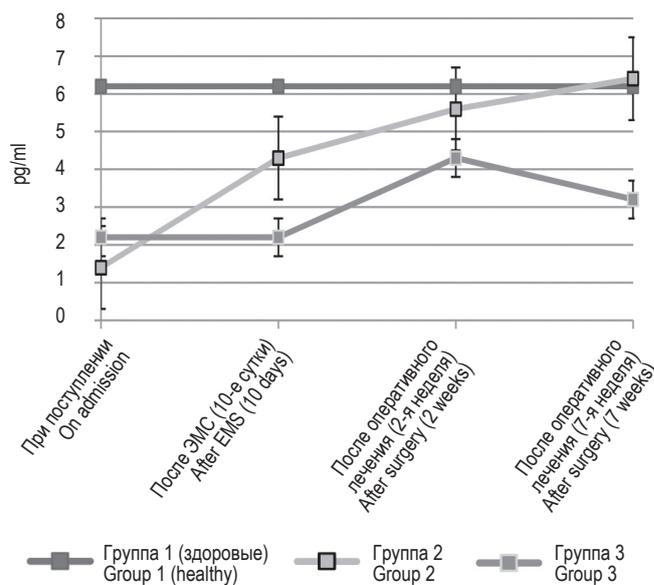


Рисунок 2. Уровни миокина – IL-6 в динамике пассивной и активной миостимуляции

Figure 2. Levels of myokine – IL-6 in the dynamics of passive and active myostimulation

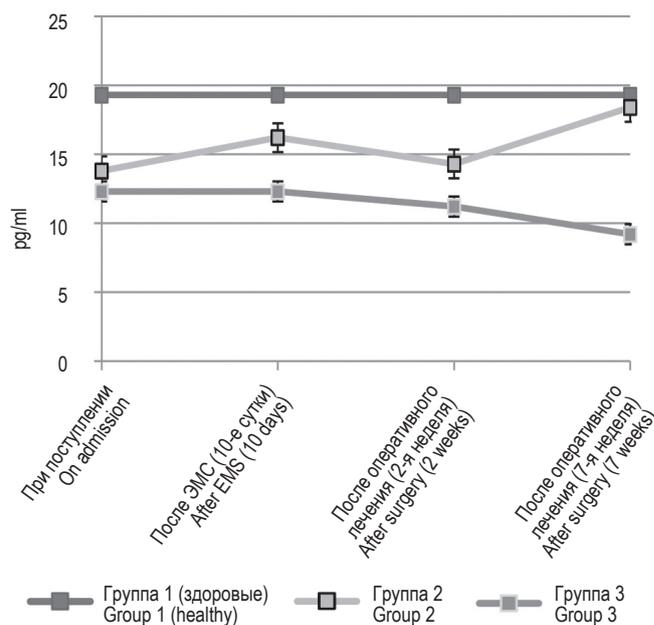


Рисунок 3. Уровни TGF- $\beta$  на фоне пассивной и активной миостимуляции

Figure 3. TGF- $\beta$  levels against the background of passive and active myostimulation

периода ортезирования приводит к улучшению показателей электромиографии, повышению концентрации в крови миокинов – IL-6 и TGF- $\beta$  в пределах значений здоровых лиц, что способствует улучшению энергетического баланса, повышению противовоспалительного и репаративного потенциала поврежденных тканей.

## Список литературы / References

1. Васюкова О.В., Касьянова Ю.В., Окороков П.Л., Безлепкина О.Б. Миокины и адипомиокины: медиаторы воспаления или уникальные молекулы таргетной терапии ожирения? // Проблемы эндокринологии, 2021. Т. 67, № 4. С. 36-45. [Vasyukova O.V., Kasyanova Yu.V., Okorokov P.L., Bezlepkina O.B. Myokines and adipomyokines: inflammatory mediators or unique molecules of targeted therapy for obesity? *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2021, Vol. 67, no. 4, pp. 36-45. (In Russ.)]
2. Москалев А.В., Рудой А.С., Апчел А.В., Зуева В.О., Казымова О.Э. Особенности биологии трансформирующего ростового фактора  $\beta$  и иммунопатология // Вестник Российской Военно-медицинской академии, 2016. Т. 2, № 54. С. 206-216. [Moskalev A.V., Rudoy A.S., Apchel A.V., Zueva V.O., Kazymova O.E. Features of the biology of transforming growth factor  $\beta$  and immunopathology. *Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 2016, Vol. 2, no. 54, pp. 206-216. (In Russ.)]
3. Anastasieva E., Simagaev R., Kirilova I. Topical issues of surgical treatment of injuries of the anterior cruciate ligament (literature review). *Orthopedic Genius*, 2020, Vol. 26, no. 1, pp. 117-128.
4. Bugeira E.M., Duhamel T.A., Peeler J.D., Cornish S.M. The systemic myokine response of decorin, interleukin-6 (IL-6) and interleukin-15 (IL-15) to an acute bout of blood flow restricted exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2018, Vol. 118, no. 12, pp. 2679-2686.
5. Filgueira T.O., Carvalho P.R.C., de Sousa Fernandes M.S., Castoldi A., Teixeira A.M., de Albuquerque R.B., de Lima-Filho J.L., Souto F.O. The impact of supervised physical exercise on chemokines and cytokines in recovered COVID-19 patients. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 4, no. 13, 1051059. doi:10.3389/fimmu.2022.1051059.
6. Gomasasca M., Banfi G., Lombardi G. Myokines: The endocrine coupling of skeletal muscle and bone. *Adv. Clin. Chem.*, 2020, Vol. 94, pp. 155-218.
7. Hootman J.M., Dick R., Agel J. Epidemiology of collegiate injuries for 15 sports: summary and recommendations for injury prevention initiatives. *J. Athl. Train.*, 2017, Vol. 42, no. 2, pp. 311-319.
8. Lepley A.S., Lepley L.K. Mechanisms of arthroscopic muscle inhibition. *J. Sport Rehabil.*, 2021, Vol. 31, no. 6, pp. 707-716.
9. Norte G., Rush J., Sherman D. Arthroscopic muscle inhibition: best evidence, mechanisms, and theory for treating the unseen in clinical rehabilitation. *J. Sport Rehabil.*, 2021, Vol. 31, no. 6, pp. 717-735.
10. Pietrosimone B., Lepley A.S., Kuenze C., Harkey M.S., Hart J.M., Blackburn J.T., Norte G. Arthroscopic muscle inhibition following anterior cruciate ligament injury. *J. Sport Rehabil.*, 2022, Vol. 31, no. 6, pp. 694-706.
11. Sonnery-Cottet B., Saithna A., Quelard B., Daggett M., Borade A., Ouanezar H., Thauinat M., Blakeney W.G. Arthroscopic muscle inhibition after ACL reconstruction: a scoping review of the efficacy of interventions. *J Sports Med.*, 2019, Vol. 53, no. 5, pp. 289-298.
12. Vermeijden H.D., Cerniglia B., Mintz D.N., Rademakers M.V., Kerkhoffs G.M.M.J., van der List J.P., diFelice G.S. Distal remnant length can be measured reliably and predicts primary repair of proximal anterior cruciate ligament tears. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, 2021, Vol. 29, pp. 2967-2975.

---

### Авторы:

**Ахметьянов Р.Р.** – врач – травматолог-ортопед отделения травматологии и ортопедии ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

**Давыдова Е.В.** – д.м.н., доцент, профессор кафедры медицинской реабилитации и спортивной медицины ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующая отделением ранней медицинской реабилитации ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

**Сабирьянов А.Р.** – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Щербакowa И.Л.** – заведующая отделением нейрофизиологии ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

### Authors:

**Akhmetyanov R.R.**, Traumatologist-Orthopedist, Department of Traumatology and Orthopedics, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

**Davydova E.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Medical Rehabilitation and Sports Medicine, South Ural State Medical University; Head, Early Medical Rehabilitation, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

**Sabiryaynov A.R.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Medical Rehabilitation and Sports Medicine, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Shcherbakova I.L.**, Head, Department of Neurophysiology, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

---

Поступила 15.05.2023  
Принята к печати 29.06.2023

---

Received 15.05.2023  
Accepted 29.06.2023

## ПОЛИМОРФИЗМ TLR-9 (-1237)\*Т/С У БОЛЬНЫХ COVID-19 РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Беляева С.В.<sup>1,2</sup>, Сулова Т.А.<sup>1,2</sup>, Сташкевич Д.С.<sup>1</sup>, Баландина С.Э.<sup>1</sup>,  
Мякотина Д.Э.<sup>1</sup>, Милонченко М.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», г. Челябинск, Россия

**Резюме.** COVID-19 – заболевание, исход которого зависит от широкого спектра факторов, в том числе генетических, среди которых особый интерес представляют гены рецепторов врожденной иммунной системы – TLRs, занимающие центральное звено в развитии реакций врожденного иммунного ответа.

В настоящем исследовании нами впервые определены аллельные варианты гена TLR-9 (-1237)\*Т/С у русских жителей Челябинской области, переболевших COVID-19 с осложнением в виде двусторонней вирусной пневмонии. Полиморфные варианты TLR-9 (-1237)\*Т/С определены методом полимеразной цепной реакции. Установлено, что в группе больных COVID-19 чаще встречался аллель с более высокой транскрипционной активностью TLR-9 (-1237)\*С в сравнении с контрольной (19,421% и 11,275% соответственно,  $p = 0,019$ ) и его гомозиготный генотип TLR-9 (-1237)\*С, который в группе сравнения не обнаружен. Аллель TLR-9 (-1237)\*Т у больных COVID-19 встречался реже в сравнении с контрольной группой (80,579% и 88,725% соответственно,  $p = 0,019$ ). Учитывая различия в экспрессии TLR-9 у больных с более тяжелыми формами заболевания, мы провели сравнение распределения полиморфизма TLR-9 (-1237)\*Т/С у больных с разной степенью тяжести COVID-19. В группе больных с легкой формой чаще встречался генотип TLR-9 (-1237)\*Т/Т в сравнении с группами больных с более тяжелыми формами. Различия были достоверны на уровне тенденции в сравнении с больными со средней формой (86,364% и 66,000% соответственно,  $p = 0,076$ ).

**Ключевые слова:** полиморфизм генов, COVID-19, SARS-CoV-2, TLR-9 (-1237)\*Т/С, биомаркеры COVID-19

### Адрес для переписки:

Беляева Светлана Валерьевна  
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный  
университет»  
456658, Россия, Челябинская обл., г. Копейск,  
мкр Премьера, 22, кв. 36.  
Тел.: 8 (908) 052-18-66.  
E-mail: shshvetlana@yandex.ru

### Address for correspondence:

Svetlana V. Belyaeva  
Chelyabinsk State University  
22 Premiere Microdistrict, Apt 36  
Kopeisk, Chelyabinsk Region  
456658 Russian Federation  
Phone: +7 (908) 052-18-66.  
E-mail: shshvetlana@yandex.ru

### Образец цитирования:

С.В. Беляева, Т.А. Сулова, Д.С. Сташкевич,  
С.Э. Баландина, Д.Э. Мякотина, М.С. Милонченко  
«Полиморфизм TLR-9 (-1237)\*Т/С у больных COVID-19  
русских Челябинской области» // Российский  
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 217-222.  
doi: 10.46235/1028-7221-9904-TPI

© Беляева С.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

S.V. Belyaeva, T.A. Suslova, D.S. Stashkevich,  
S.E. Balandina, D.E. Myakotina, M.S. Milonchenko  
“TLR-9 (-1237)\*Т/С polymorphism in Russian COVID-19  
patients from the Chelyabinsk Region”, Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,  
Vol. 26, no. 3, pp. 217-222.  
doi: 10.46235/1028-7221-9904-TPI

© Belyaeva S.V. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-9904-TPI

## TLR-9 (-1237)\*T/C POLYMORPHISM IN RUSSIAN COVID-19 PATIENTS FROM THE CHELYABINSK REGION

Belyaeva S.V.<sup>a, b</sup>, Suslova T.A.<sup>a, b</sup>, Stashkevich D.S.<sup>a</sup>, Balandina S.E.<sup>a</sup>,  
Myakotina D.E.<sup>a</sup>, Milonchenko M.S.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station, Chelyabinsk, Russian Federation

**Abstract.** In COVID-19, the clinical outcome depends on a wide range of factors, including genetic features. Among them, TLRs, the genes encoding the receptors of innate immune system are of particular interest since they play the key role in development of innate immune response. The present study concerns the newly identified allelic variants of the TLR-9 (-1237)\*T/C gene in Russian residents from the Chelyabinsk Region who had COVID-19 complicated by the bilateral viral pneumonia. Polymorphic variants of TLR-9 (-1237)\*T/C were determined by polymerase chain reaction. It was found that, among the COVID-19 patients, a TLR-9 allele (-1237 C) with higher transcriptional activity was more common than in the control group (19.421% and 11.275%, respectively,  $p = 0.019$ ), and its homozygous genotype TLR-9 (-1237)\*C was not detected in the comparison group. TLR-9 allele (-1237)\*T in the patients with COVID-19 was less common in comparison with the control group (80.579% and 88.725%, respectively,  $p = 0.019$ ). Taking into account the differences in suggested TLR-9 expression in more severe COVID-19 patients, we compared distribution of TLR-9 (-1237)\*T/C allele polymorphism in the patients with different severity of COVID-19. In the group of patients with mild form, the TLR-9 (-1237)\*T/T genotype was more common as compared with patients who had more severe clinical course. The differences were significant at the trend level when compared with patients with a medium-severity disease (86.364% and 66,000%, respectively;  $p = 0.076$ ).

*Keywords:* gene polymorphism, COVID-19, SARS-CoV-2, TLR-9 (-1237)\*T/C, COVID-19 biomarkers

### Введение

Пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, связанная с распространением вируса SARS-CoV-2, является серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире [8]. В настоящее время ведется поиск потенциальных биомаркеров заболевания, которые повысят эффективность ранней диагностики, а также позволят разрабатывать методики лечения и предупреждения распространения COVID-19. Одним из таких биомаркеров является Toll-подобный рецептор-9 (TLR-9) [3, 5].

TLR-9 – эндосомальный рецептор, распознающий мотивы РНК и ДНК, богатые неметилированными последовательностями цитозин-фосфат-гуанин (CpG). Поскольку SARS-CoV-2 имеет CpG-мотивы в своем генетическом материале, вполне возможно, что вирус напрямую активирует TLR-9 в эндотелиальных клетках [5]. Мотивы CpG от SARS-CoV-2 достигают TLR-9 через опосредованное ACE2 поглощение вируса в клетки с последующей трансляцией РНК и переносом вирусных CpG-мотивов в эндосому. Активация тромбоцитов и нейтрофилов может

повышать уровень экспрессии TLR-9, что, как предполагается, приводит к постоянному воспалению. Длительная активация TLR-9 индуцирует нижестоящие каскады через MyD88, что вызывает повышенную экспрессию провоспалительных цитокинов, активацию лимфоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов [5]. Кроме того, данные исследований Costa T.J. и соавт. свидетельствуют о том, что SARS-CoV-2 способствует дисфункции митохондрий, при этом увеличивается высвобождение мтДНК и активируется передача сигналов TLR-9 [6]. Интересно отметить, что уровень циркулирующей мтДНК увеличивается с возрастом, что является фактором, способствующим хроническому воспалению, так называемому «воспалительному старению» у пожилых людей. Эта ось воспалительного старения и TLR-9 может иметь значение в контексте COVID-19, где пожилой возраст связан с большим риском развития тяжелых осложнений COVID-19 [5].

Предполагается, что активация TLR-9 может быть скрытой, но движущей силой, объясняющей

обострение гипервоспаления и тромботических осложнений, наблюдаемых при COVID-19 [5].

Для TLR-9 идентифицировано несколько SNPs, изменяющих восприимчивость к бактериальным и вирусным инфекциям [3]. Ген TLR-9 локализуется в районе генов-супрессоров опухолевого роста на коротком плече 3-й хромосомы человека, кодируется с помощью 2 экзонов, второй из которых представляет основную кодирующую область [1]. Al-Khatib et al. обнаружили, что у людей, несущих аллель TLR-9 (-1237)\*С, наблюдается повышенная транскрипционная активность данного гена [4]. Кроме того, полиморфизм TLR-9 (-1237)\*С, вызывающий активацию провоспалительных хемокинов и цитокинов, а также адаптивных иммунологических реакций, был связан с более высокой частотой инфекций, приобретенных в отделении интенсивной терапии и иммуноопосредованных заболеваний. Было обнаружено, что аллель TLR-9 (-1237)\*С и его гомозиготный генотип TLR-9 (-1237)\*С/С в значительной степени связаны с повышенным риском и тяжестью инфекции COVID-19 [3].

Понимание влияния генетической изменчивости на контроль экспрессии гена TLR-9 может дать представление об индивидуальных вариациях риска заболевания и лежащего в его основе патогенеза.

Поэтому целью нашего исследования была оценка распределения частоты встречаемости полиморфизма гена TLR-9 (Т-1237С) у больных COVID-19 русских Челябинской области с разными формами тяжести.

## Материалы и методы

Обследуемую группу составил 121 пациент противокоронавирусных госпиталей № 2, 3, 9 города Челябинска с подтвержденной инфекцией COVID-19 русской популяции. Контрольную группу составили 102 здоровых донора Челябинской областной станции переливания крови русской популяции, без прививок, антител к SARS-CoV-2 и не состоящие в Федеральном регистре лиц, больных COVID-19 Единой Государственной Информационной Системы Здравоохранения (ЕГИСЗ). Все участники предоставили информированное согласие на участие в исследовании. Диагноз подтвержден тестом на РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР из мазка из носоглотки (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Для сравнительного анализа между больными с разными формами COVID-19 пациенты были разделены на 3 группы по тяжести течения заболевания. Больные в группах со средней и высокой

степенью тяжести перенесли COVID-19 в форме двусторонней пневмонии. Больные с легкой формой имели антитела (без вакцинации), но не имели выраженных клинических признаков заболевания. Обследуемые не имели сопутствующих тяжелых заболеваний.

Определение SNP в гене TLR-9 выполняли с помощью ПЦР (Т-1237С в гене TLR-9) реактивами ООО НПФ «Литех» (Москва). Интерпретацию результатов проводили с помощью электрофоретической детекции в 3%-м агарозном геле.

С целью статистической обработки полученных результатов нами был использован онлайн-калькулятор «Медицинская статистика», в котором проводилась оценка критерия  $\chi^2$  с помощью анализа четырехпольной таблицы. Связь между полиморфизмом гена TLR-9 (-1237)\*Т/С и COVID-19 оценивали с помощью критерия отношения шансов (OR) и соответствующих 95% доверительных интервалов (CI) при анализе случаев заболевания с группой сравнения. Достоверность полученных значений считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В результате сравнительного анализа частоты распределения аллелей и генотипов гена TLR-9 (-1237)\*Т/С между контрольной группой и группами больных были обнаружены достоверные различия. Результаты анализа представлены в таблице 1.

В группах больных COVID-19 и контрольной с более высокой частотой встречался аллель TLR-9 (-1237)\*Т (80,56% и 88,73% соответственно), за среднюю транскрипционную активность TLR-9, что соответствует распределению у европеоидов [7].

В группе больных COVID-19 чаще встречался аллель TLR-9 (-1237)\*С в сравнении с контрольной (19,421% и 11,275% соответственно,  $\chi^2 = 5,552$ ,  $p = 0,019$ , OR = 1,897, CI 1,107-3,249). Гомозиготный генотип TLR-9 (-1237)\*С/С был обнаружен только в группе больных. Данный полиморфизм ассоциирован с повышенной транскрипционной активностью TLR-9 [4], что ведет к гиперпродукции медиаторов воспаления [3], вызывая развитие более тяжелых форм заболевания.

В группе больных COVID-19 реже встречался аллель TLR-9 (-1237)\*Т в сравнении с контрольной (80,579% и 88,725% соответственно,  $\chi^2 = 5,552$ ,  $p = 0,019$ , OR = 0,527, CI 0,308-0,903), что позволяет его рассматривать в качестве протекторного.

**ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ГЕНА TLR-9 (-1237)\*T/C В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ COVID-19 И ЗДОРОВЫХ РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ**

TABLE 1. FREQUENCY DISTRIBUTIONS OF ALLELES AND GENOTYPES OF THE TLR-9 GENE (-1237)\*T/C IN GROUPS OF COVID-19 PATIENTS AND HEALTHY RUSSIANS OF THE CHELYABINSK REGION

TLR-9 (-1237) *T/C	Больные COVID-19 COVID-19 patients n = 121		Контрольная группа Control group n = 102		$\chi^2$	p value	OR	CI	
	N	%	N	%					
<b>Аллели</b> Alleles									
<b>T</b>	195	80,579	181	88,725	5,552	0,019	0,527	0,308	0,903
<b>C</b>	47	19,421	23	11,275	5,552	0,019	1,897	1,107	3,249
<b>Генотипы</b> Genotypes									
<b>T/T</b>	88	72,727	79	77,451	0,657	0,418	0,776	0,421	1,433
<b>T/C</b>	19	15,702	23	22,549	1,697	0,193	0,640	0,326	1,257
<b>C/C</b>	14	11,570	0	0	–	< 0,001	–	–	–

**ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА TLR-9 (-1237)\*T/C В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ COVID-19 РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ С РАЗЛИЧНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

TABLE 2. DISTRIBUTION OF FREQUENCIES OF ALLELES AND GENOTYPES OF TLR-9 (-1237)\*T/C GENE POLYMORPHISM IN GROUPS OF COVID-19 RUSSIAN PATIENTS OF THE CHELYABINSK REGION WITH VARIOUS CLINICAL FORMS OF THE DISEASE

TLR-9 (-1237)* T/C	Тяжелая форма COVID-19 Severe form of COVID-19 n = 49	Средняя форма COVID-19 Average form of COVID-19 n = 50	Легкая форма COVID-19 Light form of COVID-19 n = 22
	%	%	%
<b>Аллели</b> Alleles			
<b>T</b>	80,612	77,000	88,636
<b>C</b>	19,388	23,000	11,364
<b>Генотипы</b> Genotypes			
<b>T/T</b>	73,469	66,000	86,364
<b>T/C</b>	14,286	22,000	4,545
<b>C/C</b>	12,245	12,000	9,091

Согласно данным литературы, у больных с тяжелой формой COVID-19 наблюдается повышенная экспрессия TLR-9, приводящая к гиперактивации рецептора и, соответственно, к чрезмерной выработке медиаторов воспаления, что лежит в основе цитокинового шторма и тромботических осложнений у пациентов с тяжелыми формами коронавирусной инфекции [2].

С целью определения ассоциации между полиморфизмом гена TLR-9 (-1237)\*Т/С и тяжестью течения COVID-19 был проведен анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма гена TLR-9 (-1237)\*Т/С в группах больных COVID-19 с различными клиническими формами заболевания. Были рассмотрены больные с тяжелой, средней и легкой формами заболевания. Результаты представлены в таблице 2.

В результате анализа обнаружено, что у больных с легкой формой чаще встречался генотип TLR-9 (-1237)\*Т/Т в сравнении с больными с более тяжелыми формами. Различия были достоверны на уровне тенденции в сравнении с больными со средней формой (86 364% и 66 000% соответственно  $\chi^2 = 3,158$ ,  $p = 0,076$ ). TLR-9 (-1237)\*Т/Т. По данным литературы, данный генотип связан с

низким уровнем IL-6 в плазме крови. Также известно, что IL-6 играет важную роль в развитии цитокинового шторма у больных с тяжелой формой COVID-19 и высокие уровни IL-6 в плазме крови могут являться фактором развития более тяжелых исходов при COVID-19 [9].

## Заключение

Наши результаты подтверждают теорию о том, что генетические различия определяют развитие и течение различных форм COVID-19 у русских Челябинской области. Вероятно, более высокий риск развития заболевания ассоциирован с аллелем TLR-9 (-1237)\*С и его гомозиготным генотипом TLR-9 (-1237)\*С/С, связанным с более высокой транскрипционной активностью TLR-9. У больных, имеющих в генотипе TLR-9 (-1237)\*Т/Т, связанный со средней продукцией TLR-9, большая вероятность развития более легких форм заболевания. Поиск эффективных генетических биомаркеров развития коронавирусной инфекции может быть использовано для разработки методик лечения и предупреждения распространения COVID-19 у русских Челябинской области.

## Список литературы / References

1. Ковальчук Л.В., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Мироншиченкова А.М., Ганковский В.А. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека // Человек и его здоровье, 2012. № 2. С. 147-153. [Kovalchuk L.V., Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Mironshichenkova A.M., Gankovskii, V.A. The role of Toll-like receptors in the pathogenesis of human infectious diseases. *Chelovek i ego zdorovye = Man and His Health*, 2012, no. 2, pp. 147-153. (In Russ.)]
2. Шелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Бургасова О.А., Кружкова И.С., Малеев В.В. COVID-19: этиология, клиника, лечение // Инфекция и иммунитет, 2020. № 10(3). С. 421-445. [Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Burgasova O.A., Kruzhkova I.S., Maleev V.V. COVID-19: etiology, clinic, treatment. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, no. 10 (3), pp. 421-445. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-CEC-1473.
3. Alhabibi A.M., Hassan A.S., Elbaky N.M., Eid H.A. Impact of Toll-Like Receptor 2 and 9 Gene Polymorphisms on COVID-19: Susceptibility, Severity, and Thrombosis. *J. Inflamm. Res.*, 2023, no. 16, pp. 665-675.
4. Al-Khatib S., Shabaneh A.M., Abdo N., Al-Eitan L. Association of TLR9-1237T>C; rs5743836 polymorphism with increased risk of Hodgkin's lymphoma: A case-control study. *PLoS One*, 2022, Vol. 17, no. 7, e0272312. doi: 10.1371/journal.pone.0272312.
5. Bezemer G., Garssen J. TLR9 and COVID-19: A multidisciplinary theory of a multifaceted therapeutic target. *Front. Pharmacol.*, 2021, Vol. 11, 601685. doi: 10.3389/fphar.2020.601685.
6. Costa T.J., Potje S.R., Fraga-Silva T.F.C., da Silva-Neto J.A., Barros P.R., Rodrigues D., Machado M.R., Martins R.B., Santos-Eichler R.A., Benatti M.N., de Sá K.S.G., Almado C.E.L., Castro Í.A., Pontelli M.C., La Serra L., Carneiro F.S., Becari C., Louzada-Junior P., Oliveira R.D.R., Zamboni D.S., Arruda E., Auxiliadora-Martins M., Giachini F.R.C., Bonato V.L.D., Zachara N.E., Bomfim G.F., Tostes R.C. Mitochondrial DNA and TLR9 activation contribute to SARS-CoV-2-induced endothelial cell damage. *Vascul. Pharmacol.*, 2022, Vol. 142, 106946. doi: 10.1016/j.vph.2021.106946.
7. Greene J.A., Moormann A.M., Vulule J., Bockarie M.J., Zimmerman P.A., Kazura J.W. Toll-like receptor polymorphisms in malaria-endemic population. *Malar. J.*, 2009, Vol. 8, 50. doi: 10.1186/1475-2875-8-50.

8. Gusev E., Sarapultsev A., Solomatina L., Chereshev V. SARS-CoV-2-specific immune response and the pathogenesis of COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 3, 1716. doi: 10.3390/ijms23031716.

9. Yang H.-Y., Lu K.-C., Lee H.-S., Huang S.-M., Lin Y.-F., Wu C.-C., Salter D.M., Su S.-L. Role of the functional Toll-like receptor-9 promoter polymorphism (-1237T/C) in increased risk of end-stage renal disease: A case-control study. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 3, e58444. doi: 10.1371/journal.pone.0058444.

---

**Авторы:**

**Беляева С.В.** — к.б.н., биолог отдела лабораторной диагностики, лаборатория диагностики гемотрансмиссивных инфекций ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови»; доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

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

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

**Баландина С.Э.** — ассистент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета, аспирант биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

**Мякотина Д.Э.** — магистрант биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

**Милонченко М.С.** — бакалавр биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

**Authors:**

**Belyaeva S.V.**, PhD (Biology), Biologist, Department of Laboratory Diagnostics, Laboratory for Diagnostics of Bloodborne Infections, Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station; Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Suslova T.A.**, PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunological Research, Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station; Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Stashkevich D.S.**, PhD (Biology), Associate Professor, Dean, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Balandina S.E.**, Assistant Professor, Postgraduate Student, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Myakotina D.E.**, Master Student, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Milonchenko M.S.**, Bachelor, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

## НЕКОТОРЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ РИАМИЛОВИРА (ТРИАЗАВИРИНА) МЕДРАБОТНИКАМИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ COVID-19

Бердюгина О.В., Гусев Е.Ю.

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

**Резюме.** Зарегистрированный в России риамилловир (метилтионитрооксодигидротриазолотриазинид натрия, торговое название – Триазавирин) является синтетическим аналогом гуанина и препаратом прямого противовирусного действия. В настоящее время имеются противоречивые данные относительно использования риамилловира в качестве профилактического и лечебного средства при коронавирусных инфекциях. Целью настоящего исследования стал анализ некоторых результатов применения риамилловира как в целях профилактики инфицирования вирусом SARS-CoV-2, так и для лечения COVID-19 в период первой волны пандемии новой коронавирусной инфекции.

Анализ был сделан на основе опроса 62 медицинских работников, одного из медицинских учреждений г. Екатеринбурга, переболевших COVID-19, подразделенных на 4 группы: 1) не получавших риамилловир (контроль), 2) получавших риамилловир только в качестве профилактики заболевания, 3) получавших препарат в качестве лечебного средства, 4) получавших риамилловир до и во время заболевания.

Полученные данные по использованию риамилловира в целях профилактики заражения вирусом SARS-CoV-2 показало, что следствием стало: увеличение длительности госпитализации, рост таких осложнений COVID-19, как: лихорадка, одышка, легочная недостаточность, пневмония легких, повышенная частота неврологических расстройств, о чем не сообщалось ранее. Перенесенное заболевание как тяжелое при профилактическом приеме риамилловира было оценено значительно чаще, а спустя 2 месяца после болезни реабилитационный период был незаконченным. У всех, кто принимал риамилловир для профилактики НКИ, в дальнейшем появлялась клиника мышечных и суставных болей. Использование риамилловира с лечебной целью позволило избежать развития легочной недостаточности, тяжелого течения инфекционного заболевания, восстановить состояние здоровья в полном объеме.

В исследовании не выявлено полезности применения риамилловира для профилактики осложнений COVID-19 при приеме препарата до инфицирования вирусом SARS-CoV-2. Однако применение риамилловира с лечебной целью позволяет избежать тяжелого течения инфекционного заболевания и в 4 раза снизить риск появления болей в мышцах, суставах, позвоночнике после перенесенного COVID-19.

*Ключевые слова:* риамилловир, Триазавирин, COVID-19, SARS-CoV-2, профилактика, лечение

### Адрес для переписки:

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

### Address for correspondence:

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

### Образец цитирования:

О.В. Бердюгина, Е.Ю. Гусев «Некоторые результаты применения риамилловира (Триазавирин) медработниками для профилактики и лечения COVID-19» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 223-232.  
doi: 10.46235/1028-7221-9410-SRO

© Бердюгина О.В., Гусев Е.Ю., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

O.V. Berdiugina, E.Yu. Gusev "Some results of Riamilovir (Triazavirine) usage in medical staff for prevention and treatment of COVID-19", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 223-232. doi: 10.46235/1028-7221-9410-SRO

© Berdiugina O.V., Gusev E.Yu., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-9410-SRO

# SOME RESULTS OF RIAMILOVIR (TRIAZAVIRINE) USAGE IN MEDICAL STAFF FOR PREVENTION AND TREATMENT OF COVID-19

Berdiugina O.V., Gusev E.Yu.

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

**Abstract.** Riamilovir, a drug registered in Russia (chemical formula: methylthionitrooxodihydrotriazolotriazinide sodium, trade name: Triazavirin) is a synthetic analogue of guanine and a drug of direct antiviral action. Currently, there are conflicting data regarding usage of riamilovir as a preventive and therapeutic agent in coronavirus infections. The purpose of this study was to analyze some results of riamilovir usage, both for prevention of the SARS-CoV-2 infection and for the treatment of COVID-19 during the first wave of the new coronavirus pandemic.

The analysis was based on a survey of 62 medical staff workers at a single medical institution in Ekaterinburg who was ill with COVID-19, being divided into 4 groups: (1) those who did not receive riamilovir (control), (2) persons who received riamilovir only as a disease prevention, (3) subjects who received the drug as a therapeutic agent, (4) those who received riamilovir before and during the disease.

The data concerning usage of riamilovir for the prevention of infection with the SARS-CoV-2 virus have shown the following consequences: increased duration of hospitalization, an increased incidence of COVID-19 complications, i.e., fever, shortness of breath, pulmonary insufficiency, pneumonia, higher frequency of neurological disorders, which were not reported elsewhere. Severe clinical course of the disease was observed much more often in cases of prophylactic riamilovir administration, and the rehabilitation period was incomplete 2 months after the disease. Clinical symptoms of muscle and joint pain were documented at later terms in all persons who received riamilovir to prevent a new coronavirus infection. Usage of riamilovir for therapeutic purposes made it possible to avoid the development of pulmonary insufficiency, severe course of the infectious disease, and entirely restore the state of health.

The study did not reveal the usefulness of riamilovir for prevention of COVID-19 complications when taking the drug before infection with the SARS-CoV-2 virus. However, the use of riamilovir for therapeutic purposes prevents development of severe clinical cases and is associated with 4-fold reduced risk of pain in muscles, joints, and spine among the COVID-19 patients.

*Keywords:* riamilovir, Triazavirin, COVID-19, SARS-CoV-2, prevention, treatment

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

## Введение

Пандемия 2019–2023 годов сопровождалась неоднократным пересмотром методических рекомендаций по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (НКИ) COVID-19. Этот факт свидетельствует о наличии объективных сложностей выбора эффективного метода предупреждения заболевания, инициируемого вирусом SARS-CoV-2, а также рационального способа лечения и реабилитации пациентов. В частности, в качестве этиологической терапии COVID-19 был рекомендован риамиловир (riamilovir, торговое название – Триазавирин), который уже и до пандемии COVID-19 использовался в лечении гриппа и некоторых

других острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) [4, 7].

Согласно опубликованным ранее данным, в клинических исследованиях среди 113 человек, использовавших риамиловир в целях профилактики COVID-19, в течение первых 7 дней после контакта с инфицированными SARS-CoV-2 пациентами заболело 3 человека, что авторами статьи расценено как высокая протективная эффективность препарата: более 97% резистентных к заражению контактирующих [5]. Немногочисленные исследования, раскрывающие результаты использования риамиловира для лечения НКИ, показали, что применение препарата на ранних стадиях заболевания, в дополнение к стандартной терапии, позволило ускорить элиминацию вируса у молодых пациентов со среднетяжелым течением болезни, а также наблюдать клинические симптомы улучшения состояния [3]. Хотя в проведенном в 2020 году в Китае рандомизированном исследовании не было обнаружено статистически значимых доказательств того, что

риамиловир (Триазавирин) приносит пользу пациентам с COVID-19, наблюдения всё же показали возможную пользу от его использования для лечения COVID-19 из-за его известного противовирусного действия [10].

Теоретические предпосылки возможности использования риамиловира в лечении инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, были представлены ранее [2, 9]. Однако даже в предварительных расчетах была зафиксирована возможность возникновения некоторых осложнений вследствие приема препарата, в частности увеличения агрегации тромбоцитов [11]. Очевидно, что массовое использование лекарственных средств необходимо сопровождать мониторингом возможных осложнений.

**Целью настоящего исследования** стал анализ некоторых результатов применения риамиловира как в целях профилактики инфицирования вирусом SARS-CoV-2, так и для лечения COVID-19 в период первой волны пандемии новой коронавирусной инфекции.

## Материалы и методы

Сбор первичных данных выполнен в Екатеринбурге (Свердловская область) в первую волну заболеваемости населения НКИ, а именно в период с октября по декабрь 2020 года. Исследование проведено при участии и после собственноручно подписанного добровольного информированного согласия 62 медицинских работников многопрофильного учреждения, в котором в круглосуточном режиме оказывали неотложную педиатрическую помощь. Никто из поступающих на лечение в стационар детей не был предварительно обследован на наличие РНК (рибонуклеиновой кислоты) или антигена вируса SARS-CoV-2, вследствие чего медицинские сотрудники контактировали в том числе и с инфицированными НКИ пациентами.

Требования физико-химического предупреждения инфицирования 62 обследованных сотрудников больницы соблюдались путем использования одноразовых медицинских масок, ношения перчаток, обработки рук дезинфицирующими растворами, а помещений — ультрафиолетовым освещением. Никто из участников исследования не был вакцинирован, так как специфические иммунопрофилактические средства на момент получения данных исследования не были разработаны.

Все медицинские работники, участвовавшие в данном тестировании, однократно перенесли COVID-19. Диагноз НКИ установлен на основании клинико-инструментальных и лабораторных методов исследования. Молекулярно-биологическое тестирование образцов эпителия ротоглотки и носоглотки выполнялось согласно требований временных методических рекомендаций Мини-

стерства здравоохранения Российской Федерации в сроки до 4 дней с момента появления клинических проявлений заболевания или контакта с больным НКИ. РНК возбудителя COVID-19 выявлена во всех случаях инфицирования.

Жизнь и здоровье участников исследования опасности не подвергались. Сбор данных проводился через 2 месяца после болезни. Изучение сведений, включавших информацию о преморбидном статусе (наличии заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной, иммунной систем, а также имеющихся зависимостях), характере течения заболевания (синдромы, терапия), постморбидных изменениях (обострении хронических, а также возникновении новых заболеваний) и серологических маркерах НКИ (с использованием реагентов SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-Бест; D-5505, РУ № РЗН 2021/14458 и SARS-CoV-2-IgM-ИФА-Бест; D-5502, РУ № РЗН 2020/10389, «Вектор-Бест», Новосибирск для ориентировочной оценки уровня IgM) базировалось на принципах «Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации» и ее последующих редакций, документах Организации Объединенных Наций, касающихся прав пациента и положений Приказа МЗ РФ № 266 от 19.06.2003 года «Об утверждении Правил клинической практики в Российской Федерации».

Часть медицинских работников по собственной инициативе (без согласования с врачом) в целях профилактики заражения вирусом SARS-CoV-2 использовала риамиловир, согласно инструкции по применению, а именно перорально по 250 мг трижды в день на протяжении не менее трех недель. С учетом того, что респонденты являлись либо врачами, либо в свободном режиме могли контактировать с врачами по вопросам приема риамиловира, в данном исследовании полагали, что сотрудники учреждения осуществляли прием препарата в соответствии с рекомендациями по использованию. Помимо этого, среди медицинских работников, которые приняли участие в исследовании, была когорта тех, кому при манифестации COVID-19 был назначен риамиловир в комплексной терапии НКИ.

Таким образом, среди общего количества обследованных (62 человека): не принимали риамиловир — 26 респондентов (41,9% от всех) — группа № 1 (контрольная), использовали риамиловир в целях профилактики инфицирования вирусом SARS-CoV-2 — 8 человек (12,9% от всех) — группа № 2, применяли риамиловир для лечения новой коронавирусной инфекции — 19 человек (30,6% от всех) — группа № 3, использовали риамиловир и в целях профилактики заражения вирусом SARS-CoV-2, и для лечения НКИ — 9 человек (14,5% от всех) — группа № 4. Медиана и межквартильный размах возраста групп составили: № 1 — 47 (40 —

53) лет, № 2 – 49 (43-56) лет, № 3 – 40 (28-49) лет, № 4 – 43 (36-53) года соответственно, значимых отличий в возрастном составе между когортами не выявлено. Гендерное разнообразие групп также был сходным: подавляющее большинство составляли женщины, мужчин в группе № 1 было 3 (11,5% от числа в группе), в группе № 2 – 0, в группе № 3 – 4 человека (21,1% от числа человек в группе), в группе № 4 – 1 (11,1% от числа в группе). Среди обследованных в группе № 1 было 4 (15,4% от числа человек в группе) врача, 16 (61,5% от числа человек в группе) человек со средним и 1 (3,8% от числа человек в группе) – с младшим медицинским образованием, а также 5 (19,2% от числа человек в группе) человек иного персонала лечебного учреждения; в группе № 2 было 4 (50,0% от числа человек в группе) врача, 2 (25,0% от числа человек в группе) медицинские сестры и по одному (по 12,5% соответственно от числа человек в группе) человеку с младшим медицинским образованием и иного медицинского персонала больницы, в группе № 3 было 7 (36,8% от числа человек в группе) врачей, 11 (57,9% от числа человек в группе) медицинских сестер и 1 (5,3% от числа человек в группе) представитель иного персонала лечебного учреждения; группа № 4 состояла из 4 (44,4% от числа человек в группе) специалистов с высшим медицинским образованием, 4 (44,4% от числа человек в группе) – со средним медицинским образованием и 1 (11,1% от числа человек в группе) сотрудника иного персонала больницы.

Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием операционной системы Windows 10 (Microsoft Corporation, США); статистический пакет STATISTICA v. 12.5.192.5 (StatSoft, Inc., США). Исследование включало методы вариационной статистики, данные представлялись в виде процента случаев от общего количества человек в группе, медианы (Me) и межквартильного размаха ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ) выборки. Проверку нормальности распределения производили с использованием тестом Колмогорова–Смирнова ( $p < 0,05$  соответствовал ненормальному распределению изученных данных). Различия между группами оценивали с использованием Chi-Square test. Уровень значимости (p-value) вероятности отказа от принимаемой статистической гипотезы считали равным 0,05.

Исследование выполнено с одобрения локального этического комитета медицинского учреждения. Экспертное заключение о возможности открытого опубликования полученных данных утверждено членами экспертной комиссии ФГБУН ИИФ УрО РАН.

## Результаты и обсуждение

Оценка характера распределения полученных данных на основании использования теста Кол-

могорова–Смирнова и сравнительного анализа четырех групп исследования с использованием критерия Chi-Square ( $\chi^2$ , критерий согласия Пирсона) показали следующее (табл. 1).

Медицинские сотрудники, принимавшие риамилловир в целях профилактики COVID-19 в сравнении с контрольной группой (не использовавшей риамилловир в лечении и профилактике) после инфицирования вирусом SARS-CoV-2 чаще испытывали одышку (в 1,3 раза), легочную недостаточность (в 2,2 раза), лихорадочное состояние (в 1,9 раза), переносили пневмонию (в 1,5 раза), имели больший объем поражения тканей легких (в 2,5 раза) согласно данным компьютерной томографии, повышенную частоту неврологических расстройств (в 3,2 раза), anosмию/дисгевзию (на 16%). Длительность госпитализации пациентов в группе № 2 в сравнении с контрольной была дольше в 3,3 раза. Респонденты, принимавшие риамилловир в профилактических целях, оценили перенесенное заболевание как тяжелое в 2,4 раза чаще, чем больные группы № 1, как заболевание средней тяжести – в 1,8 раза чаще 1-й группы, случаев легкого и бессимптомного течения болезни зафиксировано не было.

Через 2 месяца после инфицирования вирусом SARS-CoV-2 пациенты группы № 2 имели сложности с восстановлением трудоспособности (табл. 2): они в 6,4 раза чаще, чем в группе контроля, считали, что полной реабилитации не наступило, все констатировали повышенную утомляемость (в 2,2 раза выше, чем в группе № 1), в 6,6 раза чаще жаловались на впервые появившиеся после COVID-19 новые заболевания, а также обострения хронических болезней (чаще в 3,3 раза). О впервые появившихся болях в мышцах, суставах, позвоночнике после COVID-19 заявили все респонденты группы, принимавшей риамилловир в профилактических целях, что в 2,4 раза выше, чем в группе № 1.

Следующая рассмотренная группа № 3 использовала риамилловир только для лечения COVID-19. Выявлены такие особенности (табл. 1, 2). В сравнении с группой № 1 в процессе болезни не отмечено ни одного случая легочной недостаточности, тогда как в отсутствие использования риамилловира осложнение диагностировано в 11,5% случаев. При оценке тяжести инфекционного заболевания в 1,5 раза чаще, чем в группе № 1 оно расценивалось как средне-тяжелое, вместе с тем не было зафиксировано ни одного случая тяжелого течения. Все респонденты группы № 3 через 2 месяца после инфекции заявили о полном восстановлении состояния здоровья. Частота случаев впервые появившихся болей в мышцах, суставах, позвоночнике после COVID-19 была в 4 раза ниже, чем в группе № 1. Концентрация IgG через 2 месяца после НКИ была несколько ниже, чем в группе, не исполь-

**ТАБЛИЦА 1. НЕКОТОРЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ ТЕЧЕНИЯ НКИ У РЕСПОНДЕНТОВ, ИСПОЛЬЗОВАВШИХ / НЕ ИСПОЛЬЗОВАВШИХ РИАМИЛОВИР ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19**

TABLE 1. SOME CLINICAL DATA ON THE COURSE OF A NEW CORONAVIRUS INFECTION IN RESPONDENTS WHO USED/ DID NOT USE RIAMILOVIR FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF COVID-19

Исследованные показатели Investigated indicators	Риамиловир не принимали (26 человек) Группа № 1 Riamilovir was not taken (26 people) Group No. 1	Использовали риамиловир в профилактических целях (8 человек) Группа № 2 Riamilovir was used for preventive purposes (8 people) Group No. 2	Использовали риамиловир в процессе лечения COVID-19 (19 человек) Группа № 3 Riamilovir was used in the treatment of COVID-19 (19 people) Group No. 3	Использовали риамиловир в целях профилактики и лечения COVID-19 (9 человек) Группа № 4 Riamilovir was used for the prevention and treatment of COVID-19 (9 people) Group No. 4
Частота лихорадки, % Frequency of fever, %	38,5	75,0 with № 1: Chi-Square = 19,52, p < 0,001	50,0 with № 2: Chi-Square = 8,26, p = 0,005	55,6 with № 1: Chi-Square = 11,30, p < 0,001
Частота одышки, % Frequency of shortness of breath, %	19,2	25,0 with № 1: Chi-Square = 8,71, p = 0,004	5,3 with № 2: Chi-Square = 16,82, p < 0,001	21,1 with № 1: Chi-Square = 7,43, p = 0,007 with № 3: Chi-Square = 13,61, p < 0,001
Частота пневмонии, % Frequency of pneumonia, %	42,3	62,5 with № 1: Chi-Square = 13,67, p < 0,001	42,1 with № 2: Chi-Square = 7,97, p = 0,005	44,4
Частота развития легочной недостаточности, % Incidence of pulmonary insufficiency, %	11,5	25,0 with № 1: Chi-Square = 13,81, p < 0,001	0	11,1
Поражение тканей легких по данным компьютерной томографии (%), Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> ) Lung tissue damage according to computed tomography (%), Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	10,0 (7,0-20,0)	25,0 (25,0-32,5) with № 1: Chi-Square = 15,86, p < 0,001	7,5 (1,3-14,3) with № 2: Chi-Square = 12,77, p < 0,001	15,0 (3,0-23,8) with № 1: Chi-Square = 7,14, p = 0,008 with № 3: Chi-Square = 6,41, p = 0,012
Частота неврологических расстройств, % Frequency of neurological disorders, %	23,1	75,0 with № 1: Chi-Square = 30,38, p < 0,001	21,1 with № 2: Chi-Square = 22,58, p < 0,001	33,0 with № 1: Chi-Square = 9,56, p = 0,002 with № 3: Chi-Square = 6,19, p = 0,013
Частота anosмии, % Frequency of anosmia, %	53,9	62,5 with № 1: Chi-Square = 9,72, p = 0,002	89,5 with № 1: Chi-Square = 5,78, p = 0,017	66,7 with № 1: Chi-Square = 9,56, p = 0,002

Таблица 1 (продолжение)  
Table 1 (continued)

Исследованные показатели Investigated indicators	Риамилловир не принимали (26 человек) Группа № 1 Riamilovir was not taken (26 people) Group No. 1	Использовали риамилловир в профилактических целях (8 человек) Группа № 2 Riamilovir was used for preventive purposes (8 people) Group No. 2	Использовали риамилловир в процессе лечения COVID-19 (19 человек) Группа № 3 Riamilovir was used in the treatment of COVID-19 (19 people) Group No. 3	Использовали риамилловир в целях профилактики и лечения COVID-19 (9 человек) Группа № 4 Riamilovir was used for the prevention and treatment of COVID-19 (9 people) Group No. 4
Частота дисгевзии, % Frequency of dysgeusia, %	53,9	62,5 with № 1: Chi-Square = 9,72, p = 0,002	84,2 with № 1: Chi-Square = 4,80, p = 0,029	66,7 with № 1: Chi-Square = 9,56, p = 0,002
Частота развития острой почечной недостаточности, % Frequency of acute renal failure, %	3,8	0	0	0
Частота развития полиорганной недостаточности, % Frequency of development of multiple organ failure, %	7,7	0	0	0
Длительность госпитализации (суток), Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> ) Duration of hospitalization (days), Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	4 0-10	13 10-17 with № 1: Chi-Square = 13,11, p < 0,001	3 0-4 with № 2: Chi-Square = 10,71, p = 0,002	5 0-12
Длительность нетрудоспособности (суток), Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> ) Duration of disability (days), Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	22 18-28	24 17-30	19 14-21	22 15-30
Оценка тяжести инфекции: частота тяжелой инфекции, % Assessment of the severity of infection: the frequency of severe infection, %	15,4	37,5 with № 1: Chi-Square = 19,29, p < 0,001	0	33,3 with № 1: Chi-Square = 15,00, p < 0,001
Оценка тяжести инфекции: частота инфекции средней тяжести, % Assessment of the severity of infection: the frequency of occurrence of moderate infection, %	34,6	62,5 with № 1: Chi-Square = 16,87, p < 0,001	52,6 with № 1: Chi-Square = 3,89, p = 0,049 with № 2: Chi-Square = 5,34, p = 0,021	55,6

Таблица 1 (окончание)  
Table 1 (continued)

Исследованные показатели Investigated indicators	Риамилловир не принимали (26 человек) Группа № 1 Riamilovir was not taken (26 people) Group No. 1	Использовали риамилловир в профилактических целях (8 человек) Группа № 2 Riamilovir was used for preventive purposes (8 people) Group No. 2	Использовали риамилловир в процессе лечения COVID-19 (19 человек) Группа № 3 Riamilovir was used in the treatment of COVID-19 (19 people) Group No. 3	Использовали риамилловир в целях профилактики и лечения COVID-19 (9 человек) Группа № 4 Riamilovir was used for the prevention and treatment of COVID-19 (9 people) Group No. 4
Оценка тяжести инфекции: частота легкой инфекции, % Assessment of the severity of infection: the incidence of mild infection, %	42,3	0	47,4	0
Оценка тяжести инфекции: частота бессимптомного течения инфекции, % Assessment of the severity of infection: the frequency of asymptomatic infection, %	7,7	0	0	11,1 with № 1: Chi-Square = 6,34, p = 0,012

Примечание. With – в сравнении с группой, Me (median) – медиана,  $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$  – межквартильный размах.

Note. With, in comparison with the group; Me, median;  $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ , interquartile range.

зовавшей риамилловир, вместе с тем значимых отличий выявлено не было.

Сравнительный анализ данных группы № 4 показал (табл. 1, 2), что больные, применявшие риамилловир и для профилактики инфицирования, и в процессе лечения, чаще, чем респонденты группы № 1 во время болезни имели лихорадочное состояние (в 1,4 раза), одышку (на 16%), имели больший объем поражения тканей легких (в 1,5 раза), частоту неврологических расстройств (в 1,4 раза), аносмии/дисгевзии (на 24%), в 2,2 раза чаще, чем в группе № 1 расценивали инфекцию, как тяжелую. Случаев легкого течения также, как и в группе № 2 не наблюдалось. Постковидный синдром в группе № 4 характеризовался следующими особенностями. Несколько лучше восстановилось состояние через 2 месяца после COVID-19: о полной реабилитации заявили на 6% больше респондентов, чем в группе № 1, однако повышенная утомляемость сохранялась в 1,4 раза чаще, чем в контрольной группе. Впервые появившиеся заболевания после COVID-19 отмечались в группе № 4 в 3 раза чаще, чем в контрольной группе; хронические болезни не обострились ни разу, тогда как в группе № 1 этот факт зафиксирован более чем в 7% случаев. Частота случаев впервые появившихся болей в мышцах, суставах, позвоночнике после COVID-19 у пациентов 4-й

группы была несколько ниже, чем в контрольной группе (на 27%). Концентрация антител к вирусу SARS-CoV-2 была сходной с данными в группе № 1.

Риамилловир или метилтионитрооксодигидротриазолотриазинид натрия (Триазавирин) представляет собой синтетический аналог оснований пуриновых нуклеозидов (гуанина) и относится к препаратам прямого противовирусного действия. К настоящему моменту механизм действия реамилловира до конца не изучен, наиболее вероятным считается ингибирование протеиндисульфид-изомеразы, отвечающей за образование и изомеризацию дисульфидных связей. Данные молекулярного моделирования показали, что по-видимому существуют две возможные мишени: РНК-зависимая РНК-полимераза и 3С-подобная протеаза [6]. Вычислительные методы *in silico* выявили удовлетворительную аффинность связывания лиганда риамилловира со структурными (E)- и (S)-белками, неструктурной 3-химотрипсиноподобной протеазой (3-CLpro) SARS-CoV-2, а также человеческим ангиотензин-1 превращающим ферментом-2 [8], позволяющим, по-видимому, инактивировать вирус. Полученные в представленном исследовании данные по использованию риамилловира в целях профилактики заражения вирусом SARS-CoV-2 показало, что следствием

**ТАБЛИЦА 2. НЕКОТОРЫЕ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ РЕСПОНДЕНТОВ, ИСПОЛЬЗОВАВШИХ / НЕ ИСПОЛЬЗОВАВШИХ РИАМИЛОВИР ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19, ПОСЛЕ БОЛЕЗНИ**

TABLE 2. SOME CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL DATA OF RESPONDENTS WHO USED / DID NOT USE RIAMILOVIR FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF COVID-19, AFTER THE DISEASE

Исследованные показатели Investigated indicators	Риамиловир не принимали (26 человек) Группа № 1 Riamilovir was not taken (26 people) Group No. 1	Использовали риамиловир в профилактических целях (8 человек) Группа № 2 Riamilovir was used for preventive purposes (8 people) Group No. 2	Использовали риамиловир в процессе лечения COVID-19 (19 человек) Группа № 3 Riamilovir was used in the treatment of COVID-19 (19 people) Group No. 3	Использовали риамиловир в целях профилактики и лечения COVID-19 (9 человек) Группа № 4 Riamilovir was used for the prevention and treatment of COVID-19 (9 people) Group No. 4
<b>Постковидный синдром / Post-COVID syndrome</b>				
<b>Восстановление трудоспособности через 2 месяца после болезни: полное, %</b> Recovery of working capacity 2 months after the illness: complete, %	73,1	50,0	100	77,8 with № 1: Chi-Square = 7,68, p = 0,006
<b>Восстановление трудоспособности через 2 месяца после болезни: частичное, %</b> Recovery of working capacity 2 months after the illness: partial, %	23,1	25,0	0	22,2
<b>Восстановление трудоспособности через 2 месяца после болезни: не восстановилась, %</b> Recovery of working capacity 2 months after the illness: not recovered, %	3,9	25,0 with № 1: Chi-Square = 24,65, p < 0,001	0	0
<b>Частота случаев повышенной утомляемости через 2 месяца после болезни, %</b> Frequency of cases of increased fatigue 2 months after the disease, %	46,2	100 with № 1: Chi-Square = 23,23, p < 0,001	31,6 with № 2: Chi-Square = 21,89, p < 0,001	66,7 with № 1: Chi-Square = 12,06, p < 0,001 with № 3: Chi-Square = 11,47, p < 0,001
<b>Частота случаев появления новых заболеваний после COVID-19, %</b> Incidence of new diseases after COVID-19, %	3,8	25,0 with № 1: Chi-Square = 24,65, p < 0,001	5,3 with № 2: Chi-Square = 16,81, p < 0,001	11,1 with № 1: Chi-Square = 9,92, p = 0,002 with № 3: Chi-Square = 5,50, p = 0,019
<b>Варианты новых заболеваний после COVID-19</b> Variants of new diseases after COVID-19	<b>Аллергия</b> Allergy	<b>Снижение остроты зрения</b> Decreased visual acuity	<b>Снижение остроты зрения</b> Decreased visual acuity	<b>Бронхиальная астма</b> Bronchial asthma
<b>Частота случаев обострения хронических заболеваний после COVID-19, %</b> Frequency of cases of exacerbation of chronic diseases after COVID-19, %	7,7	25,0 with № 1: Chi-Square = 19,65, p < 0,001	5,3 with № 2: Chi-Square = 16,81, p < 0,001	0

Таблица 2 (окончание)  
Table 2 (continued)

Исследованные показатели Investigated indicators	Риамиловир не принимали (26 человек) Группа № 1 Riamilovir was not taken (26 people) Group No. 1	Использовали риамиловир в профилактических целях (8 человек) Группа № 2 Riamilovir was used for preventive purposes (8 people) Group No. 2	Использовали риамиловир в процессе лечения COVID-19 (19 человек) Группа № 3 Riamilovir was used in the treatment of COVID-19 (19 people) Group No. 3	Использовали риамиловир в целях профилактики и лечения COVID-19 (9 человек) Группа № 4 Riamilovir was used for the prevention and treatment of COVID-19 (9 people) Group No. 4
Частота случаев впервые появившихся болей в мышцах, суставах, позвоночнике после COVID-19, % Frequency of cases of first-time pain in muscles, joints, spine after COVID-19, %	42,3	100 with № 1: Chi-Square = 25,44, p < 0,001	10,5 with № 1: Chi-Square = 6,08, p = 0,014 with № 2: Chi-Square = 48,79, p < 0,001	33,3 with № 2: Chi-Square = 5,92, p = 0,016 with № 3: Chi-Square = 13,96, p < 0,001
<b>Серологические маркеры через 2 месяца после НКИ / Serological markers 2 months after a new coronavirus infection</b>				
IgM (BAU/мл), Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> ) IgM (BAU/mL), Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	0 0,0-5,0	0 0,0-3,0	0 0,0-7,0	0 0,0-5,5
IgG (BAU/мл), Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> ) IgG (BAU/mL), Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	17,4 (15,0-18,8)	17,0 (17,0-18,0)	5,2 (4,4-8,7) with № 2: Chi-Square = 11,01, p < 0,001	15,2 (14,8-16,3) with № 3: Chi-Square = 8,57, p = 0,004

Примечание. With – в сравнении с группой, Me (median) – медиана, Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub> – межквартильный размах, мл – миллилитр, BAU (binding antibody units) – единицы связывающих антител.

Note. With, in comparison with the group; Me, median; Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>, interquartile range; mL, milliliter; BAU, binding antibody units.

стало не просто увеличение длительности госпитализации, но и рост таких осложнений НКИ, как лихорадка, одышка, легочная недостаточность, пневмония легких, повышенная частота неврологических расстройств, о чем не сообщалось ранее. Перенесенное заболевание как тяжелое при профилактическом приеме риамиловира было оценено значительно чаще, а спустя 2 месяца после болезни реабилитационный период был незаконченным. У всех, кто принимал риамиловир для профилактики НКИ, в дальнейшем появлялась клиника мышечных и суставных болей, что было нами показано ранее [1]. Использование риамиловира с лечебной целью, т. е. в процессе НКИ, позволило избежать развития легочной недостаточности, тяжелого течения инфекционного заболевания, восстановить состояние здоровья в полном объеме. Помимо этого, применение риамиловира при лечении COVID-19 позволило в 4 раза снизить риск появления болей в мышцах, суставах, позвоночнике после COVID-19. Ограничением полученных данных является небольшая выборка исследования.

## Заключение

Использование риамиловира в целях профилактики инфицирования вирусом SARS-CoV-2 несет риски отдаленных (постковидных) осложнений течения заболевания, в том числе в виде дебютного появления болей в мышцах, суставах, позвоночнике. Применение риамиловира с лечебной целью позволяет избежать развития легочной недостаточности, тяжелого течения инфекционного заболевания, восстановить состояние здоровья в полном объеме и в 4 раза снизить риск появления болей в мышцах, суставах, позвоночнике после НКИ. Таким образом, наше исследование подтверждает возможную эффективность риамиловира в качестве лечебного, но не профилактического средства при НКИ. Между тем, настоящее исследование выполнено при использовании ограниченных по объему выборках пациентов, поэтому окончательное заключение относительно эффективности использования риамиловира при коронавирусных инфекциях может быть сделано только на основе систематических обзоров и данных метаанализа.

## Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность Министру здравоохранения Свердловской области к.м.н. А.А. Карлову, заведующей эпидемио-

логическим отделом ГАУЗ СО «ДГКБ № 9» г. Екатеринбург Т.А. Катунцевой, директору ФГБУН «ИИФ» УрО РАН д.ф.-м.н., профессору О.Э. Соловьевой за помощь в организации данного исследования.

## Список литературы / References

1. Бердюгина О.В., Гусев Е.Ю., Бердюгин К.А. Артралгия и другие патологии крупных суставов как следствие перенесенной новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Вестник уральской медицинской академической науки, 2022. Т. 19, № 3. С. 282-293. [Berdyugina O.V., Gusev E.V., Berdyugin K.A. Arthralgia and other pathologies of large joints as a consequence of a new coronavirus infection (COVID-19). *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 282-293. (In Russ.)]
2. Гайсёнок О.В. Применение ингибиторов вирусных РНК-полимераз в сочетании с ингибитором фузии в лечении пациентов с COVID-19: гипотеза. Вопросы вирусологии, 2020. Т. 65, № 3. С. 167-175. [Gaisenok O.V. The use of viral RNA polymerase inhibitors in combination with a fusion inhibitor in the treatment of patients with COVID-19: hypothesis. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2020, Vol. 65, no. 3, pp. 167-175. (In Russ.)]
3. Касьяненко К.В., Козлов К.В., Мальцев О.В., Лапиков И.И., Гордиенко В.В., Шарабханов В.В., Сорокин П.В., Жданов К.В. Оценка эффективности Риамиловира в комплексной терапии больных COVID-19. Терапевтический архив, 2021. Т. 93, № 3. С. 290-294. [Kasyanenko K.V., Kozlov K.V., Maltsev O.V., Lapikov I.I., Gordienko V.V., Sharabhanov V.V., Sorokin P.V., Zhdanov K.V. Evaluation of the effectiveness of Riamilovir in the complex therapy of patients with COVID-19. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2021, Vol. 93, no. 3, pp. 290-294. (In Russ.)]
4. Лиознов Д.А., Токин И.И., Зубкова Т.Г., Сорокин П.В. Практика применения отечественного противовирусного препарата в этиотропной терапии острой респираторной вирусной инфекции. Терапевтический архив, 2020. Т. 92, № 12. С. 160-164. [Lioznov D.A., Tokin I.I., Zubkova T.G., Sorokin P.V. The practice of using a domestic antiviral drug in the etiotropic therapy of acute respiratory viral infection. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2020, Vol. 92, no. 12, pp. 160-164. (In Russ.)]
5. Сабитов А.У., Сорокин П.В., Дашутина С.Ю. Опыт профилактического применения препарата Риамиловир в очагах коронавирусной инфекции (COVID-19). Терапевтический архив, 2021. Т. 93, № 4. С. 435-439. [Sabitov A.U., Sorokin P.V., Dashutina S.Y. Experience of the preventive use of the drug Riamilovir in the foci of coronavirus infection (COVID-19). *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2021, Vol. 93, no. 4, pp. 435-439. (In Russ.)]
6. Chupakhin O.N., Rusinov V.L., Varaksin M.V., Ulomskiy E.N., Savateev K.V., Butorin I.I., Du W., Sun Z., Charushin V.N. Triazavirin-A Novel effective antiviral drug. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 22, no. 23 (23), 14537. doi: 10.3390/ijms232314537.
7. Karpenko I., Deev S., Kiselev O., Charushin V., Rusinov V., Ulomsky E., Deeva E., Yanvarev D., Ivanov A., Smirnova O., Kochetkov S., Chupakhin O., Kukhanova M. Antiviral properties, metabolism, and pharmacokinetics of a novel azolo-1,2,4-triazine-derived inhibitor of influenza A and B virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, Vol. 54, no. 5, pp. 2017-2022.
8. Malík I., Čížmárik J., Kováč G., Pecháčová M., Hudecová L. Triazavirin might be the new hope to fight Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Ceska Slov. Farm.*, 2021, Vol. 70, no. 1, pp. 18-25.
9. Shahab S., Sheikhi M. Triazavirin – Potential Inhibitor for 2019-nCoV Coronavirus M Protease: A DFT Study. *Curr. Mol. Med.*, 2021, Vol. 21, no. 8, pp. 645-654.
10. Wu X., Yu K., Wang Y., Xu W., Ma H., Hou Y., Li Y., Cai B., Zhu L., Zhang M., Hu X., Gao J., Wang Y., Qin H., Wang W., Zhao M., Wu X., Zhang Y., Li L., Li K., Du Z., Mol B.W.J., Yang B. Efficacy and Safety of triazavirin therapy for coronavirus disease 2019: A pilot randomized controlled trial. *Engineering (Beijing)*, 2020, Vol. 6, no. 10, pp. 1185-1191.
11. Zabrodskaya Y.A., Shvetsov A.V., Tsvetkov V.B., Egorov V.V. A double-edged sword: supramolecular complexes of Triazavirine display multicenter binding effects which influence aggregate formation. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2019, Vol. 37, no. 12, pp. 3041-3047.

### Авторы:

**Бердюгина О.В.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

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

### Authors:

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

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

Поступила 09.05.2023  
Принята к печати 29.06.2023

Received 09.05.2023  
Accepted 29.06.2023

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГОРМОН- И ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ КУМУЛЮСНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЕЕ СВЯЗЬ С ФЕРТИЛЬНОСТЬЮ ПРИ СИНДРОМЕ ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ

Валикова О.В.<sup>1,2,4</sup>, Здор В.В.<sup>1,4</sup>, Тихонов Я.Н.<sup>1</sup>, Борода А.В.<sup>3</sup>,  
Грачева А.М.<sup>5</sup>, Колбин К.Г.<sup>5</sup>

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

<sup>2</sup> ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», г. Владивосток, Россия

<sup>3</sup> ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного  
отделения Российской академии наук, г. Владивосток, Россия

<sup>4</sup> Клиника диабета и эндокринных заболеваний, г. Владивосток, Россия

<sup>5</sup> Клиника репродукции и генетики Next Generation Clinic, г. Владивосток, Россия

**Резюме.** Кумулюсные клетки — специализированный слой фолликулярных клеток, находящихся в тесном контакте с ооцитом, считаются косвенными маркерами их качества. Изменения этих клеток свидетельствует о повреждении яйцеклетки. Определение показателей цитокинов в культуре кумулюсных клеток может предопределить возможности зачатия и развития беременности. Целью исследования было получение первичной культуры КК от здоровых доноров и пациенток с СПКЯ, выявление наиболее значимых отличий в синтезе ключевых цитокинов в монокультурах кумулюсных клеток пациенток и здоровых лиц для прогнозирования результатов экстракорпорального оплодотворения. Использовался метод клеточных культур — кумулюсные клетки здоровых доноров и пациенток с синдромом поликистозных яичников, полученные после проведения трансвагинальной пункции фолликулов в программе экстракорпорального оплодотворения, что не нарушало права эмбриона, так как на этапе проведения процедуры ЭКО и интрацитоплазматической инъекции сперматозоида, кумулюсные клетки не используются. Этический комитет протокол № 9 от 16.05.2022 г. В адгезивной культуре кумулюсных клеток методом ИФА на 1-е, 3-и, 7-е сутки эксперимента исследовались показатели IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  и прогестерона. Проводилось цитометрическое исследование кумулюсных клеток на 1-е, 3-и, 7-е сутки культивирования. Доказано — в адгезивной монокультуре кумулюсных

### Адрес для переписки:

Валикова Ольга Владимировна  
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
690012, Россия, г. Владивосток, ул. Фастовская, 14,  
кв. 184.  
Тел.: 8 (902) 521-77-72.  
E-mail: renalex.99@mail.ru

### Address for correspondence:

Olga V. Valikova  
Pacific State Medical University  
14 Fastovskaya St, Apt 184  
Vladivostok  
690012 Russian Federation  
Phone: +7 (902) 521-77-72.  
E-mail: renalex.99@mail.ru

### Образец цитирования:

О.В. Валикова, В.В. Здор, Я.Н. Тихонов, А.В. Борода,  
А.М. Грачева, К.Г. Колбин «Исследование гормон-  
и цитокинпродуцирующей функции кумулюсных  
клеток человека и ее связь с фертильностью при  
синдроме поликистозных яичников» // Российский  
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3.  
С. 233–240. doi: 10.46235/1028-7221-9999-SOT

© Валикова О.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

O.V. Valikova, V.V. Zdor, Ya.N. Tikhonov, A.V. Boroda,  
A.M. Gracheva, K.G. Kolbin “Studies on the hormone and  
cytokine producing function of human cumulus cells and its  
interrelation with fertility in polycystic ovarian syndrome”,  
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskij  
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 233–240. doi: 10.46235/1028-  
7221-9999-SOT

© Valikova O.V. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-9999-SOT

клеток продолжается секреция прогестерона, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ . В культуральной среде при СПКЯ на 7-е сутки происходило резкое возрастание уровня прогестерона ( $p < 0,01$ ), в отличие от доноров, где исходно увеличенное количество прогестерона значительно снижалось на 7-е сутки исследования. На 7-е сутки эксперимента в культуре кумулюсных клеток при СПКЯ значения IL-6, IL-10 увеличивались лишь двукратно, у здоровых доноров эти цитокины возрастали в 30 раз ( $p < 0,01$ ). За семь суток наблюдения происходило трехкратное снижение IFN $\gamma$  в культуре клеток при СПКЯ ( $p_{1-7} < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ) по сравнению с культурой здоровых клеток, где показатели цитокина наоборот – возрастали в 20 раз ( $p_{1-7} < 0,01$ ), что определяло общий баланс цитокинов и, вероятно, определяло прогноз по вынашиванию беременности. Заключение: значимые разнонаправленные изменения уровня цитокинов в культуре кумулюсных клеток при СПКЯ и у здоровых лиц, могут стать определяющими факторами в формировании бластоцисты и сохранении эмбриона. Дальнейшее изучение продукции цитокинов и половых стероидов КК особенно актуально на 5-7-е сутки, когда происходит отбор ооцитов для вступления в цикл экстракорпорального оплодотворения. Изучение морфофункциональных свойств малоизученных клеток кумулюса методом клеточных культур позволит глубже исследовать механизмы нарушения фолликулогенеза при СПКЯ и, тем самым улучшить репродуктивный прогноз при данной патологии.

*Ключевые слова:* синдром поликистозных яичников, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ , кумулюсные клетки, прогестерон

## STUDIES ON THE HORMONE AND CYTOKINE PRODUCING FUNCTION OF HUMAN CUMULUS CELLS AND ITS INTERRELATION WITH FERTILITY IN POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME

Valikova O.V.<sup>a, b, d</sup>, Zdor V.V.<sup>a, d</sup>, Tikhonov Ya.N.<sup>a</sup>, Boroda A.V.<sup>c</sup>, Gracheva A.M.<sup>e</sup>, Kolbin K.G.<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

<sup>b</sup> Regional Clinical Hospital No. 2, Vladivostok, Russian Federation

<sup>c</sup> A. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

<sup>d</sup> Clinic for Diabetes and Endocrine Diseases, Vladivostok, Russian Federation

<sup>e</sup> Clinic of Reproduction and Genetics "Next Generation Clinic", Vladivostok, Russian Federation

**Abstract.** Cumulus cells (CC) are the specialized layer of follicular cells that are in close contact with the oocyte. They are considered as indirect markers of the oocyte quality. Changes of these cells suggest a damage of the ovary. Determination of cytokines in cumulus cell culture may predict the chance for the conception and development of pregnancy. The objective of the present study was to obtain a primary culture of CC from healthy donors and patients with polycystic ovarian syndrome (PCOS), to identify the most significant differences in production of key cytokines in the CC monocultures of patients and healthy individuals in order to predict the results of *in vitro* fertilization. Materials and methods: the cell culture technique was used, i.e., cumulus cells of healthy donors and patients with polycystic ovary syndrome were obtained by transvaginal puncture of follicles in the *in vitro* fertilization (IVF) program. This procedure does not affect the rights of embryo, since the CC are not used at the stage of IVF procedure and intracytoplasmic sperm injection (Ethical Committee Protocol No. 9 of May 16, 2022). IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  and progesterone parameters were tested in adhesive cultures of CC by ELISA technique on days 1, 3, 7 of *in vitro* experiments. Results: We revealed a continuous secretion of progesterone, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  in adhesive monocultures of CC. In the patients with PCOS, we have found a sharp increase of progesterone level in cultural media ( $p < 0.01$ ) on the 7<sup>th</sup> day. By contrast, the initially increased progesterone levels proved to be significantly decreased in donors on the 7<sup>th</sup> day of culture. Moreover, in the culture of CC from patients with PCOS (7<sup>th</sup> day of the experiment), the values of IL-6, IL-10 increased only two-fold compared with 30-fold increase of these cytokines in healthy

donors ( $p < 0.01$ ). At the same term, we have observed a threefold decrease in  $IFN\gamma$  in the CC cultures of PCOS patients ( $p_{1-7} < 0.01$ ;  $p < 0.05$ ) compared with cultured controls, which showed a 20-fold increase ( $p_{1-7} < 0.01$ ), thus determining differences in total cytokine balance and, probably, influencing the pregnancy prognosis. Conclusion: Significant multidirectional changes of cytokine levels in the culture of cumulus cells of the patients with PCOS and in healthy individuals may be regarded as determining factors in formation of blastocyst and preservation of the embryo. A further *in vitro* research on the production of cytokines and sex steroids by CC is especially important on day 5 to 7, when the oocytes are selected for entry into the *in vitro* fertilization cycle. The study of morpho-functional properties of little-studied cumulus cells using the cell culture technique will enable us for a deeper study on the mechanisms of disturbed folliculogenesis in PCOS, and, thereby, improve the reproductive prognosis in this disorder.

*Keywords:* polycystic ovarian syndrome, IL-6, IL-10,  $IFN\gamma$ , cumulus cells, progesterone

## Введение

Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) является распространенным эндокринным и метаболическим заболеванием у репродуктивных женщин и характеризуется поликистозом яичников, гиперандрогенией и хронической ановуляцией [1]. Аномальный фолликулогенез считается общей характеристикой СПКЯ. Клинические и биохимические характеристики СПКЯ имеют типичную гетерогенность, но аномальное развитие фолликулов, вызывающее ановуляцию, является основной характеристикой СПКЯ [7]. В физиологично развивающемся фолликуле на этапе формирования полости внутри фолликула соматические клетки дифференцируются на два различных функционально и анатомических слоя: клетки выстилающие полость фолликула, ответственные за стероидогенез — клетки муральной гранулезы и кумулюсные клетки (КК), непосредственно контактирующие с ооцитом [2, 6]. КК находятся в тесном контакте с ооцитом, их морфофункциональные свойства влияют на качество яйцеклетки, поскольку отвечают за энергетический метаболизм, поддержку ионов, созревание и защиту женской гаметы, изменения в этих клетках могут нанести вред развитию фолликулов и свидетельствовать о повреждении яйцеклетки [11]. В физиологичных условиях КК будут сопровождать ооцит во время овуляции, при оплодотворении и в течение определенного времени после проникновения сперматозоида в яйцеклетку [2, 5, 6].

Возможность отделение клеток кумулюса от ооцита без нарушения его целостности во время проведения экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), делает возможность изучить клетки в культуре [11]. Применение ЭКО у пациенток с СПКЯ, не всегда дает положительный результат [15]. В настоящее время продолжают научные дискуссии об уровне прогестерона при СПКЯ и его влиянии на исход беременности [8, 13]. При проведении вспомогательных репро-

дуктивных технологий (ВРТ) обязательной считается оценка качества ооцитов перед переносом эмбрионов. Ооциты в метафазе II очень хрупкие, неоднократное морфологическое исследование напрямую ухудшает качество и влияет на процесс имплантации эмбриона. Поэтому поиск неинвазивных биомаркеров, характеризующих комплекс кумулюсных клеток и ооцита, весьма актуален и может предопределить улучшение результатов беременности при СПКЯ [13].

В исследовании 2012 года представлено доказательство положительного влияния добавления рекомбинантного IL-6 при культивировании *in vitro* свиных диплоидных партенотов до стадии бластоцисты, в результате увеличивалось количество бластоцист, уменьшался апоптоз, снижалась экспрессия мРНК проапоптотического гена Casp3, увеличивались экспрессии антиапоптотического гена Bcl2 и Survivin, тем самым повышая жизнеспособность свиных эмбрионов [12]. Эти данные концептуально не противоречат полученными нами результатов (табл. 1, 2). В 2018 г. исследователи на экспериментальной модели животных с индуцированным дегидроэпиандростероном СПКЯ, выявили более низкий уровень  $IFN\gamma$  по сравнению с контрольной группой животных [9]. Также зафиксирован более низкий уровень  $IFN\gamma$  в сыворотке крови женщин с СПКЯ, по сравнению со здоровыми женщинами, выявлено, что  $IFN\gamma$  способствует пролиферации, но ингибирует апоптоз гранулезных клеток яичника [9]. В ранее проведенных исследованиях [3, 4] выявлен более низкий уровень IL-10 у женщин с СПКЯ по сравнению с контрольной группой, при лечении IL-10 подавлялся стероидогенез и экспрессия воспалительных генов, что впоследствии может стать новым подходом к терапии СПКЯ [4]. Исследована роль передачи сигналов TGF- $\beta$  в регуляции опосредованной гиалуроновой кислотой экспансии кумулюса и овуляции в гранулезо-лютеиновых клетках человека. Молекулярные механизмы, с помощью которых TGF- $\beta$  регулирует синтез гиалуроно-

вой кислоты в клетках КК, до конца не ясны, но требуют изучения из-за своей значимости [14]. В исследовании 2018 года изучали влияние IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  на рост и созревание ооцитов из небольших фолликулов во время созревания *in vitro*, кумулюс-ооцитарные комплексы культивировали с добавлением IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  в течении 48 часов. В результате ооциты, культивируемые с добавлением IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ , имели больший диаметр в сравнении с контролем [10]. В ряде исследований [6, 8, 11] доказано, что на исход беременности влияют морфофункциональные свойства

КК, которые целесообразно изучать в культуре клеток, что может прояснить механизмы нарушений формирования эмбриона и увеличить процент положительных исходов беременности. Целью исследования было получение первичной культуры КК от здоровых доноров и пациенток с СПКЯ, выявление наиболее значимых отличий в синтезе ключевых цитокинов в монокультурах кумулюсных клеток пациенток и здоровых лиц для прогнозирования результатов экстракорпорального оплодотворения.

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ПРОГЕСТЕРОНА И ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ ПРИ СИНДРОМЕ ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ В РАЗНЫЕ СУТКИ ЭКСПЕРИМЕНТА**

TABLE 1. CONTENT OF PROGESTERONE AND CYTOKINES IN THE CULTURE MEDIUM IN POLYCYSTIC OVARY SYNDROME ON DIFFERENT DAYS OF THE EXPERIMENT

Показатель, нг/мл Index, ng/mL	1-е сутки 1 <sup>st</sup> day	3-и сутки 3 <sup>rd</sup> day	7-е сутки 7 <sup>th</sup> day	Значение p Value p
Прогестерон Progesteron	10,09 $\pm$ 0,14	82,70 $\pm$ 0,43	323,70 $\pm$ 5,43	p < 0,05, ( $\rho_{1-3, 3-7, 1-7}$ < 0,01)
IL-6	20,40 $\pm$ 0,52	32,70 $\pm$ 0,43	45,600 $\pm$ 0,423	p < 0,05; ( $\rho_{1-3, 1-7}$ < 0,05)
IL-10	3,66 $\pm$ 0,06	4,57 $\pm$ 0,05	6,56 $\pm$ 0,07	p < 0,05, ( $\rho_{1-7}$ < 0,05)
IFN $\gamma$	6,24 $\pm$ 0,03	3,26 $\pm$ 0,04	1,76 $\pm$ 0,01	p < 0,05 ( $\rho_{1-3, 3-7, 1-7}$ < 0,05)

Примечание. p – статистическая значимость различий (p < 0,05; p < 0,01 по t-критерию Стьюдента) между показателями у женщин при СПКЯ и у здоровых женщин ( $\rho_{1-3, 3-7, 1-7}$  – где  $\rho_{1-3, 3-7, 1-7}$  отличия между сутками в одном показателе в одной культуральной среде).

Note. p, statistical significance of differences (p < 0.05; p < 0.01 according to Student's t-test) between indicators in women with PCOS and in healthy women ( $\rho_{1-3, 3-7, 1-7}$  where  $\rho_{1-3, 3-7, 1-7}$  differences between days in one indicator in one culture medium).

**ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ПРОГЕСТЕРОНА И ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ В РАЗНЫЕ СУТКИ ЭКСПЕРИМЕНТА**

TABLE 2. CONTENT OF PROGESTERONE AND CYTOKINES IN THE CULTURE MEDIUM OF HEALTHY DONORS ON DIFFERENT DAYS OF THE EXPERIMENT

Показатель, нг/мл Index, ng/mL	1-е сутки 1 <sup>st</sup> day	3-и сутки 3 <sup>rd</sup> day	7-е сутки 7 <sup>th</sup> day	Значение p Value p
Прогестерон Progesteron	14,50 $\pm$ 0,36	110,00 $\pm$ 2,12	58,25 $\pm$ 0,40	p < 0,05; ( $\rho_{1-3, 3-7, 1-7}$ < 0,05)
IL-6	6,34 $\pm$ 0,30	16,35 $\pm$ 0,34	187,53 $\pm$ 0,65	p < 0,05; ( $\rho_{1-3, 3-7, 1-7}$ < 0,01)
IL-10	1,74 $\pm$ 0,57	2,37 $\pm$ 0,79	30,16 $\pm$ 0,80	p < 0,05; ( $\rho_{3-7, 1-7}$ < 0,01)
IFN $\gamma$	3,27 $\pm$ 0,04	1,24 $\pm$ 0,03	71,91 $\pm$ 0,31	p < 0,05; ( $\rho_{3-7, 1-7}$ < 0,01)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

## Материалы и методы

Проведение исследования одобрено Междисциплинарным этическим комитетом ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (протокол № 9 от 16.05.2022 г.). КК были получены от 11 здоровых доноров (средний возраст  $28,6 \pm 5,3$  года) и 10 пациенток с СПКЯ (средний возраст  $29,4 \pm 3,3$  года), обратившихся в клинику репродукции г. Владивостока и прошедших процедуру ЭКО/ИКСИ. Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. В работе использовали КК, которые стандартно утилизируют после проведения манипуляции отделения от ооцита, они не требуются в дальнейшей процедуре ЭКО/ИКСИ. Клетки получали после проведения трансвагинальной пункции в условиях стерильной операционной в асептических условиях. Стимуляцию яичников проводили перед забором материала по стандартным протоколам ЭКО путем введением рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека и высокоочищенного менопаузального гонадотропина человека в индивидуальных дозах согласно протокола введения антагонистов гонадотропин-рилизинг-гормона. Овуляцию индуцировали реузс-хорионическим гонадотропином (рчХГ), чтобы вызвать созревание ооцитов на 9-12-й день после первоначального введения гонадотропина. Забор ооцитов стандартно проводили в клинике репродукции человека с помощью трансвагинального УЗИ через 36 ч после введения рчХГ. Отделение КК от ооцита без нарушения его целостности позволяет использовать обычно утилизируемые КК для дальнейшего исследования, что никак не нарушает права эмбриона.

После забора ооцитов происходит механическое удаление окружающих ооцита соматических клеток — *corona radiata* и *cumulus oophorus*. Осаждали центрифугированием при 500 g в течение 5 минут при комнатной температуре (RT). Надосадочную жидкость удаляли, осадок клеток ресуспендировали в среде Искова (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco, США), содержащей 20% эмбриональной бычьей сыворотки, 1 раствор заменимых аминокислот (MEM NEAA, Gibco, США); 1,2 мМ  $\alpha$ -тиолицерола (Sigma-Aldrich, США), 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich), 100 ед/мл пенициллина (Sigma-Aldrich), 100 мкг/мл антимикробного агента Primocin™ (InvivoGen, США). Клетки распределяли в лунки 12-луночного планшета для адгезионных культур клеток (ТРР, Швейцария) с конечным объемом среды в лунке 1 мл. Культивирование проводили при  $+37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  и влажности 95%. Через 24 ч культивирования производили смену среды. Последующую смену среды производили на 3-и, 7-е сутки культивирования. В среде определяли

уровень прогестерона, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  на 1-е, 3-и, 7-е сутки культивирования. Ежедневное наблюдение за клетками осуществляли с помощью инвертированного микроскопа СКХ41 (Olympus, Япония), оснащенного системой фазового контраста. Съемку проводили камерой AxioCam5 (Carl Zeiss, Германия) с помощью лицензионного программного обеспечения Zen 2, Blue Edition (Carl Zeiss).

Анализ состояния клеток осуществляли с помощью окрашивания флуоресцентными красителями с последующей проточной цитометрией. Клетки открепляли из лунок планшета с помощью смеси 0,05% трипсина-0,02% EDTA (Sigma-Aldrich), осаждали центрифугированием при 500 g в течение 5 мин при RT. К осадкам клеток из индивидуальных лунок добавляли 100 мкл смеси красителей: 4',6-диамидино-2-фенилиндол (ДАПИ, Sigma-Aldrich) в конечной концентрации 1 мкг/мл для окрашивания погибающие клетки, H2DCFDA (Sigma-Aldrich) в конечной концентрации 10 мкг/мл для окрашивания клеток с функционально-активными митохондриями, TO-PRO-3™ (Thermo Scientific, США) в конечной концентрации 1 мкМ для окрашивания апоптотических клеток. Окрашивание производили в течение 10 мин при RT. После этого суспензии анализировали на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman-Coulter, США), подключенном к компьютеру с лицензионным программным обеспечением CytExpert (v.2.5, Beckman Coulter).

## Результаты и обсуждение

Показатели содержания в культуральных средах прогестерона, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  у здоровых доноров и при СПКЯ представлены в таблицах 1, 2. В исследовании установлено, что в получаемой адгезивной культуре КК продолжается синтез прогестерона, IL-6, IL-10 данными клетками (табл. 1, 2). Исключение составила культура клеток при СПКЯ, в которой продукция, IFN $\gamma$  прогрессивно снижалась по сравнению с контролем, и к 7-му дню эксперимента была зафиксирована на минимальном уровне (табл. 1).

При сравнимом исходном уровне прогестерона в обеих клеточных культурах — при СПКЯ и здоровых доноров, и на 3-и сутки эксперимента показатели гормона оставались соизмеримыми, но на 7-е сутки зафиксировано резкое возрастание значений прогестерона при СПКЯ ( $p < 0,01$ ), что вполне согласуется с данными исследований о негативном прогнозе ЭКО при СПКЯ при значимом нарастании значений прогестерона в крови пациенток [8, 15]. Ряд авторов указывали на сниженный потенциал развития ооцитов у пациенток с СПКЯ и его зависимости от уровня

прогестерона, который тесно связан с наступлением беременности, трансформацией эндометрия из пролиферативной стадии в секреторную, имплантацию и роста эмбриона [3, 8, 15]. Наши данные на монокультуре КК отчетливо доказывают эту зависимость от прогестерона, указанную в клинических исследованиях. Раннее повышение прогестерона при СПКЯ расширяет «окно рецептивности» эндометрия, что приводит к асинхронности между эндометрием и эмбрионом, и, следовательно, к неудаче имплантации и исхода беременности [8, 15]. Возможно, учитывая наши данные, гиперпродукция прогестерона обеспечивается КК, и ее ранняя верификация позволит таргетно корректировать проблему в будущем.

Содержание IL-6 при СПКЯ исходно значимо (более чем в 3 раза) превышало аналогичный показатель здоровых доноров (табл. 1, 2), но темпы нарастания цитокина у здоровых лиц были значимо выше, и через 7 дней эксперимента IL-6 у них зафиксирован в 4 раза выше, чем в группе СПКЯ. Этот феномен может свидетельствовать о релевантном истощении функционального потенциала КК. Аналогичная ситуация имела место в содержании IL-10 в культуральных средах: при исходно более высоком уровне цитокина при СПКЯ, темпы его нарастания и, следовательно, синтеза клетками при СПКЯ вначале замедля-

лись (к 3-м суткам), а затем резко снижались к 7-м суткам по сравнению со здоровыми женщинами (табл. 1, 2). Данные также подтверждают высказанное выше предположение о функциональном дефиците КК при СПКЯ в плане продукции цитокинов.

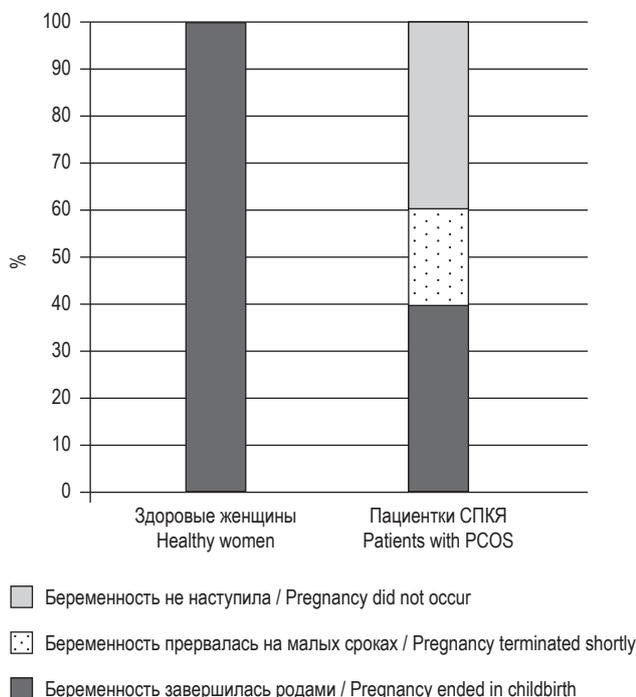
Содержание IFN $\gamma$  в культуре КК здоровых женщин было исходно в 2 раза ниже, чем при СПКЯ (табл. 1, 2). Однако на 7-е сутки, синтез IFN $\gamma$  клетками обеих групп резко снизился (табл. 1, 2). Более резкое и значимое снижение синтеза IFN $\gamma$  клетками при СПКЯ через неделю эксперимента нарушило исходно вполне релевантный баланс цитокинов: исходно соотношение IFN $\gamma$ /IL-10 при СПКЯ составило 1,7 против 1,88 у здоровых доноров. После 7 дней культивирования КК, баланс синтезируемых при СПКЯ цитокинов (IFN $\gamma$ /IL-10) резко снизился до 0,27 против 2,38 у здоровых лиц, что ясно демонстрирует глубину тканевого дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов при поликистозе яичников и истощение функциональных свойств КК при СПКЯ.

Значимые разнонаправленные изменения уровня цитокинов в монокультуре кумулюсных клеток при СПКЯ, по сравнению со здоровыми донорами, могут служить определяющими факторами формирования бластоцистов и, следовательно, исхода беременности при ЭКО. Дальнейшее изучение этого вопроса весьма актуально, так как именно на 5-7-е сутки формирования бластоцистов происходит отбор ооцитов для вступления в цикл экстракорпорального оплодотворения. Изменение показателей цитокинов в культуре клеток и результаты наступления беременности у этих женщин (рис. 1) дают возможность прогнозировать результаты вспомогательных репродуктивных технологий и, в дальнейшем, корректировать эти нарушения с помощью восстановления баланса цитокинов. Для пациенток с синдромом поликистозных яичников проведение успешной вспомогательной репродуктивной технологии является зачастую единственным шансом реализовать свой репродуктивный потенциал.

## Выводы

1. Содержание и синтез прогестерона в монокультурах кумулюсных клеток у здоровых женщин и пациенток с СПКЯ имеет значимые отличия, избыточная активация стероидпродуцирующей функции КК при СПКЯ продемонстрирована в резком возрастании значений прогестерона в этой культуре КК в сравнении со здоровыми клетками через 7 дней наблюдения.

2. Продукция и динамика синтеза IFN $\gamma$  в монокультурах кумулюсных клеток здоровых лиц и при СПКЯ имеет значимые отличия. Резкое



**Рисунок 1. Данные по результатам ЭКО у здоровых женщин, принимавших участие в исследовании, и при синдроме поликистозных яичников**

Figure 1. Data from IVF results in healthy women and those with polycystic ovary syndrome who participated in the study

снижение синтеза исходно более высокого  $IFN\gamma$  при СПКЯ через неделю эксперимента значимо нарушило баланс цитокинов – снизился показатель  $IFN\gamma / IL-10$  при СПКЯ в 8,8 раза по сравнению со здоровыми клетками, что ясно демонстрирует глубину тканевого дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов при поликистозе яичников и истощение цитокинпродуцирующих функциональных свойств КК при СПКЯ.

3. При анализе результатов синтеза  $IL-6$  в монокультурах кумулюсных клеток выявлены значимые отличия функции здоровых клеток: содержание  $IL-6$  при СПКЯ имело трехкратно превышение исходно, но темпы нарастания ци-

токина у здоровых КК за 7 дней превысили КК при СПКЯ и значимо возросли (в 4 раза) в конце эксперимента.

4. Синтез  $IL-10$  и его динамика в монокультурах кумулюсных клеток также имел значимые отличия – при более высоком исходном уровне цитокина при СПКЯ, темпы его нарастания и, следовательно, синтеза кумулюсными клетками в первые трое суток замедлялись, а затем резко снижались к 7-м суткам эксперимента по сравнению со здоровыми КК. Результаты исследования цитокинов в монокультурах ясно свидетельствуют о феномене активационного истощения КК при СПКЯ.

## Список литературы / References

1. Адамян Л.В., Андреева Е.Н., Абсаратова Ю.С., Гаспарян С.А., Григорян О.Р., Дедов И.И., Карахалис Л.Ю., Мельниченко Г.А., Сутурина Филиппов О.С., Чернуха Г.Е., Шереметьева Е.В., Ярмолинская М.И. Синдром поликистозных яичников в репродуктивном возрасте (современные подходы к диагностике и лечению): Клинические рекомендации (протокол лечения). М.: Минздрав России, 2021. 61 с. [Adamyan L.V., Andreeva E.N., Absatarova Yu.S., Grigoryan O.R., Dedov I.I., Karacharis L. Yu., Melnichenko G.A., Suturina L.V., Filippov O.S., Chernukha G.E., Sheremetyeva E.V., Yarmolinskaya M.I. Polycystic ovary syndrome in the reproductive age (modern approaches to diagnosis and treatment): Clinical recommendations (treatment protocol)]. Moscow: Ministry of Health of Russia, 2021. 61 p.
2. Arroyo A., Kim B., Yeh J. Luteinizing hormone action in human oocyte maturation and quality: signaling pathways, regulation, and clinical impact. *Reprod. Sci.*, 2020, Vol. 27, no. 6, pp. 1223-1252.
3. Artimani T., Karimi J., Mehdizadeh M., Yavangi M., Khanlarzadeh E., Ghorbani M., Asadi S., Kheiripour N. Evaluation of pro-oxidant-antioxidant balance (PAB) and its association with inflammatory cytokines in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gynecol. Endocrinol.*, 2018, Vol. 34, no. 2, pp. 148-152.
4. Chugh R.M., Park H.S., El Andaloussi A., Elsharoud A., Esfandyari S., Ulin M., Bakir L., Aboalsoud A., Ali M., Ashour D., Igboeli P., Ismail N., McAllister J., Al-Hendy A. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates metabolic dysfunction and restores fertility in a PCOS mouse model through interleukin-10. *Stem Cell Res. Ther.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 388. doi: 10.1186/s13287-021-02472-w.
5. Gilchrist R.B., Lane M., Thompson J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update*, 2008, Vol. 14, no. 2, pp. 159-177.
6. Huang Z., Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Mol. Hum. Reprod.*, 2010, Vol. 16, no. 10, pp. 715-725.
7. Huang X., Wu B., Chen M., Hong L., Kong P., Wei Z., Teng X. Depletion of exosomal circLDLR in follicle fluid derepresses miR-1294 function and inhibits estradiol production via CYP19A1 in polycystic ovary syndrome. *Aging (Albany NY)*, 2020, Vol. 12, no. 15, pp. 15414-15435.
8. Labarta E, Martínez-Conejero J.A., Alamá P., Horcajadas J.A., Pellicer A., Simón C., Bosch E. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis. *Hum. Reprod.*, 2011, Vol. 26, no. 7, pp. 1813-1825.
9. Li Y., Zheng Q., Sun D., Cui X., Chen S., Bulbul A., Liu S., Yan Q. Dehydroepiandrosterone stimulates inflammation and impairs ovarian functions of polycystic ovary syndrome. *J. Cell. Physiol.*, 2019, Vol. 234, no. 5, pp. 7435-7447.
10. Lima F., Bezerra F., Souza G.B., Matos M., van den Hurk R., Silva J. Influence of interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha on the in vitro growth, maturation and mitochondrial distribution of bovine oocytes from small antral follicles. *Zygote*, 2018, Vol. 26, no. 5, pp. 381-387.
11. Tahajjodi S.S., Farashahi Y.E., Agha-Rahimi A., Aflatoonian R., Khalili M.A., Mohammadi M., Aflatoonian B. Biological and physiological characteristics of human cumulus cells in adherent culture condition. *Int. J. Reprod. BioMed*, 2020, Vol. 18, no. 1, pp. 1-10.
12. Shen X.H., Cui X.S., Lee S.H., Kim N.H. Interleukin-6 enhances porcine parthenote development in vitro, through the IL-6/Stat3 signaling pathway. *J. Reprod. Dev.*, 2012, Vol. 58, no. 4, pp. 453-460.
13. Sayutti N., Abu M.A., Ahmad M.F. PCOS and role of cumulus gene expression in assessing oocytes quality. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2022, Vol. 13, 843867. doi: 10.3389/fendo.2022.843867.

14. Wang F, Chang H.M., Yi Y., Li H., Leung P.C.K. TGF- $\beta$ 1 promotes hyaluronan synthesis by upregulating hyaluronan synthase 2 expression in human granulosa-lutein cells. *Cell. Signal.*, 2019, Vol. 63, 109392. doi: 10.1016/j.cellsig.2019.109392.

15. Yang Y., Liu B., Wu G., Yang J.. Exploration of the value of progesterone and progesterone/estradiol ratio on the hCG trigger day in predicting pregnancy outcomes of PCOS patients undergoing IVF/ICSI: a retrospective cohort study. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2021, Vol. 19, no. 1, 184. doi: 10.1186/s12958-021-00862-6.

16. Wang T.J., Zhang F., Richards J.B., Kestenbaum B., van Meurs J.B., Berry D., Kiel D.P., Streeten E.A., Ohlsson C., Koller D.L., Peltonen L., Cooper J.D., O'Reilly P.F., Houston D.K., Glazer N.L., Vandenput L., Peacock M., Shi J., Rivadeneira F., McCarthy M.I., Anneli P., de Boer I.H., Mangino M., Kato B., Smyth D.J., Booth S.L., Jacques P.F., Burke G.L., Goodarzi M., Cheung C.L., Wolf M., Rice K., Goltzman D., Hidioglou N., Ladouceur M., Wareham N.J., Hocking L.J., Hart D., Arden N.K., Cooper C., Malik S., Fraser W.D., Hartikainen A.L., Zhai G., Macdonald H.M., Forouhi N.G., Loos R.J., Reid D.M., Hakim A., Dennison E., Liu Y., Power C., Stevens H.E., Jaana L., Vasani R.S., Soranzo N., Bojunga J., Psaty B.M., Lorentzon M., Foroud T., Harris T.B., Hofman A., Jansson J.O., Cauley J.A., Uitterlinden A.G., Gibson Q., Jarvelin M.R., Karasik D., Siscovick D.S., Econs M.J., Kritchevsky S.B., Florez J.C., Todd J.A., Dupuis J., Hyppönen E., Spector T.D. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: A genome-wide association study. *Lancet*, 2010, Vol. 376, pp. 180-188.

**Авторы:**

**Валикова О.В.** — врач-эндокринолог ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2»; Клиника диабета и эндокринных заболеваний, г. Владивосток, Россия

**Здор В.В.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач-эндокринолог, Клиника диабета и эндокринных заболеваний, г. Владивосток, Россия

**Тихонов Я.Н.** — старший преподаватель кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Борода А.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник, заместитель директора по научной работе ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, Россия

**Грачева А.М.** — главный врач, врач — акушер-гинеколог, Клиника репродукции и генетики Next Generation Clinic, г. Владивосток, Россия

**Колбин К.Г.** — к.б.н., эмбриолог, Клиника репродукции и генетики Next Generation Clinic, г. Владивосток, Россия

**Authors:**

**Valikova O.V.**, Clinical Endocrinologist, Pacific State Medical University; Regional Clinical Hospital No. 2; Clinic for Diabetes and Endocrine Diseases, Vladivostok, Russian Federation

**Zdor V.V.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Pacific State Medical University; Clinical Endocrinologist, Clinic for Diabetes and Endocrine Diseases, Vladivostok, Russian Federation

**Tikhonov Ya.N.**, Senior Lecturer, Department of Pathological Anatomy, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

**Boroda A.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Deputy Director for Research, A. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

**Gracheva A.M.**, Chief Physician, Obstetrician-Gynecologist, Clinic of Reproduction and Genetics "Next Generation Clinic", Vladivostok, Russian Federation

**Kolbin K.G.**, PhD (Biology), Embryologist, Clinic of Reproduction and Genetics "Next Generation Clinic", Vladivostok, Russian Federation

Поступила 15.05.2023

Отправлена на доработку 29.06.2023

Принята к печати 06.07.2023

Received 15.05.2023

Revision received 29.06.2023

Accepted 06.07.2023

## НАРУШЕНИЕ В-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И СВЯЗАННЫХ С НИМ НАРУШЕНИЙ ИММУНИТЕТА У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ

Добрынина М.А.<sup>1,2</sup>, Зурочка А.В.<sup>1,3</sup>, Комелькова М.В.<sup>1,3</sup>,  
Зурочка В.А.<sup>1,3</sup>, Сарапульцев А.П.<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup> ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», г. Челябинск, Россия

**Резюме.** Изменения В-клеточного ответа иммунной системы, описанные у больных COVID-19, являются недостаточно изученными у постковидных пациентов несмотря на то, что В-клетки играют важную роль в формировании постинфекционного иммунитета.

Целью исследования явилось изучение особенностей В-клеточного ответа иммунной системы у постковидных пациентов. С этой целью были исследованы, помимо стандартной иммунограммы, следующие фенотипы: В-клетки общие (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>), В-клетки памяти общие (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>), В-не клетки памяти общие (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>), В1-клетки памяти (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>), В2-клетки памяти (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>), В1-не клетки памяти (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD27<sup>-</sup>), В2-не клетки памяти (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD27<sup>-</sup>). Проведенное исследование у пациентов с постковидным синдромом с нарушением уровня В1-клеток памяти выявило резкое повышение данных клеток у 15,3% обследованных. Это сопровождалось увеличением общих В-клеток памяти и В1-общих лимфоцитов (преимущественно за счет В1-клеток памяти), повышенным уровнем общих Т-лимфоцитов и общего IgA. В то же время у данной группы пациентов отмечалось резкое снижение плазмочитов и В2-лимфоцитов (как клеток памяти, так и не клеток памяти), натуральных киллеров, Т-регуляторных клеток, Т-клеток ранней активации (CD25<sup>+</sup>) и С3а-фрагмента комплемента. Эти данные говорят о том, что у пациентов формируется особый тип нарушения иммунной системы, а именно дезорганизация переключения В-лимфоцитов с синтеза IgM на IgG и IgA, что приводит к резкому снижению В2-субпопуляций лимфоцитов. Возможно, такое нарушение связано с резким снижением Т-регуляторных лимфоцитов и Т-лимфоцитов, отвечающих

### Адрес для переписки:

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

### Address for correspondence:

Maria A. Dobrynina  
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch  
of the Russian Academy of Sciences  
106 Pervomaiskaya St  
Yekaterinburg  
620049 Russian Federation  
Phone: +7 (343) 374-00-70.  
E-mail: mzurochka@mail.ru

### Образец цитирования:

М.А. Добрынина, А.В. Зурочка, М.В. Комелькова,  
В.А. Зурочка, А.П. Сарапульцев «Нарушение  
В-клеточного звена иммунной системы и связанных  
с ним нарушений иммунитета у постковидных  
пациентов» // Российский иммунологический журнал,  
2023. Т. 26, № 3. С. 241-250.  
doi: 10.46235/1028-7221-9636-DIT

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

### For citation:

M.A. Dobrynina, A.V. Zurochka, M.V. Komelkova,  
V.A. Zurochka, A.P. Sarapultsev "Disturbances in the  
B cell component of immune system and associated immune  
alterations in post-COVID patients", Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,  
Vol. 26, no. 3, pp. 241-250.  
doi: 10.46235/1028-7221-9636-DIT

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

DOI: 10.46235/1028-7221-9636-DIT

за регуляцию формирования дифференцировки В-лимфоцитов с клеток, несущих IgM-рецепторы на клетки, синтезирующие IgG и IgA (Т-лимфоцитов ранней активации, несущих маркер к IL-2). Кроме того, у таких больных также наблюдается снижение параметров гемоглобина и тромбоцитов, что может в свою очередь способствовать у них проявлениям гипоксии и возможному нарушению системы свертывания крови.

Таким образом, данный фенотип нарушения иммунной системы у пациентов является более трудоемким в определении (так как требует нестандартных подходов к оценке иммунного статуса больных с постковидным синдромом нарушений иммунной системы), что, несомненно, усложняет обследование, но в то же время эти пациенты нуждаются в подборе иммунопрепаратов с целью иммунокоррекции данного нарушения. Полученные данные расширяют представление о формировании постковидных нарушений иммунной системы и требуют более глубокого изучения причин, приводящих к таким нарушениям.

*Ключевые слова:* В-лимфоциты, В1-лимфоциты, иммунная система, Т-лимфоциты, Treg-лимфоциты, общий анализ крови, SARS-CoV-2 инфекция, постковидные пациенты

## **DISTURBANCES IN THE B CELL COMPONENT OF IMMUNE SYSTEM AND ASSOCIATED IMMUNE ALTERATIONS IN POST-COVID PATIENTS**

**Dobrynina M.A.<sup>a, b</sup>, Zurochka A.V.<sup>a, c</sup>, Komelkova M.V.<sup>a, c</sup>,  
Zurochka V.A.<sup>a, c</sup>, Sarapultsev A.P.<sup>a, c</sup>**

<sup>a</sup> *Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation*

<sup>b</sup> *A. Burnazyan Russian State Research Center – Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russian Federation*

<sup>c</sup> *South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation*

**Abstract.** There is only limited data on B-cell response in post-COVID patients despite its importance in studying the post-infection immunity. The present study aimed to investigate the features of the B-cell response in post-COVID patients, focusing on various B cell phenotypes. Along with the standard immunogram, the following cell phenotypes were examined: common B cells (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>); common memory cells (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>); common non-memory cells (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>); B1 memory cells (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>); B2 memory cells (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>); B1 non-memory cells (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD27<sup>-</sup>); and B2 non-memory cells (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD27<sup>-</sup>). The study revealed a sharp increase in B1 memory cells in 15.3% of post-COVID patients with impaired levels of B1 memory cells. This increase was accompanied by elevated levels of total B memory cells, B1 total lymphocytes (mainly, B1 memory cells), total T lymphocytes, and total IgA. By contrast, the patients with impaired B1 memory cells exhibited a sharp decrease in plasma cells, B2 lymphocytes (both memory and non-memory cells), natural killer cells, T regulatory cells, early activation T cells (CD25<sup>+</sup>), and C3a complement fragment. These findings suggest a unique immune system disorder characterized by dysregulated B lymphocyte switching from IgM to IgG and IgA synthesis, thus resulting in marked decrease in B2 lymphocyte subpopulations. This disorder may be associated with reduced T regulatory lymphocytes and early activation of T lymphocytes responsible for regulating B lymphocyte differentiation. Furthermore, the patients also exhibited reduced hemoglobin and platelet parameters, thus, potentially, contributing to hypoxia and blood clotting abnormalities. Thus, the phenotype identification of these immune system disorders in post-COVID patients requires non-standard approaches to assessing immune status, thus complicating clinical examination, but highlighting the need for immunocorrective therapies. These findings contribute to better understanding of post-COVID immune system disorders and require further investigation into the underlying causal factors.

*Keywords:* B cells, B1 lymphocytes, immune system, T lymphocytes, T regulatory lymphocytes, complete blood count, SARS-CoV-2 infection, post-COVID patients

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

## Введение

Пандемия, вызванная вирусом SARS-CoV-2, привела к значительному росту числа пациентов с широким спектром персистирующих симптомов (усталость, одышка, лихорадка, кашель, миалгии, нервно-психические заболевания), характеризующихся длительностью их течения, что оказывает существенное влияние на здоровье населения [10, 11, 16] и создает значительную нагрузку на системы здравоохранения [7].

Литературные данные свидетельствуют о том, что причиной таких постинфекционных синдромов может являться длительное нарушение регуляции иммунного ответа. Данные литературы свидетельствуют о целом комплексе фенотипических и функциональных изменений В- и Т-клеток по всей траектории иммунного ответа на SARS-CoV-2, от острого заболевания до клинического выздоровления, зачастую сохраняющемся до 6-8 месяцев после реконвалесценции [17]. Данные изменения обычно включают в себя сдвиги в популяциях врожденных и адаптивных иммунных клеток CD45 и повышение уровня маркеров активации и истощения на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетках людей [9]. Интересно, что среди людей, перенесших COVID-19, те, кому в последующем был поставлен диагноз лонг-ковида (longcovid) характеризовались высокой активностью клеток врожденного иммунного ответа на фоне практически полного отсутствия наивных Т- и В-клеток, и демонстрировали повышенную экспрессию IFN I типа (IFN $\beta$ ) и IFN III типа (IFN $\lambda$ 1), которая оставалась стабильно высокой даже через 8 месяцев с момента установки диагноза [15].

В то время как большинство исследований, посвященных иммунным нарушениям у лиц с постострыми последствиями COVID-19, направлено на изучение клеток врожденного иммунитета и популяций Т-лимфоцитов [18], повреждению В-клеточного звена иммунной системы, который определяет продолжительность и широту защитного иммунитета, уделено недостаточно внимания. SARS-CoV-2 вызывает стойкий ответ В-клеток [13], но уровни антител со временем снижаются, что повышает риск ослабления иммунитета, поскольку титр нейтрализующих антител снижается ниже порогового значения, необходимого для защиты от повторного заражения [8]. Реакция В-клеток памяти, специфичная

для SARS-CoV-2, увеличивается в течение первых 4-5 месяцев после заражения, прежде чем стабилизируется [13], однако специфичные для SARS-CoV-2 плазматические клетки сохраняются в костном мозге между 7 и 11 месяцами после заражения, поддерживая уровни сывороточных антител [19].

В тех работах, которые были посвящены долгосрочным В-клеточным ответам [9] также было показано усиление активации В-клеток, определяемое повышением часто ты маркеров CD95<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> и PD1<sup>+</sup>, которое с течением времени возвращается к нормальным значениям; однако устойчивое присутствие В-клеток FCRL4<sup>+</sup> и PD1<sup>+</sup> у таких пациентов предполагает сохранение их дисрегуляции [9]. Крайне важно, что содержание антигенспецифичных В-клеток памяти к SARS-CoV-2 обычно пропорционально тяжести COVID-19, и в группе с тяжелым течением заболевания, как правило, наблюдается более высокое содержание всех В-клеток памяти IgM<sup>+</sup>, IgA<sup>+</sup> и IgG<sup>+</sup> по сравнению с другими группами [12], что придает их изучению особенную значимость.

В наших предыдущих исследованиях было показано, что у пациентов, перенесших острый COVID-19, отмечается три вида нарушений иммунной системы, выделенных нами в отдельные фенотипы (поражение НК-клеток, цитотоксических клеток и клеток, несущих рецептор CD46<sup>+</sup>) [1, 2, 3]. В то же время исследование В-клеток отдельно не проводилось, что и сформировало цель данной работы, которая заключается в изучении В-клеточного роста иммунной системы у постковидных пациентов и особенностей нарушений иммунной системы у таких больных.

## Материалы и методы

Было обследовано 98 пациентов, перенесших SARS-CoV-2-инфекцию. Критерием включения в группы исследований были: подтвержденный диагноз SARS-CoV-2-инфекции методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), наличие IgA, IgM, IgG к вирусу SARS-CoV-2 инфекции, данные компьютерной томографии о перенесенной пневмонии (варианты: поражение от 25% легких до 75% легких). Кроме того, критериями включения являлись наличие жалоб на усталость, боль, симптомы, возникающие после физической нагрузки, изменения в работе и/или учебе, нарушение работы сердечно-сосудистой, нервной систем, наличие когнитивных, психических и физических нарушений [6, 14].

Исследование проводилось не менее чем через 6 месяцев после перенесенной пневмонии вызванной SARS-CoV-2 инфекцией. Все пациенты были предварительно обследованы врачом-тера-

певтом и иммунологом-аллергологом для выявления сопутствующих заболеваний.

Определение групп сравнения проводилось по уровню В1-клеток памяти. В качестве референсных интервалов и пороговых значений В1-клеток памяти были приняты данные, представленные в монографии Зурочка А.В. и соавт. (2018) [4]. Кроме того, группы были рандомизированы по полу, возрасту, сопутствующим заболеваниям по критерию  $\chi^2$ . Таким образом, нами было выделено 2 группы сравнения: группа 1 – постковидные пациенты с повышенным уровнем В1-клеток памяти ( $n = 15$ ), группа 2 – постковидные пациенты с нормальным уровнем В1-клеток памяти ( $n = 83$ ).

Все исследования были одобрены Независимым локальным этическим комитетом при ГАУЗ ОТКЗ «Городская клиническая больница № 1» г. Челябинска (протокол № 8 от 11.04.2022), на базе которой проводились данные исследования.

#### Иммунологические исследования

Оценка иммунного статуса осуществлялась методом проточной цитометрии на цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter, США) по стандартизированной технологии оценки лимфоцитарного звена иммунитета [4, 5].

В ходе исследования были определены следующие параметры: CD45<sup>+</sup> и CD46<sup>+</sup> (панлейкоцитарный маркер для гейтирования лимфоцитов), CD45<sup>+</sup> (CD46<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup> (Т-лимфоциты), CD45<sup>+</sup> (CD46<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> (хелперы-индукторы), CD45<sup>+</sup> (CD46<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> (цитотоксические Т-лимфоциты), CD45<sup>+</sup> (CD46<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> (ТНК-клетки) CD45<sup>+</sup> (CD46<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> (натуральные киллеры), CD45<sup>+</sup> (CD46<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> (В-лимфоциты), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup> (Т-регуляторные клетки/супрессоры), CD45<sup>+</sup> (CD46<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> (активированные хелперы, ранняя активация лимфоцитов), CD45<sup>+</sup> (CD46<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup>, HLA-DR (активированные Т-лимфоциты – поздняя активация лимфоцитов), В-клетки памяти общие (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>), В не клетки памяти общие (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>), В1-клетки памяти (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>), В2 клетки памяти (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>), В1 не клетки памяти (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD27<sup>-</sup>), В2 не клетки памяти (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD27<sup>-</sup>) (Beckman Coulter, BioLegend, США).

Уровни общих IgM, IgG, IgA, специфических IgM, IgG, IgA к коронавирусу COVID-19, С1-ингибитора, С3а- и С5а-компонентов комплемента проводилось методом иммуноферментного на иммуноферментном анализаторе Multiscan FC Thermo Scientific (Китай) с использованием наборов реагентов «Вектор-Бест» (Россия).

#### Гематологические исследования

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

#### Статистическая обработка данных

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

## Результаты и обсуждение

При делении общей выборки исследованных постковидных пациентов по уровню В1-клеток памяти было выявлено, что у 15,3% наблюдался повышенный абсолютный и относительный уровень В1-клеток памяти по сравнению с группой с нормальным их содержанием (табл. 1). Это повышение сопровождалось трехкратным увеличением количества общих В-клеток памяти и четырехкратным – В1-общих лимфоцитов (преимущественно за счет В1-клеток памяти).

В то же время у этих пациентов обнаружено снижение более чем в 4 раза субпопуляции общих В2-лимфоцитов, которое происходило как за счет снижения В2-лимфоцитов клеток памяти, так и В2-лимфоцитов не клеток памяти (табл. 1). Кроме того, у пациентов с повышенным уровнем В1-клеток памяти отмечено усиление продукции IgA (рис. 1).

Анализ полученных показателей выявил нарушение врожденных факторов иммунной системы. Так, у пациентов, перенесших COVID-19, с повышенным уровнем В1-клеток памяти отмечено значимое абсолютное и относительное снижение уровня натуральных киллеров CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> CD 56<sup>+</sup> (NK-киллеры, абс.,  $10^6$  кл/л – группа 1:  $208,8 \pm 20,65$ ; группа 2:  $269,35 \pm 20,25$ ; NK-киллеры, отн. % – группа 1:  $9,17 \pm 1,16$ ; группа 2:  $12,32 \pm 0,74$ ). Вместе с тем, у этих пациентов обнаружено снижение на 13% С3а-фрагмента комплемента относительно группы постковидных пациентов с нормальным уровнем В1-клеток памяти (группа 1:  $100,29 \pm 4,26$ ; группа 2:  $114,78 \pm 2,92$ ).

Исследование популяции Т-лимфоцитов у постковидных пациентов группы 1 выявило повышение ее уровня по сравнению с группой 2, а также изменения в субпопуляционном составе. Так, у пациентов с повышенным содержанием В1-клеток памяти отмечено снижение в 1,3 раза

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ УРОВНЯ В1-КЛЕТОК ПАМЯТИ**

TABLE 1. CONTENT OF B LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN POST-COVID PATIENTS WITH A VIOLATION OF THE LEVEL OF B1 MEMORY CELLS

Показатели иммунной системы Immune system indicators	Группа 1. Постковидные пациенты с повышенным уровнем В1-клеток памяти Group 1. Post-COVID patients with increased levels of B1 memory cells n = 15	Группа 2. Постковидные пациенты с нормальным уровнем В1-клеток памяти Group 2. Post-COVID patients with normal levels of B1 memory cells n = 83
<b>В-лимфоциты клетки памяти общие (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), отн. (%)</b> Memory cell B lymphocytes, total (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> ), rel. (%)	6,74±0,93*	2,77±0,19
<b>В-лимфоциты клетки памяти общие (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), абс. (10<sup>6</sup> кл/л)</b> B lymphocytes, memory cells, total (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> ), abs. (10 <sup>6</sup> cell/L)	168,13±33,34*	61,43±4,92
<b>В-лимфоциты не клетки памяти общие (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), отн. (%)</b> B lymphocytes, not memory cells, total (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> ), rel. (%)	3,207±0,530*	7,75±0,50
<b>В-лимфоциты не клетки памяти общие (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), абс. (10<sup>6</sup> кл/л)</b> B lymphocytes, not memory cells, total (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> ), abs. (10 <sup>6</sup> cell/L)	69,80±10,13*	169,30±12,75
<b>В1-лимфоциты клетки памяти (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), отн. (%)</b> B1 lymphocytes, memory cell (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> ), rel. (%)	6,21±0,86*	0,37±0,04
<b>В1-лимфоциты клетки памяти (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), абс. (10<sup>6</sup> кл/л)</b> B1 lymphocytes, memory cell (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> ), abs. (10 <sup>6</sup> cell/L)	154,80±30,56*	7,67±0,77
<b>В1-лимфоциты общие (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>), отн. (%)</b> B1 lymphocytes, total (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> ), rel. (%)	8,17±0,75*	2,02±0,16
<b>В1-лимфоциты общие (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>), абс. (10<sup>6</sup> кл/л)</b> B1 lymphocytes, total (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> ), abs. (10 <sup>6</sup> cell/L)	196,20±29,13*	42,47±3,46
<b>В2-лимфоциты клетки памяти (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), отн. (%)</b> Memory cell B2 lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> ), rel. (%)	0,53±0,10*	2,46±0,17
<b>В2-лимфоциты клетки памяти (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), абс. (10<sup>6</sup> кл/л)</b> Memory cell B2 lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> ), abs. (10 <sup>6</sup> cell/L)	13,07±3,18*	54,69±4,52
<b>В2-лимфоциты не клетки памяти (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), отн. (%)</b> B2 lymphocytes are not memory cells (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> ), rel. (%)	1,25±0,29*	6,06±0,41

Таблица 1 (окончание)  
Table 1 (continued)

Показатели иммунной системы Immune system indicators	Группа 1. Постковидные пациенты с повышенным уровнем В1-клеток памяти Group 1. Post-COVID patients with increased levels of B1 memory cells n = 15	Группа 2. Постковидные пациенты с нормальным уровнем В1-клеток памяти Group 2. Post-COVID patients with normal levels of B1 memory cells n = 83
<b>В2-лимфоциты не клетки памяти (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>), абс. (10<sup>6</sup> кл/л)</b> B2 lymphocytes, not memory cells (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup> ), abs. (10 <sup>6</sup> cell/L)	25,51±7,55*	134,18±10,81
<b>В2-лимфоциты общие (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>), отн. (%)</b> <b>B2 lymphocytes, total (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>), rel. (%)</b>	1,78±0,28*	8,53±0,46
<b>В2-лимфоциты общие (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>), абс. (10<sup>6</sup> кл/л)</b> B2 lymphocytes, total (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> ), abs. (10 <sup>6</sup> cell/L)	41,93±7,87*	189,0±12,99

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

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

Т-регуляторных клеток и в 1,6 раза Т-клеток ранней активации лимфоцитов (CD25<sup>+</sup>) (табл. 2).

При анализе показателей тромбоцитарного роста кроветворения у пациентов с повышенным уровнем В1-клеток памяти выявлено снижение среднего объема тромбоцитов (группа 1: 7,32±0,3; группа 2: 7,99±0,11). Кроме того, у таких больных наблюдается снижение параметров гемоглобина: среднего корпускулярного объема гемоглобина (группа 1: 28,03±0,62; группа 2: 29,67±0,28) и средней концентрации корпуску-

лярного гемоглобина (группа 1: 332,27±1,15; группа 2: 340,85±1,12). Данные изменения в системе эритроцитарного и тромбоцитарного роста кроветворения могут способствовать проявлениям гипоксии и нарушению системы свертывания крови.

В целом наше исследование подтверждает литературные данные о наличии устойчивого изменения лимфоцитов после перенесенного COVID-19 [13, 17]. Более того, нами были выделены дистинктные фенотипы по ответу иммунной системы у постковидных больных. В этом ключе интересно сопоставить наши результаты с работой Shuwa H.S. (2021), в которой также было выделено три 3 подгруппы выздоравливающих пациентов на основе различных фенотипов лимфоцитов, при этом выявление одной из них четко ассоциировалось с худшим клиническим исходом [1, 2, 3, 17]. Так, в данной работе группа 1 характеризовалась высокой экспрессией транспортирующих молекул и увеличенной долей наивных В- и Т-клеток; группа 2 – высокой долей IgA<sup>+</sup> и IgG<sup>+</sup>, В-клеток и В-клеток памяти (как переключаемых, так и не переключаемых); а группа 3 показала повышенное содержание цитотоксических Т-клеток, CD8<sup>+</sup>TEMRA и цитокинов типа 1 как CD8<sup>+</sup>, так и CD4<sup>+</sup>Т-клеток и характеризовалась худшей клинической картиной [17].

Интересно, что пациенты группы 2 (наиболее близкой к выявленной нами) по анамнестическим и демографическим характеристикам не отличались от группы 3, но имели существенно

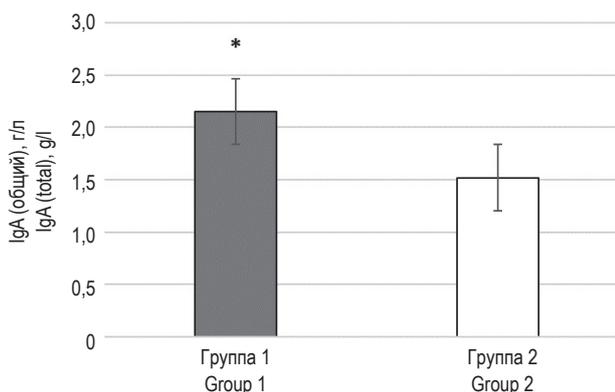


Рисунок 1. Уровень общего IgA у постковидных пациентов с нарушением уровня В1-клеток памяти

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

Figure 1. Level of total IgA in post-COVID patients with impaired levels of B1 memory cells

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

**ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ УРОВНЯ В1-КЛЕТОК ПАМЯТИ**

TABLE 2. CONTENT OF SUBPOPULATIONS OF T LYMPHOCYTES IN POST-COVID PATIENTS WITH A VIOLATION OF THE LEVEL OF B1 MEMORY CELLS

Показатели иммунной системы Immune system indicators	Группа 1. Постковидные пациенты с повышенным уровнем В1-клеток памяти Group 1. Post-COVID patients with increased levels of B1 memory cells n = 15	Группа 2. Постковидные пациенты с нормальным уровнем В1-клеток памяти Group 2. Post-COVID patients with normal levels of B1 memory cells n = 83
<b>Общее число Т-лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>), отн. (%)</b> Total number of T lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> ), rel. (%)	77,05±1,47*	71,75±0,95
<b>Общее число Т-лимфоцитов (CD46<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>), абс. (10<sup>6</sup> кл/л)</b> Total number of T lymphocytes (CD46 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> ), abs. (10 <sup>6</sup> cell/L)	1806,33±161,03*	1576,26±63,78
<b>Т-лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) ранняя активация, отн. %</b> T lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ) early activation, rel. %	4,51±0,71*	7,63±0,35
<b>Т-лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) ранняя активация, абс. (10<sup>6</sup> кл/л)</b> T lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ) early activation, abs. (10 <sup>6</sup> cell/L)	46,20±6,66*	75,52±4,55
<b>Т-регуляторные лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) отн. %</b> T regulatory lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> ) rel. %	1,63±0,17*	2,16±0,17
<b>Т-регуляторные лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) абс. (10<sup>6</sup> кл/л)</b> T regulatory lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> ) (10 <sup>6</sup> cell/L)	17,20±1,36*	22,624±1,760

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

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

более благоприятную (по данным рентгена) клиническую картину. В силу этого можно говорить, что именно особенности иммунного ответа являлись фактором, определяющим процесс выздоровления.

По-видимому, у пациентов, с повышенным уровнем В1-клеток памяти сформировался особый тип нарушения иммунной системы, заключающийся в дезорганизации переключения В-лимфоцитов с синтеза IgM на IgG и IgA, что привело к резкому снижению В2-субпопуляций лимфоцитов. Возможно, такое нарушение связано с резким снижением Т-регуляторных лимфоцитов и Т-лимфоцитов, отвечающих за регуляцию дифференцировки В-лимфоцитов с клеток, несущих IgM-рецепторы, на клетки, синтезирующие IgG и IgA (Т-лимфоцитов ранней активации,

несущих маркер к IL-2). Необходимо отметить, что представленность изотипов Ig среди популяции В-клеток памяти, специфичных для SARS-CoV-2, меняется со временем [8], что является как ограничением данного исследования, так и причиной возможных расхождений с другими авторами, которые исследовали больных в другие временные периоды.

В целом настоящее исследование подтверждает данные о наличии фенотипических и функциональных изменений в В- и Т-клетках по всей траектории иммунного ответа и выявляет комплекс изменений лимфоцитов у выздоравливающих пациентов с COVID-19 [17], который может быть ассоциирован с развитием долгосрочных осложнений в виде антипатогенных или аутово-

спалительных реакций и требовать адресной иммунокоррекции.

## Выводы

1. У 15,3% пациентов с постковидным синдромом нарушения иммунной системы выявляется резкое увеличение В1-клеток памяти.
2. Повышение В1-клеток памяти сопровождается увеличением В1-общих клеток (за счет В1-клеток памяти), уровня общих Т-лимфоцитов, уровня IgA, но резко снижается В-лимфоцитов

не клеток памяти, В2-лимфоцитов как клеток памяти, так и не клеток памяти, уровень натуральных киллеров, Т-регуляторных клеток, Т-клеток ранней активации лимфоцитов (CD25<sup>+</sup>), уровень С3а-фрагмента комплемента.

3. У больных с повышенным содержанием В1-клеток памяти также наблюдается снижение параметров гемоглобина и тромбоцитов.
4. Все эти изменения формируют новый, неизвестный ранее фенотип повреждения иммунной системы у постковидных пациентов.

## Список литературы / References

1. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Комелькова М.В., Ло Ш. Исследование нарушения натуральных киллеров у пациентов, перенесших Covid-19 // Российский иммунологический журнал 2022. Т. 25, № 2. С. 161-166. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Komelkova M.V., Lo Sh. Study of natural killer cell dysfunction in post-Covid-19 patients. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology* 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 161-166. (In Russ.)]. doi: 10.46235/1028-7221-1132-ION.
2. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Комелькова М.В., Ло Ш., Зурочка В.А., Ху Д., Рябова Л.В., Сарапульцев А.П. Исследование экспрессии CD45<sup>+</sup> и CD46<sup>+</sup> на субпопуляциях лимфоцитов периферической крови постковидных пациентов // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 431-436. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Komelkova M.V., Lo Sh., Zurochka V.A., Khu D., Ryabova L.V., Sarapultsev A.P. Study of CD45<sup>+</sup> and CD46<sup>+</sup> expression on subpopulations of peripheral blood lymphocytes in post-COVID patients. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 431-436. (In Russ.)]. doi: 10.46235/1028-7221-1160-SOC.
3. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Комелькова М.В., Ло Ш., Семенова Д.А. Оценка взаимосвязи нарушения цитотоксических Т-лимфоцитов с другими компартментами иммунной системы у постковидных пациентов // Вестник уральской медицинской академической науки, 2022. Т. 19, № 3. С. 294-303. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Komelkova M.V., Luo S., Semenova D.A. Evaluation of the relationship between cytotoxic T-lymphocyte disorders and other compartments of the immune system in post-covid patients. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 294-303. (In Russ.)]
4. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in biomedical research]. Ekaterinburg: RIO, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018. 720 p.
5. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал, 2014, Т. 8 (17), № 4. С. 974-992. [Khaidukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. Standardized technology "Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytofluorometer-analyzers". *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 974-992. (In Russ.)]
6. Agergaard J., Ullahammer W.M., Gunst J.D., Østergaard L., Schiøttz-Christensen B. Characteristics of a danish post-COVID cohort referred for examination due to persistent symptoms six months after mild acute COVID-19. *J. Clin. Med.*, 2022, Vol. 11, no. 24, 7338. doi: 10.3390/jcm11247338.
7. Chippa V, Aleem A, Anjum F. Post Acute Coronavirus (COVID-19) Syndrome. 2023 Feb 3. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan.
8. Dan J.M., Mateus J., Kato Y., Hastie K.M., Yu E.D., Faliti C.E., Grifoni A., Ramirez S.I., Haupt S., Frazier A., Nakao C., Rayaprolu V., Rawlings S.A., Peters B., Krammer F., Simon V., Saphire E.O., Smith D.M., Weiskopf D., Sette A., Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, 2021, Vol. 371, no. 6529, eabf4063. doi: 10.1126/science.abf4063.
9. Files J.K., Boppana S., Perez M.D., Sarkar S., Lowman K.E., Qin K., Sterrett S., Carlin E., Bansal A., Sabbaj S., Long D.M., Kutsch O., Kobie J., Goepfert P.A., Erdmann N. Sustained cellular immune dysregulation in individuals recovering from SARS-CoV-2 infection. *J. Clin. Invest.*, 2021, Vol. 131, no. 1, e140491. doi: 10.1172/JCI140491.
10. Jimeno-Almazán A., Pallarés J.G., Buendía-Romero Á., Martínez-Cava A., Franco-López F., Sánchez-Alcaraz Martínez B.J., Bernal-Morel E., Courel-Ibáñez J. Post-COVID-19 Syndrome and the Potential Benefits of Exercise. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2021, Vol. 18, no. 10, 5329. doi: 10.3390/ijerph18105329.
11. Kadir M., Ahmad T., Bass J. Post-COVID Sequelae: From Lung Disease to Long Disease. *Cureus*, 2023, Vol. 15, no. 3, e35668. doi: 10.7759/cureus.35668.

12. Kang C.K., Kim M., Hong J., Kim G., Lee S., Chang E., Choe P.G., Kim N.J., Kim I.S., Seo J.Y., Song D., Lee D.S., Shin H.M., Kim Y.W., Lee C.H., Park W.B., Kim H.R., Oh M.D. Distinct immune response at 1 year post-COVID-19 according to disease severity. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 830433. doi: 10.3389/fimmu.2022.830433.
13. Laidlaw B.J., Ellebedy A.H. The germinal centre B cell response to SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Immunol.*, 2022, Vol. 22, no. 1, pp. 7-18.
14. Munblit D., Nicholson T., Akrami A., Apfelbacher C., Chen J., de Groot W., Diaz J.V., Gorst S.L., Harman N., Kokorina A., Olliaro P., Parr C., Preller J., Schiess N., Schmitt J., Seylanova N., Simpson F., Tong A., Needham D.M., Williamson P.R.; PC-COS project steering committee. A core outcome set for post-COVID-19 condition in adults for use in clinical practice and research: an international Delphi consensus study. *Lancet Respir. Med.*, 2022, Vol. 10, no. 7, pp. 715-724.
15. Phetsouphanh C., Darley D.R., Wilson D.B., Howe A., Munier C.M.L., Patel S.K., Juno J.A., Burrell L.M., Kent S.J., Dore G.J., Kelleher A.D., Matthews G.V. Immunological dysfunction persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection. *Nat. Immunol.*, 2022, Vol. 23, pp. 210-216.
16. Proal A.D., VanElzakker M.B. Long COVID or post-acute sequelae of COVID-19 (PASC): An overview of biological factors that may contribute to persistent symptoms. *Front. Microbiol.*, 2021, Vol. 12, 698169. doi: 10.3389/fmicb.2021.698169.
17. 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., Hussell 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.e4.
18. Turner J.S., Day A., Alsoussi W.B., Liu Z., O'Halloran J.A., Presti R.M., Patterson B.K., Whelan S.P.J., Ellebedy A.H., Mudd P.A. SARS-CoV-2 viral RNA shedding for more than 87 days in an individual with an impaired CD8<sup>+</sup> T cell response. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 11, 618402. doi:10.3389/fimmu.2020.618402.
19. Turner J.S., Kim W., Kalaidina E., Goss C.W., Rauseo A.M., Schmitz A.J., Hansen L., Haile A., Klebert M.K., Pusic I., O'Halloran J.A., Presti R.M., Ellebedy A.H. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature*, 2021, Vol. 595, no. 7867, pp. 421-425.

---

**Авторы:**

**Добрынина М.А.** — к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург; доцент кафедры терапии Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

**Зурочка А.В.** — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург; заведующий лабораторией иммунобиотехнологии Российско-Китайского Центра ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», г. Челябинск, Россия

---

**Authors:**

**Dobrynina M.A.**, PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg; Associate Professor, Department of Therapy of the University of Innovation and Continuing Education, A. Burnazyan Russian State Research Center — Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russian Federation

**Zurochka A.V.**, PhD, MD (Medicine), Honored Worker of Science of the Russian Federation, Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg; Head, Immunobiotechnology Laboratory of the Russian-Chinese Center, South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

**Комелькова М.В.** — д.б.н., заведующая лабораторией системной патологии и перспективных лекарственных средств научно-образовательного Российско-китайского центра системной патологии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», г. Челябинск; профессор ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

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

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

**Komelkova M.V.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Systemic Pathology and Promising Medicines of Russian-Chinese Center, South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk; Professor, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

**Zurochka V.A.**, PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg; Senior Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, Russian-Chinese Center, South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

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

---

Поступила 12.05.2023  
Принята к печати 29.06.2023

---

Received 12.05.2023  
Accepted 29.06.2023

## **ИНФОРМАТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ СИСТЕМНЫХ ПОРАЖЕНИЯХ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ У ДЕТЕЙ**

**Жужула А.А., Курбатова О.В., Сновская М.А., Петричук С.В.,  
Комягина Т.М., Тряпочкина А.С.**

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

**Резюме.** Системные поражения соединительной ткани (СПСТ) характеризуются системным ауто-иммунным воспалением и сопровождаются появлением антинуклеарных антител (АНА).

Цель исследования – сравнительный анализ АНА в сыворотке крови у детей при системной красной волчанке (СКВ) и ревматоидном артрите (РА).

Обследовано 50 детей с СКВ и 50 детей с РА, находившиеся на лечении в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Ме возраста = 12,2 (9-15,5) года. Всем детям был определен титр АНА и тип свечения клеток в реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) с использованием клеточной линии HEp-2 (Immco Diagnostics, Inc, США), а также концентрация антител к двуспиральной ДНК (адсДНК) в сыворотке крови методом иммунохемилюминесценции (ИХМ) Elia™ dsDNA (Thermo Fisher Scientific, США).

У детей с СКВ позитивный титр АНА обнаружен у 98%, адсДНК – у 48% пациентов. В то время как у детей с РА позитивный титр АНА выявлен у 100%, адсДНК – у 4% детей. Высокопозитивный титр АНА (1/1280 и выше) выявлен у 68% детей с СКВ, и у 30% детей с РА. Ни у одного из пациентов с РА, имеющих высокопозитивный титр АНА, не выявлены адсДНК, а среди пациентов с СКВ 16% детей одновременно имели высокопозитивный титр АНА и позитивный уровень адсДНК. Проведенный ROC-анализ показал, что титр > 1/640 является границей для разделения пациентов с СКВ и РА (AUC = 0,742, p = 0,001). У детей с СКВ и РА встречаются как одиночные типы свечения клеток, так и их сочетания. Комбинации двух или трех типов свечения встречаются у 56% детей с СКВ и у 54% детей с РА. Точки в ядре чаще встречались у детей с СКВ, цитоплазматический тип свечения – у детей с РА, ядрышковый тип свечения обнаружен только у детей с РА.

---

### **Адрес для переписки:**

*Жужула Анастасия Андреевна  
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский  
центр здоровья детей» Министерства  
здравоохранения РФ  
119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2, стр. 1.  
Тел.: 8 (910) 562-30-83.  
E-mail: anas-zh@inbox.ru*

### **Address for correspondence:**

*Anastasia A. Zhuzhula  
National Medical Research Center for Children's Health  
2 Lomonosovsky Ave, Bldg 1  
Moscow  
119991 Russian Federation  
Phone: +7 (910) 562-30-83.  
E-mail: anas-zh@inbox.ru*

---

### **Образец цитирования:**

*А.А. Жужула, О.В. Курбатова, М.А. Сновская,  
С.В. Петричук, Т.М. Комягина, А.С. Тряпочкина  
«Информативность определения антинуклеарных  
антител при системных поражениях соединительной  
ткани у детей» // Российский иммунологический  
журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 251-258.  
doi: 10.46235/1028-7221-9961-SOD*

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

### **For citation:**

*A.A. Zhuzhula, O.V. Kurbatova, M.A. Snovskaya,  
S.V. Petrichuk, T.M. Komyagina, A.S. Tryapochkina  
“Significance of determining antinuclear antibodies in systemic  
connective tissue disorders in children”, Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,  
Vol. 26, no. 3, pp. 251-258.  
doi: 10.46235/1028-7221-9961-SOD*

*© Zhuzhula A.A. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.46235/1028-7221-9961-SOD*

Таким образом, определение АНА в диагностике СКВ и РА у детей имеет важное клиническое значение. Выявленные разные сочетания титров АНА и адсДНК у детей с СКВ и РА подтверждает необходимость одновременного использования РНИФ и ИХМ.

*Ключевые слова:* дети, системная красная волчанка, артрит, антинуклеарные антитела, двуспиральная ДНК, HEp-2, иммунофлюоресценция, иммунохемилюминесценция

## SIGNIFICANCE OF DETERMINING ANTINUCLEAR ANTIBODIES IN SYSTEMIC CONNECTIVE TISSUE DISORDERS IN CHILDREN

Zhuzhula A.A., Kurbatova O.V., Snovskaya M.A., Petrichuk S.V., Komyagina T.M., Tryapochkina A.S.

*National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Systemic connective tissue diseases (SCTD) are characterized by systemic autoimmune inflammation and are accompanied by development of antinuclear antibodies (ANA). Our aim was a comparative analysis of ANA in blood serum in children with systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA). The study included 50 patients with SLE, 50 patients with RA who were treated at the National Medical Research Center of Children's Health. Median age was 12,2 y. o. (9-15.5). The titers of ANA and the cell fluorescence type were determined with the indirect immunofluorescence reaction (IFR) using the HEp-2 cell line (Immco Diagnostics, Inc, USA), as well as the concentration of antibodies to double-stranded DNA (adsDNA) in blood serum samples of the children detected by immunochemiluminescence (ICM) with Elia™ dsDNA (Thermo Fisher Scientific, USA). A positive ANA titer and adsDNA were found, respectively, in 98% and in 48% in children with SLE. A positive ANA titer and adsDNA was detected in 100% and in 4% of children with RA, respectively. Highly positive ANA titers (> 1/1280) have been detected in 68% of children with SLE, and in 30% of children with RA. None of the RA patients with highly positive ANA titers had adsDNA. But, in patients with SLE, highly positive ANA titers and a positive dsDNA level were simultaneously detected in 16% of cases. There are both single types of cell fluorescence and their combinations in children with SLE and RA. Nuclear dot-like fluorescence was more common in children with SLE, cytoplasmic type, in children with RA, nucleolar type of glow was found only in children with RA. The revealed combinations of ANA and adsDNA titers in children with SLE and RA confirm the need for simultaneous use of RNIF and ICM.

*Keywords:* children, systemic lupus erythematosus, arthritis, antinuclear antibodies, dsDNA, HEp-2, immunofluorescence, immunochemiluminescence

## Введение

Системные поражения соединительной ткани (СПСТ) — это группа заболеваний с системным аутоиммунным воспалительным поражением соединительной ткани и ее производных, сопровождающееся появлением аутоагрессивных антинуклеарных антител (АНА) [3, 6, 10]. Наиболее распространенными СПСТ являются системная красная волчанка (СКВ), ревматоидный артрит (РА) [3, 12].

СКВ — это системное аутоиммунное заболевание соединительной ткани неизвестной этиологии, характеризующееся генетически обу-

словленным нарушением иммунной регуляции, образованием аутоагрессивных АНА и воспалительным поражением тканей органов [4, 8]. СКВ редко встречается у детей младше 5 лет, подъем заболеваемости регистрируется с 8-9 лет, а пик отмечается в возрасте 14-25 лет (средний возраст дебюта заболевания — 11-12 лет), чаще всего это заболевание выявляется у детей женского пола [4, 8]. РА — мультифакторное наследственное заболевание, характеризующееся системным воспалением соединительной ткани с поражением суставов, относящееся к самым инвалидизирующим ревматическим заболеваниям [5]. Дебют

РА приходится на возраст до 16 лет, чаще болеют девочки [5].

АНА представляют собой гетерогенную группу аутоагрессивных антител, которые вырабатываются к различным компонентам ядра и цитоплазмы клеток [1, 13]. Определение их концентрации в сыворотке крови пациентов играет важную роль в диагностике СПСТ [6, 13].

Реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) на клеточной линии HEp-2 является «золотым стандартом» и главным скрининговым методом лабораторной диагностики СПСТ для выявления АНА в сыворотке крови [1, 3]. Этот метод используют для ранней диагностики СПСТ, а также для исключения диагноза «СПСТ» при схожей клинической картине других заболеваний, таких как СКВ, РА, системные васкулиты и т. д. [6]. Результат АНА представляет собой информацию о конечном титре АНА и типе свечения ядра и цитоплазмы [13]. На тип свечения АНА влияют аутоантитела, которые реагируют с антигенами в ядре и цитоплазме клеток HEp-2. Чаще всего определяют следующие типы свечения: гомогенный, гранулярный, смешанный (гомогенный + гранулярный), точки в ядре, центромерный, ядрышковый и цитоплазматический [13].

Имунохемилуминесцентный анализ (ИХЛА) методом Elia™ dsDNA – один из самых точных существующих лабораторных методов для определения концентрации IgG к dsDNA и обнаружения комплекса антиген-антитело.

В связи с возможностью развития СПСТ в детском возрасте, является актуальным раннее выявление маркеров данных заболеваний для своевременного назначения патогенетического лечения. Так, по данным литературы, выявление АНА у детей с олигоартритом в раннем возрасте может указывать на риск развития увеита [2, 9]. Однако АНА не специфичны для РА [9]. При СКВ роль АНА в проявлениях заболевания лучше изучена, особенно в отношении адсДНК. Показано, что эти антитела могут способствовать развитию нефрита путем образования иммунных комплексов, которые откладываются в почках [7, 11].

Лабораторная диагностика ревматических болезней с помощью АНА и адсДНК подробно изучены у взрослых [6]. Анализ использования АНА в педиатрической практике представлен единичными публикациями [9].

**Цель исследования** – провести сравнительный анализ АНА в сыворотке крови у детей при системной красной волчанке (СКВ) и ревматоидном артрите (РА).

## Материалы и методы

В исследовании было включено 100 детей с СПСТ, которые проходили обследование и лечение в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, 50 пациентов с СКВ, 50 пациентов с РА. Ме возраста = 12,2 (9-15,5) года.

В рамках обследования всем детям проводили определение АНА на клеточной линии HEp-2 с помощью РНИФ (Immco Diagnostics, Inc., США) и определение концентрации адсДНК в сыворотке крови с помощью ИХЛА методом Elia™ dsDNA (Thermo Fisher Scientific, США).

В методе РНИФ использовали клеточную линию HEp-2 (эпителиальные клетки аденокарциномы гортани человека), которую инкубировали с сыворотками крови пациентов в серийных разведениях в лунках предметного стекла. После отмывки от не связавшихся компонентов в лунки предметного стекла вносили FITC конъюгат. Результат реакции оценивали с помощью флюоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ni (Япония) при 40× увеличении. Учитывали максимальный титр обнаружения АНА и тип свечения клеток. Нормальными значениями считали титры АНА < 1/160, при титре 1/160 ответ считали низкопозитивным, 1/320-1/640 – умеренно позитивным, 1/1280 и выше – высокопозитивным [1].

Определение адсДНК проводили методом Elia™ dsDNA, в основу которого положена технология Sandwich-метода: антитела исследуемой биологической жидкости реагируют с иммобилизованными на твердой фазе антигенами, образуя комплекс. При определении IgG к dsDNA методом Elia™ результат считали отрицательным, если концентрация анализата < 10 кЕ/л, сомнительным – 10-14,9 кЕ/л, положительным – > 15 кЕ/л.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ Statistica 10.0 (StatSoft, США), Excel (Microsoft, США), IBM SPSS Statistics 25 (США). Описательная статистика количественных признаков представлена в формате: медиана (нижний и верхний квартили) – Ме (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>).

## Результаты и обсуждение

Проведенный анализ полученных результатов обследования детей с СКВ выявил: позитивный титр АНА обнаружен у 98% пациентов, из них титр 1/160 – у 2% детей (низкопозитивный), 1/320 – у 18% пациентов (умеренно позитивный), 1/640 – у 10% детей (умеренно позитивный), 1/1280 – у 30% пациентов (высокопозитивный), 1/2560 – у 28% детей (высокопозитивный), 1/5120 – у 10%

**ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ТИТРА АНА И адсДНК У ДЕТЕЙ С СКВ И РА**

TABLE 1. INDICATORS OF THE TITER OF ANA AND dsDNA IN CHILDREN WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND RHEUMATOID ARTHRITIS

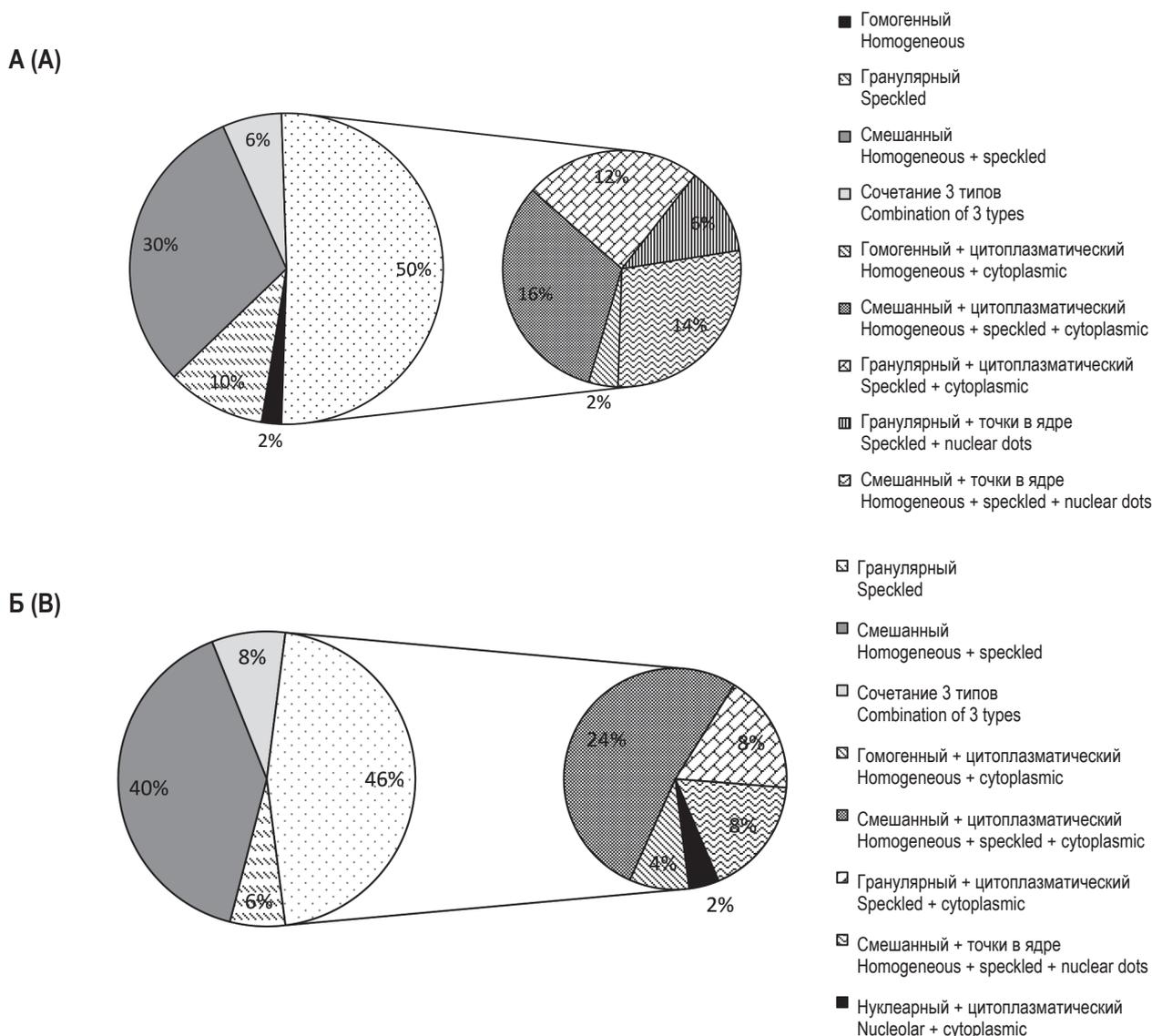
Диагноз Diagnosis	Количество детей Number of children	Титр АНА Titer of ANA	адсДНК (Eliа™) dsDNA (Eliа™)		
			Отрицательный Negative	Сомнительный "Grey zone"	Положительный Positive
СКВ SLE (n = 50)	1 (2%)	< 1/160	0	1 (2%)	0
	1 (2%)	1/160	0	0	1 (2%)
	9 (18%)	1/320	2 (4%)	1 (2%)	6 (12%)
	5 (10%)	1/640	3 (6%)	1 (2%)	1(2%)
	15 (30%)	1/1280	10 (20%)	1 (2%)	4 (8%)
	14 (28%)	1/2560	6 (12%)	0	8 (16%)
	5 (10%)	1/5120	1 (2%)	0	4 (8%)
<b>Итого</b> Total	50 (100%)		22 (44%)	4 (8%)	24 (48%)
РА RA (n = 50)	0 (0%)	< 1/160	0	0	0
	1 (2%)	1/160	0	0	1 (2%)
	19 (38%)	1/320	18 (36%)	0	1 (2%)
	15 (30%)	1/640	12 (24%)	3 (6%)	0
	10 (20%)	1/1280	10 (20%)	0	0
	5 (10%)	1/2560	5 (10%)	0	0
	0 (0%)	1/5120	0	0	0
<b>Итого</b> Total	50 (100%)		45 (90%)	3 (6%)	2 (4%)

пациентов (высокопозитивный). У 2% детей с СКВ титр АНА был < 1/160 (табл. 1).

У 48% детей с диагнозом «СКВ» обнаружены адсДНК, у 8% детей уровень адсДНК находится в «серой зоне», у 44% уровень адсДНК не обнаружен. У всех детей с позитивным уровнем адсДНК титр АНА в РНИФ был выше диагностического порога 1/160. У 2% детей при сомнительном результате адсДНК не выявлено флюоресцентного свечения при проведении РНИФ. Проводя оценку интенсивности титров в РНИФ и определение адсДНК, нами обнаружено: дети с низкопозитивным титром АНА (2%) имели положительный результат адсДНК – в 2% случаев. Пациенты с

умеренно позитивным титром АНА (28%) имели положительный результат адсДНК – в 14%, сомнительный результат – в 4%, отрицательный результат – в 10%. Дети с высокопозитивным титром АНА (68%), результат адсДНК был следующий: положительный – у 34%, сомнительный – 2%, отрицательный – 34% (табл. 1).

У детей с РА при анализе уровня АНА выявлено, что позитивный титр АНА был у 100%, из них: титр 1/160 – у 2% детей (низкопозитивный), 1/320 – у 38% пациентов (умеренно позитивный), 1/640 – у 30% детей (умеренно позитивный), 1/1280 – у 20% пациентов (высокопозитивный), 1/2560 – у 10% детей (высо-



**Рисунок 2. Процентное соотношение встречаемости разных типов АНА у детей с СКВ (А), с РА (Б)**

Figure 2. Percentage of occurrence of different types of ANA in children with SLE (A), with RA (B)

копозитивный). Только у 4% детей с диагнозом «РА» были выявлены адсДНК, у 6% детей уровень адсДНК находился в «серой зоне», у 90% детей – адсДНК не выявлены. У 4% пациентов, у которых выявлены адсДНК, титр АНА был выше диагностического порога 1/160. Ни у одного пациента с РА с высокопозитивным титром АНА (> 1/1280) не выявлено адсДНК. У пациентов, у которых выявлены позитивный уровень адсДНК титр АНА был 1/160 (2%) и 1/320 (2%), у пациентов с сомнительным уровнем адсДНК титр АНА – 1/640 (6%). Данные представлены в таблице 1.

Выявлено, что распределение по титрам АНА у детей с СКВ и РА достоверно отличались по критерию  $\chi^2$  ( $p < 0,001$ ).

Чаще всего у пациентов с СКВ и РА выявлялись следующие типы свечения АНА: гомогенный, гранулярный, точки в ядре, ядрышковый, смешанный и цитоплазматический типы свечения, представленные на рисунке 1 (см. 2-ю стр. обложки). Любой из определяемых типов свечения АНА мы принимали за положительный результат.

У детей с СКВ выявлялись следующие типы свечения гомогенный (2%), гранулярный (10%), смешанный (30%), сочетанием двух типов свечения (50%), трех типов свечения (6%), у 2% детей свечение АНА не наблюдалось (рис. 2а). В сочетаниях двух типов свечения наблюдались комбинации: гомогенный + цитоплазматический (2%), смешанный + цитоплазматический (16%), гра-

нулярный + цитоплазматический (12%), гранулярный + точки в ядре (6%), смешанный + точки в ядре (14%) (рис. 2А). В сочетаниях трех типов свечения наблюдались комбинации: смешанный + цитоплазматический + точки в ядре (4%) и гомогенный + цитоплазматический + точки в ядре (2%).

У детей с РА выявлялись следующие типы свечения: гранулярный (6%), смешанный (40%), сочетание двух типов свечения (46%) и трех типов свечения (8%) (рис. 2Б). В сочетаниях двух типов свечения наблюдались комбинации: гомогенный + цитоплазматический (4%), смешанный + цитоплазматический (24%), гранулярный + цитоплазматический (8%), смешанный + точки в ядре (8%), ядрышковый + цитоплазматический (2%) (рис. 2Б). В сочетаниях трех типов свечения наблюдались комбинации: смешанный + цитоплазматический + точки в ядре (2%) и гомогенный + цитоплазматический + точки в ядре (2%), гранулярный + цитоплазматический + точки в ядре (2%), ядрышковый + цитоплазматический + точки в ядре (2%).

Анализ АНА у детей с СКВ и РА показал как одиночные типы свечения, так и их сочетания. Наиболее часто выявлялись комбинации двух или трех типов свечения: в 56% случаев при СКВ и в 54% – при РА. Наиболее часто встречающийся тип свечения как у детей с СКВ, так при РА был смешанный и составлял 30% случаев при СКВ и 40% – при РА. Гранулярный тип свечения у детей с СКВ выявлен в 10%, а у детей с РА – в 6%. Точки в ядре чаще встречались у детей с СКВ, цитоплазматический тип свечения у детей с РА, ядрышковый тип свечения встречался только у детей с РА.

Нами проведен ROC-анализ для оценки разделительной способности различных титров АНА для разделения пациентов с СКВ и РА. При титре АНА > 1/640 показало хорошее качество разделительной модели (AUC = 0,7, Sp = 72%, p < 0,001).

Таким образом, анализ результатов тестирования пациентов показал, что у 48% детей с СКВ выявлены положительные результаты адсДНК при титре АНА (> 1/160), что соответствует данным Лапина С.В. о том, что адсДНК обнаруживается у 40-70% пациентов с СКВ [6]. Нами обнаружено, что позитивные результаты адсДНК соотносятся

с позитивными результатами определения АНА методом РНИФ при СКВ, тогда как такой зависимости у пациентов при РА не выявлено.

Обнаружено, что у детей с РА титр АНА чаще выявлялся умеренно позитивный, тогда, как для детей с СКВ был характерен высокопозитивный титр. Данный факт согласуется с данными Пашниной И.А. о том, что при РА титр АНА у детей умеренный [9]. С нашей точки зрения особый интерес представляют результаты проведенного ROC-анализа для разделения СКВ и РА по титру АНА. Титр 1/640 показал хорошее качество разделительной модели, что может быть использовано врачами для проведения дифференциального анализа.

Интересно отметить, что при СПСТ наиболее часто выявляются комбинации из 2-х и 3-х типов свечения, что может свидетельствовать о многофакторности, гетерогенности иммунных нарушений при СКВ и РА [4, 5, 8]. Известно, что аутоантитела могут образовываться к ядру и цитоплазме клеток, что возможно, ассоциировать с тяжестью заболеваний и требует дальнейших исследований [7].

В нашем исследовании у детей с РА также был выявлен ядрышковый тип свечения, что не считается патогномичным для пациентов с РА и обычно характерен для пациентов со склеродермией и полимиозитом [13]. В то же время у детей с СКВ чаще, чем у пациентов с РА, выявлялись гранулярный тип свечения и точки в ядре.

## Заключение

Определение АНА в диагностике СКВ и РА у детей имеет важное клиническое значение. У детей с СКВ чаще определяется высокий титр АНА при положительных результатах адсДНК, тогда как у детей с РА чаще выявляется умеренный титр АНА, при отсутствии адсДНК. У детей с СКВ и РА обнаруживаются разные сочетания титров АНА и уровня адсДНК, что подтверждает необходимость одновременного использования РНИФ и ИХЛА для лабораторной диагностики этих заболеваний. Проведенный ROC-анализ для разделения СКВ и РА и выявленная граница > 1/640, может использоваться врачами для проведения дифференциального анализа.

## Список литературы / References

1. Александрова Е.Н., Верижникова Ж.Г., Новиков А.А., Баранов А.А., Абайтова Н.Е., Лапкина Н.А., Роггенбук Д., Насонов Е.Л. Автоматизированный анализ антинуклеарных антител методом непрямой реакции иммунофлюоресценции с использованием Нер-2-клеток // Клиническая лабораторная

диагностика, 2015. Т. 60, № 3. С. 30-35. [Alexandrova E.N., Verizhnikova Zh.G., Novikov A.A., Baranov A.A., Abaytova N.E., Lapkina N.A., Roggenbuk D., Nasonov E.L. Automated analysis of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence reaction using HEp-2 cells. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, Vol. 60, no. 3, pp. 30-35. (In Russ.)]

2. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Насонов Е.Л. Современные стандарты лабораторной диагностики ревматических заболеваний и их применение в реальной клинической практике // Научно-практическая ревматология, 2013. Т. 51, № 4. С. 368-376. [Alexandrova E.N., Novikov A.A., Nasonov E.L. Modern standards of laboratory diagnostics of rheumatic diseases and their application in real clinical practice. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Scientific and Practical Rheumatology*, 2013, Vol. 51, no. 4, pp. 368-376. (In Russ.)]

3. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Насонов Е.Л. Лабораторная диагностика ревматических заболеваний // Лабораторная служба, 2015. Т. 4, № 2. С. 44-58. [Alexandrova E.N., Novikov A.A., Nasonov E.L. Laboratory diagnostics of rheumatic diseases. *Laboratornaya sluzhba = Laboratory Service*, 2015, Vol. 4, no. 2, pp. 44-58. (In Russ.)]

4. Алексеева Е.И., Дворяковская Т.М., Никишина И.П., Денисова Р.В., Подчерняева Н.С., Сухорукых О.А., Шубина Л.С. Системная красная волчанка: клинические рекомендации. Часть 1 // Вопросы современной педиатрии, 2018. Т. 17, № 1. С. 19-37. [Alekseeva E.I., Dvoryakovskaya T.M., Nikishina I.P., Denisova R.V., Podchernyaeva N.S., Sukhorukikh O.A., Shubina L.S. Systemic lupus erythematosus: clinical recommendations. Part 1. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Issues of Modern Pediatrics*, 2018, Vol. 17, no. 1, pp. 19-37. (In Russ.)]

5. Алексеева Е.И. Ювенильный идиопатический артрит: клиническая картина, диагностика, лечение // Вопросы современной педиатрии, 2015. Т. 14, № 1. С. 78-94. [Alekseeva E.I. Juvenile idiopathic arthritis: clinical picture, diagnosis, treatment. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Issues of Modern Pediatrics*, 2015, Vol. 14, no. 1, pp. 78-94. (In Russ.)]

6. Лапин С.В., Мазинг А.В., Булгакова Т.В., Напалкова О.С., Первакова М.Ю., Холопова И.С., Маслянский А.Л., Тотолян А.А. Выявление антинуклеарных антител: международные рекомендации и собственный опыт // Медицинский алфавит, 2014. Т. 3, № 15. С. 40-45. [Lapin S.V., Mazing A.V., Bulgakova T.V., Napalkova O.S., Pervakova M.Yu., Kholopova I.S., Maslyansky A.L., Totolyan A.A. Detection of antinuclear antibodies: international recommendations and own experience. *Meditinskiy alfavit = Medical Alphabet*, 2014, Vol. 3, no. 15, pp. 40-45. (In Russ.)]

7. Лапин С.В., Тотолян А.А. Антинуклеарные антитела: лабораторные тесты и диагностическое значение // Медицинская иммунология, 2001. Т. 3, № 1. С. 35-50. [Lapin S.V., Totolyan A.A. Antinuclear antibodies: laboratory tests and diagnostic significance. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2001, Vol. 3, no. 1, pp. 35-50. (In Russ.)]

8. Мухаммедова Б.К., Сергазиева С.Ж., Аскарлова К.К., Бериккан А.М., Эркинова Н.Х., Аубакирова А.Д., Ногаева М.Г. Особенности течения системной красной волчанки у детей // Вестник Казахского Национального медицинского университета, 2021. № 2. С. 119-124. [Mukhamedova B.K., Sergazieva S.Zh., Askarova K.K., Berikkan A.M., Erkenov N.H., Aubakirova A.D., Nogaeva M.G. Features of the course of systemic lupus erythematosus in children. *Vestnik Kazakhskogo Natsionalnogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of the Kazakh National Medical University*, 2021, no. 2, pp. 119-124. (In Russ.)]

9. Пашнина И.А., Козлова Е.С., Криволапова И.М. Выявление аутоантител при различных клинических формах ювенильных артритов у детей // Детская больница, 2010. № 2. С. 43-46. [Pashnina I.A., Kozlova E.S., Krivolapova I.M. Detection of autoantibodies in various clinical forms of juvenile arthritis in children. *Detskaya bolnitsa = Children's Hospital*, 2010, no. 2, pp. 43-46. (In Russ.)]

10. Пашнина И.А., Криволапова, И.М., Тузанкина И.А., Черешнев В.А. Использование различных лабораторных методов для определения антинуклеарных антител у пациентов с аутоиммунными заболеваниями соединительной ткани // Acta Biomedica Scientifica, 2012. № 3 (2). С. 143-147. [Pashnina I.A., Krivolapova I.M., Tuzankina I.A., Chereshev V.A. The use of various laboratory methods for the determination of antinuclear antibodies in patients with autoimmune diseases of connective tissue. *Acta Biomedica Scientifica = Acta Biomedica Scientifica*, 2012, no. 3 (2), pp. 143-147. (In Russ.)]

11. Петров А.В., Белоглазов В.А., Гаффарова А.С., Петров А.А. Взаимосвязь гиперпродукции различных видов антинуклеарных антител и клинической симптоматики при системной Красной волчанке // Таврический медико-биологический вестник. 2018. Т. 21, № 3. С. 87-90. [Petrov A.V., Beloglazov V.A., Gafarova A.S., Petrov A.A. The relationship of hyperproduction of various types of antinuclear antibodies and clinical symptoms in systemic lupus erythematosus. *Tavricheskiy mediko-biologicheskiy vestnik = Tauride Medico-Biological Bulletin*, 2018, Vol. 21, no. 3., pp. 87-90. (In Russ.)]

12. Решетняк Т.М., Шумилова А.А., Кошелева Н.М. Клиническое значение антиядерных антител // Лечебное дело, 2021. № 4. С. 96-103. [Reshetnyak T.M., Shumilova A.A., Kosheleva N.M. Clinical significance of antinuclear antibodies. *Lechebnoe delo = General Medicine*, 2021, no. 4, pp. 96-103. (In Russ.)]

13. Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Мазинг А.В., Тотолян А.А. Русскоязычная адаптация международной номенклатуры типов свечения ядра и цитоплазмы клетки (ICAP) для стандартизации выявления антиядерного фактора // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 6. С. 1195-1214. [Tkachenko O.Yu., Lapin S.V., Mazing A.V., Totolyan A.A. Russian-language adaptation of the international nomenclature of cell nucleus and cytoplasm glow types (ICAP) for standardization of antinuclear factor detection. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 6, pp. 1195-1214. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-RVO-2067.

---

**Авторы:**

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

**Курбатова О.В.** — к.м.н., старший научный сотрудник, заведующая лабораторией экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Сновская М.А.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

**Комягина Т.М.** — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Тряпochкина А.С.** — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Zhuzhula A.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

**Kurbatova O.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Head of Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

**Snovskaya M.A.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

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

**Komyagina T.M.**, Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

**Tryapochkina A.S.**, Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

# ИММУНОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ ИММУНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ НОВОГО БИСОЕДИНЕНИЯ

**Забокрицкий Н.А.**

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

**Резюме.** Настоящая публикация посвящена вопросам экспериментального изучения иммунотропной активности нового соединения – метабиотика, на основе метаболитов (биологически активных веществ, БАВ), продуцируемых сапрофитным и безопасным стандартизированным штаммом ВКПМ *Bacillus subtilis* В-9909. Цель исследования – экспериментальная оценка иммунотропного действия метаболитов, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами штамма ВКПМ *Bacillus subtilis* В-9909 на показатели клеточного иммунитета у лабораторных животных при моделировании у них токсического поражения печени. Метаболиты выделяли из культуральной жидкости бактериальной культуры *Bacillus subtilis*, штамм ВКПМ В-9909, при его глубинном культивировании в среде, состоящей из соляно-кислотного гидролизата соевой муки или панкреатического гидролизата казеина. Культура в это время находилась в конце экспоненциальной фазы роста (16-18 часов культивирования). Исследование показателей клеточного статуса у экспериментальных групп животных при оценке терапевтической эффективности экспериментального образца метабиотика, по отношению к группе лабораторных животных, получавших препарат сравнения урсосан, проводили путем определения таких количественных показателей сыворотки крови, как: количественное определение фагоцитарной активности (ФА) нейтрофилов периферической крови; определение метаболической активности нейтрофилов периферической крови в НСТ-тесте; количественное определение Т- и В-лимфоцитов; количество антителообразующих клеток (АОК). Поражение печени изучали путем моделирования острого токсического гепатита у белых крыс. Экспериментальный токсический гепатит моделировали на лабораторных животных – белых крысах. Внутрижелудочно вводили 40%-ный раствор СС<sub>4</sub> в вазелиновом масле в течение 2 недель из расчета 0,2 г/кг. Полученные результаты экспериментальных исследований свидетельствуют, что об активации фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови в ранние сроки эксперимента, что подтверждается данными, полученными в НСТ-тесте. Одновременно, в ранние сроки эксперимента значительно выросло количественное представление популяций Т- и

**Адрес для переписки:**

Забокрицкий Николай Александрович  
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»  
Уральского отделения Российской академии наук  
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.  
Тел.: 8 (922) 110-11-14.  
E-mail: pharmusma@rambler.ru

**Address for correspondence:**

Nikolai A. Zabokritskiy  
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,  
Russian Academy of Sciences  
106 Pervomaiskaya St  
Yekaterinburg  
620049 Russian Federation  
Phone: +7 (922) 110-11-14.  
E-mail: pharmusma@rambler.ru

**Образец цитирования:**

Н.А. Забокрицкий «Иммунофармакологические аспекты изучения иммунотропных свойств нового биосоединения» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 259-264.  
doi: 10.46235/1028-7221-9643-IAO

© Забокрицкий Н.А., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

**For citation:**

N.A. Zabokritskiy “Immunopharmacological aspects of studying immunotropic properties of a novel biocompound”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 259-264.  
doi: 10.46235/1028-7221-9643-IAO

© Zabokritskiy N.A., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-9643-IAO

В-лимфоцитов, а также количество АОК, что говорит об активации всех звеньев клеточного иммунитета, в ответ на токсическое воздействие четыреххлористого углерода. Таким образом, проведенные исследования по изучению клеточного статуса лабораторных животных, получавших метаболиты, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами рода *Bacillus subtilis* В-9909 на лабораторных животных при моделировании у них токсического поражения, дают основания выдвинуть заключение о наличии у испытуемого образца метабиотика существенного иммуномодулирующего эффекта, в сравнении с урсосаном. Все вышеизложенное позволяет рекомендовать данное соединение, как перспективный лекарственный кандидат нового гепатопротектора с иммуностропным эффектом.

*Ключевые слова:* *Bacillus subtilis*, метаболиты, пробиотик, гепатопротектор, иммуностропная активность, клеточный иммунитет

## IMMUNOPHARMACOLOGICAL ASPECTS OF STUDYING IMMUNOTROPIC PROPERTIES OF A NOVEL BIOCOMPOUND

Zabokritskiy N.A.

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

**Abstract.** The article presents an experimental study of immunotropic activity of a new compound, a metabiotic, based on metabolites (biologically active substances) produced by a of saprophytic *Bacillus subtilis* В-9909 strain, being safe for health and standardized at Russian National Collection of Industrial Microorganisms (RNCIM). The aim of our study was to experimentally evaluate the immunotropic effects of metabolites produced by the probiotic *Bacillus subtilis* В-9909 upon the parameters of cellular immunity tested in the animal model of induced toxic liver damage. The metabolites were isolated from the cultural liquid of *Bacillus subtilis* culture (RNCIM strain В-9909) during its deep cultivation in a medium containing hydrochloric acid hydrolyzate of soy flour, or pancreatic hydrolyzate of casein. At 16-18 hours of cultivation, the cells were in the exponential growth phase. The indices of cellular status were studied in experimental groups of animals, when assessing therapeutic efficacy of an experimental metabiotic sample, as compared to a group of laboratory animals treated with the reference drug (ursosan). We assessed the quantitative indicators of blood as follows: determination of phagocytic activity (FA) of peripheral blood neutrophils; measurement of metabolic activity in peripheral blood neutrophils by means of NBT-test; quantitative determination of T and B lymphocytes; the number of antibody-forming cells (AFC). Liver damage was studied in a model of acute toxic hepatitis in albino rats. Experimental toxic hepatitis was induced by 40% solution of CCl<sub>4</sub> in vaseline oil injected intragastrically for 2 weeks at the dose of 0.2 g/kg. The results of experimental studies showed activation of phagocytic activity by peripheral blood neutrophils at the early terms of experiment, being also confirmed by the results of NBT-testing. Moreover, at the early observation terms, a significantly increased representation of T and B lymphocyte populations as well as AFC numbers, were revealed thus suggesting activation of all components of cellular immunity in response to the carbon tetrachloride toxicity. Thus, the reported studies on the cellular status of laboratory animals treated with metabolites produced by probiotic microorganisms of the genus *Bacillus subtilis* (В-9909) on laboratory animals with toxic liver damage allow us to conclude that the test sample of this metabiotic preparation exerts a significant immunomodulatory effect, when compared with ursosan. This evidence allows us to consider this compound a promising candidate drug for a new hepatoprotector with immunotropic effect.

*Keywords:* *Bacillus subtilis*, metabolites, probiotic, hepatoprotector, immunotropic activity, cellular immunity

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

## Введение

Практическое здравоохранение нуждается в поиске новых эффективных лечебно-профилактических средств в области гастроэнтерологии и иммунологии [1, 3, 4]. На сегодняшний день, одной из актуальных и востребованных фармакологических групп, применяемых при заболеваниях печени и желчевыводящих путей являются гепатопротекторные препараты. Поисковые исследования большинства отечественных и зарубежных авторов свидетельствуют, что в создании подобных препаратов фармакологический приоритет целесообразно отдавать медицинским иммунобиологическим препаратам микробного происхождения с иммунотропной активностью. В связи с этим весьма актуальной является группа пробиотических препаратов, а, в частности, лекарственные кандидаты нового поколения – метабиотики. Так, известно, что в основа метабиотиков представлена биологически активными веществами (БАВ), продуцируемыми пробиотическими микроорганизмами. С точки зрения современной фармакологии и биотехнологии наиболее востребованными продуцентами БАВ являются непатогенные микроорганизмы рода *Bacillus*, которые на сегодняшний день расцениваются как самоэлиминирующиеся антагонисты. Наиболее актуальным в этом плане представляется штамм *Bacillus subtilis*, который обладает значимой антагонистической активностью в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и не чувствительны или малочувствительны к современным химиотерапевтическим препаратам [2, 5, 8]. Автором был получен, выделен, изучен и депонирован штамм ВКПМ *Bacillus subtilis* В-9909, который в более ранних исследованиях проявил гепатопротекторную активность, а также иммунотропное действие в отношении гуморального звена иммунитета.

В связи с этим значительный научный интерес представляют метабиотик, полученный на основе БАВ штамм ВКПМ *Bacillus subtilis* В-9909.

**Цель исследования** – экспериментальная оценка иммунотропного действия метаболитов, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами штамма ВКПМ *Bacillus subtilis* В-9909

на лабораторных животных при моделировании у них токсического поражения печени.

## Материалы и методы

В работе использовали биологически активные вещества (метаболиты) микроорганизмов штамма ВКПМ *Bacillus subtilis* В-9909.

Комплекс биологически активных веществ получали в лабораторных условиях по имеющимся в настоящее время в научной литературе рекомендациям [3, 4, 6, 7].

Метаболиты выделяли из культуральной жидкости бактериальной культуры *Bacillus subtilis*, штамм ВКПМ В-9909, при его глубинном культивировании в среде, состоящей из соляно-кислотного гидролизата соевой муки или панкреатического гидролизата казеина. Культура в это время находилась в конце экспоненциальной фазы роста (16-18 часов культивирования) [3, 7].

Культивирование проводили в 250,0 мл колбах на термостатированной установке выращивания микроорганизмов УВМТ-12-250. Для получения культуральной жидкости в больших объемах использовали ферментер БИОР-0,1.

В последующем культуральную жидкость подвергали следующим технологическим операциям:

– центрифугированию (8000 об/мин в течение 15 минут) или при больших объемах культуральной жидкости сепарированию (для отделения клеточной массы) с использованием сепаратора АСГ-3МБ;

– ультразвуковой дезинтеграции (для разрушения оставшихся бактериальных клеток *Bacillus subtilis*) для чего использовали ультразвуковой диспергатор УЗД2-0,1/22 [2, 6, 7];

– стерилизующей ультрафильтрации с использованием мембранных фильтров Millipore с диаметром пор 0,22 мкм и Sartorius с диаметром пор 0,3 мкм;

– лиофильному высушиванию (до уровня остаточной влажности 3-5%) на лабораторной установке сублимационной сушки ЛСС-2. Выход лиофильно высушенного комплекса БАВ, освобожденного от клеточной биомассы (из 1 л фугатной жидкости), составлял – 10-15 г.

Качественное и количественное содержание метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделение проводили при комнатной температуре с ис-

пользованием колонки Supelcosil™ LC-18 (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм).

Поражение печени у белых лабораторных крыс изучали путем моделирования острого токсического гепатита.

Экспериментальный токсический гепатит моделировали путем внутрижелудочного введения 40%-ного раствора CCl<sub>4</sub> в вазелиновом масле в течение 2 недель из расчета 0,2 г/кг.

В исследовании было выделено четыре исследуемые группы по 12 лабораторных крыс в каждой:

I – группа животных, которым назначили исследуемый метабиотик;

II – группа животных, которым назначили препарат сравнения урсосан;

III – контроль (без лечения);

IV – контроль интактные.

Для оценки показателей клеточного иммунного статуса у лабораторных животных при применении экспериментального образца метаболитов в условиях моделирования острого токсического гепатита исследовали следующие показатели:

– количественное определение фагоцитарной активности (ФА) нейтрофилов периферической крови, опт. ед.;

– определение метаболической активности нейтрофилов периферической крови в НСТ-тесте, опт. ед.;

– количественное определение Т- и В-лимфоцитов методом Е-розетко-образования, 10<sup>6</sup>/см<sup>3</sup>;

– количество антителообразующих клеток (АОК), 10<sup>6</sup>/см<sup>3</sup>.

Результаты статистически анализировались с использованием пакетов компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 12.0. При этом был использован метод дисперсионного анализа (ANOVA). Оценивали нормальность распределения полученных данных по методу Колмогорова–Смирнова. Статистическую оценку достоверности межгрупповых различий проводили с использованием параметрического критерия Фишера в зависимости от нормальности распределения данных. Оценку статистических гипотез выполняли при критическом уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Полученные экспериментальные данные изменения показателей клеточных факторов иммунитета белых лабораторных крыс при мо-

делировании острого токсического гепатита свидетельствуют о том, что на 3-и сутки эксперимента в группе IV подопытных животных с воспроизведенной моделью острого токсического гепатита, по сравнению с III (контрольной) группой животных, отмечается существенное повышение всех изучаемых показателей клеточных факторов иммунитета. Так, фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови возросла более, чем в 4 раза – 65,2±0,48 опт. ед., поглотительная способность нейтрофилов в НСТ-тесте увеличилась в 2,5 раза – 0,09±0,02 опт. ед., увеличилось количество Т- и В-лимфоцитов в 2 раза – 0,43±0,05 × 10<sup>6</sup>/см<sup>3</sup> и 0,35±0,04 × 10<sup>6</sup>/см<sup>3</sup>, количество АОК в 2,4 раза – 0,153±0,021 × 10<sup>6</sup>/см<sup>3</sup>, соответственно.

В I и II группах подопытных животных, получавших экспериментальный образец метабиотика и препарат сравнения урсосан, по сравнению с III (контрольной), отмечается более выраженное увеличение всех изучаемых клеточных факторов иммунитета – повышение фагоцитарной активности нейтрофилов крови в 5,2 и 4,6 раза, поглотительной способности нейтрофилов в НСТ-тесте в 8 и 6 раз, увеличение количества Т- и В-лимфоцитов в 2,3 и 2,1 раз, а также увеличение количества АОК в 1,5 раза в обеих группах соответственно.

Кроме того, на 8-е сутки эксперимента наблюдалось увеличение количества АОК и, соответственно, Т- и В-лимфоцитов. Фагоцитарная активность и поглотительная способность нейтрофилов крови оставалась на прежнем уровне.

На 14-е и 28-е сутки наблюдения отмечали положительную динамику изменения показателей клеточного иммунитета, в большей степени выраженную в I группе подопытных животных, получавших экспериментальный образец метабиотика, чем во II группе подопытных животных, которым вводили препарат сравнения урсосан.

## Заключение

Полученные экспериментальные данные показателей факторов клеточного иммунитета позволяют судить об активации фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови в ранние сроки эксперимента, что подтверждается данными, полученными в НСТ-тесте. Одновременно, в ранние сроки эксперимента значитель-

но выросло количественное представление популяций Т- и В-лимфоцитов, а также количество АОК, что говорит об активации всех звеньев клеточного иммунитета, в ответ на токсическое воздействие четыреххлористого углерода.

Таким образом, проведенные исследования по изучению клеточного статуса лабораторных

животных, получавших метаболиты, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами рода *Bacillus* при моделировании у них токсического поражения, дают основания выполнить заключение о наличии у испытуемого образца метабиотика (БАВ) существенного иммуномодулирующего эффекта, в сравнении с уросаном.

## Список литературы / References

1. Ардатская М.Д., Столярова Л.Г., Архипова Е.В., Филимонова О.Ю. Метабиотики как естественное развитие пробиотической концепции // Рецепт, 2019. Т. 2, № 22. С. 291-298. [Ardatskaya M.D., Stolyarova L.G., Arkhipova E.V., Filimonova O.Yu. Metabiotics as a natural development of a probiotic concept. *Retsept = Recipe*, 2019, Vol. 2, no. 22, pp. 291-298. (In Russ.)]
2. Забокрицкий Н.А. Оценка иммуотропного действия пробиотика бацилакт в составе трансдермальных терапевтических систем // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 2 (20). С. 126-129. [Zabokritskiy N.A. Preclinical evaluation of immunotropic action of probiotics bacilact transdermal therapeutic system. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 2 (20), pp. 126-129. (In Russ.)]
3. Забокрицкий Н.А. Принципиальные направления научных исследований по обоснованию и разработке новых иммунобиологических препаратов // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2018. Т. 81. С. 85-86. [Zabokritskiy N.A. Principal directions of scientific research on the justification and development of new immunobiological drugs. *Ekspериментalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, 2018, Vol. 81, pp. 85-86. (In Russ.)]
4. Забокрицкий Н.А., Сарапульцев П.А. Экспериментальное обоснование возможности создания нового метаболитического препарата // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 3, № 12. С. 295-300. [Zabokritskiy N.A., Sarapultsev P.A. Experimental justification of the possibility of creating the new metabolic drug. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 3, no. 12, pp. 295-300. (In Russ.)]
5. Забокрицкий Н.А. Фармакологическая оценка иммуотропной активности нового гелевого метабиотика на факторы клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном моделировании термических ожогов кожи // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 125-132. [Zabokritskiy N.A. Pharmacological assessment of immunotropic activity of new gel metabiotic on cellular and humoral immunity in experimental modeled thermal skin burns. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2020, Vol. 23, no. 2, 125-132. (In Russ.)]
6. Забокрицкий Н.А. Изучение цитопротекторных свойств метаболитов штамма *Bacillus subtilis* В-9909 на культуре выделенных гепатоцитов // Вестник уральской медицинской академической науки, 2022. Т. 19, № 3. С. 203-209. [Zabokritskiy N.A. Experimental evaluation of the cytoprotective effect of probiotic metabolites of *Bacillus subtilis* В-9909 strain on the culture of isolated hepatocytes. *Vestnik uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 125-132. (In Russ.)]
7. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С., Булаева Г.В., Вертиев Ю.В., Винокуров А.Е., Горобец О.Б., Дарбеева О.С., Жиленков Е.Л., Зверьков Д.А., Иванова С.М., Иванова Т.С., Корн М.Я., Кривопалова Н.С., Лукин И.Н., Мельникова В.А., Нехорошева А.Г., Романова Ю.М., Сидоренко С.В., Скаженник В.Ю., Скала Л.З., Трухина Г.М. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. СПб.: Лань, 2016. 588 с. [Labinskaya A.S., Blinkova L.P., Eshina A.S., Bulaeva G.V., Vertiev Yu.V., Vinokurov A.E., Gorobets O.B., Darbeeva O.S., Zhilenkov E.L., Zverkov D.A., Ivanova S.M., Ivanova T.S., Korn M.Ya., Krivopalova N.S., Lukin I.N., Melnikova V.A., Nekhorosheva A.G., Romanova Yu.M., Sidorenko S.V., Skazenik V.Yu.,

Skala L.Z., Trukhina G.M. General and Sanitary Microbiology with the Technique of microbiological research]. St. Petersburg: Lan, 2016. 588 p.

8. Lee N.K., Paik H.D., Kim W.S. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Sci. Biotechnol.*, 2019, Vol. 28, no. 5, pp. 1297-1305.

---

**Автор:**

*Забокрицкий Н.А. — д.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия*

**Author:**

*Zabokritskiy N.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation*

Поступила 14.05.2023  
Принята к печати 29.06.2023

Received 14.05.2023  
Accepted 29.06.2023

---

## ОЦЕНКА ОТНОШЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ В РАННЕМ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ У ДЕТЕЙ

Закиров Р.Ш.<sup>1,2</sup>, Петричук С.В.<sup>1</sup>, Фрейдлин Е.В.<sup>1</sup>, Купцова Д.Г.<sup>1</sup>,  
Янюшкина О.Г.<sup>2</sup>, Карасева О.В.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> ГБУЗ города Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

**Резюме.** Тяжелая механическая травма является одной из ведущих причин детской инвалидизации и смертности. Дисбаланс гипервоспаления и иммуносупрессии, развивающийся в критическом периоде тяжелой травмы, повышает риск развития инфекционных осложнений и/или полиорганной недостаточности. Целью работы было определение информативных иммунологических критериев оценки риска развития осложнений и прогноза исхода травматической болезни у детей при тяжелой механической травме (ТМТ, ISS  $\geq$  16, n = 87) в группах с благоприятным (n = 47) и неблагоприятным исходом (n = 40), а также в зависимости от развития гнойно-септических осложнений (ГСО, n = 16) и синдрома полиорганной недостаточности (СПОН, n = 11). Методом проточной цитометрии проведена оценка соотношения субпопуляций Т-хелперов (Th): регуляторные Т-лимфоциты – CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup> (Treg), Th 17 типа – CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup>CD25<sup>high</sup>Т-клетки (T127hi) в 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 14-е сутки с момента получения травмы. Группу сравнения составили 34 ребенка с травмой легкой и средней степени тяжести (ЛТ, ISS < 16). Уровни T127hi/Treg и Th17/Treg в первые сутки после травмы у пациентов с ЛТ соответствовали значениям контрольной группы и значительно отличались от группы ТМТ. Для пациентов с ТМТ выявлено выраженное увеличение соотношения Th17/Treg в остром посттравматическом периоде с тенденцией к снижению к 7-14-м суткам после травмы. Для детей с ТМТ обнаружены различия в динамике анализируемых показателей в зависимости от развития осложнений и исхода травматической болезни. Динамика уровня Th17/Treg в остром посттравматическом периоде значительно отличалась у детей с ТМТ при развитии ГСО и неблагоприятном исходе на 7-е и 14-е сутки соответственно. Низкий уровень T127hi/Treg у пациентов с ТМТ в значительной степени связан с развитием ГСО. Несмотря на то, что достоверных отличий анализируемых показателей в группах пациентов в зависимости от развития СПОН выявлено не было, у паци-

### Адрес для переписки:

Рустам Шакирович Закиров  
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский  
центр здоровья детей» Министерства  
здравоохранения РФ  
119296, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2, стр. 1.  
Тел.: 8 (926) 692-70-97.  
E-mail: zakirov.rsh@nczd.ru

### Address for correspondence:

Rustam Sh. Zakirov  
National Medical Research Center for Children's Health  
2 Lomonosovsky Ave, Bldg 1  
Moscow  
119296 Russian Federation  
Phone: +7 (926) 692-70-97.  
E-mail: zakirov.rsh@nczd.ru

### Образец цитирования:

Р.Ш. Закиров, С.В. Петричук, Е.В. Фрейдлин,  
Д.Г. Купцова, О.Г. Янюшкина, О.В. Карасева «Оценка  
отношения субпопуляций Т-хелперов в раннем  
посттравматическом периоде у детей» // Российский  
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 265-272.  
doi: 10.46235/1028-7221-9644-TSD

© Закиров Р.Ш. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

R.Sh. Zakirov, S.V. Petrichuk, E.V. Freidlin, D.G. Kuptsova,  
O.G. Yanyushkina, O.V. Karaseva "T helper subsets during  
the acute post-traumatic period in children", Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,  
Vol. 26, no. 3, pp. 265-272.  
doi: 10.46235/1028-7221-9644-TSD

© Zakirov R.Sh. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-9644-TSD

ентов с СПОН были отмечены более низкие медианные значения для Th17/Treg and T127hi/Treg, чем у пациентов без СПОН начиная с 3-х суток после травмы. Для Th17/T127hi достоверных различий в группе тяжелой травмы в зависимости от развития осложнений и исхода травматической болезни выявлено не было. Результаты исследования свидетельствуют о том, что у детей уровни Th17/Treg и T127hi/Treg могут быть использованы для прогнозирования исхода травматического заболевания и оценки риска развития инфекционных осложнений и синдрома полиорганной дисфункции.

*Ключевые слова:* дети, тяжелая травма, политравма, отношение субпопуляций T-хелперов, синдром полиорганной недостаточности, прогноз исхода, инфекционные осложнения

## T HELPER SUBSETS DURING THE ACUTE POST-TRAUMATIC PERIOD IN CHILDREN

Zakirov R.Sh.<sup>a, b</sup>, Petrichuk S.V.<sup>a</sup>, Freidlin E.V.<sup>a</sup>, Kuptsova D.G.<sup>a</sup>,  
Yanyushkina O.G.<sup>b</sup>, Karaseva O.V.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Urgent Children Surgery and Traumatology, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Severe mechanical injury is among the main reasons of disability and mortality in pediatric patients. The imbalance between the states of inflammation and immune suppression during the critical period of post-traumatic injury bears an elevated risk for infectious complications and/or multiple organ failure. The present study aimed to determine the informative immunological criteria in order to evaluate severity and prognosis for clinical outcomes in children from the severe injury group (SInj, ISS  $\geq$  16, n = 87); mild/moderate injury group (MInj, ISS < 16, n = 34), as based on assessment of helper T cells (Th) ratios, i.e., Th17/Treg, T127hi/Treg, and Th17/T127hi. The patients with severe injuries were classified by their outcomes (favorable, n = 47; unfavorable, n = 40), presence of infectious complications (IC, n = 16) and the development of multiple organ failure (MOF, n = 11). Th ratios were studied on the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> day after injury. For the Sinj group, a pronounced increase of Th17/Treg ratio in the acute post-traumatic period with a decrease by 14 days was revealed. The indices of T127hi/Treg ratio on the first day for the patients from Minj group corresponded to the values of control group and significantly differed from patients with SInj in the 3<sup>rd</sup> to 5<sup>th</sup> day. There are different kinetics of Th subset ratio in peripheral blood of children with severe injuries over time in different groups, as well as with/without MOF, in presence, or absence of infectious complications and different clinical outcomes. Significant differences in T127hi/Treg ratio level were found in group with IC from 1<sup>st</sup> to 3<sup>rd</sup> day and from 7<sup>th</sup> to 14<sup>th</sup> day. Significant differences in Th17/Treg ratio level were found in IC group (7<sup>th</sup> day), in MOF group on 14<sup>th</sup> day post-injury. The patients with MOF had lower median concentrations of Th17/Treg and T127hi/Treg than patients without MOF. The results of the study indicate that the levels of Th17/Treg and T127hi/Treg ratio in children may be used to predict outcome of the traumatic disease and assess the risk of infectious complications and multiple organ dysfunction syndrome.

*Keywords:* children, severe injury, polytrauma, T helper subsets ratio, multiple organ failure, outcome prediction, infectious complications

### Introduction

Severe mechanical injury is one of the leading causes of childhood disability and mortality [4]. Severe injury induces a complex host immune response to tissue damage, a parallel pro- and anti-inflammatory state associated with an increased risk of infectious complications (IC) and/or multiple organ failure (MOF) [2, 6]. A period of pronounced immunosuppression is usually observed,

the pathogenesis of which is largely determined by a decrease in the level of T lymphocytes (Th) in severe trauma [8]. Also, it has been demonstrated that Treg is activated in response to massive spread causing induced injury, downregulation of Th1 responses, and T cell anergy [5]. The quantity of T helper subpopulations, such as regulatory T lymphocytes (Treg) – CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup> and Th17 lymphocytes (Th17), can be a significant marker in the frequency of the pathological process

and predicting its outcome. Th17 and Treg cells have opposite roles in the development of autoimmune and inflammatory diseases. While Th17 cells promote autoimmunity, Treg cells serve to control it and therefore play a very important role in autoimmune pathogenesis by maintaining self-tolerance and by controlling expansion and activation of autoreactive CD4<sup>+</sup>T effector cells. The control of Th17/Treg balance appears also critical in the development of many diseases, including severe trauma [9]. However, further evaluation is required to determine exact kinetic changes of CD4<sup>+</sup>T cells subsets count post-trauma.

**The purpose of this study** was to identify informative immunological criteria for the traumatic disease severity and as applicable to children. The identification relies on the assessment of Th subsets ratio – Th17/Treg, T127hi/Treg, and Th17/T127hi.

## Materials and methods

The study involved 87 patients (58 boys (66.6%), 35 girls (33.4%); 331 observation sessions) with severe injury (SInj), treated at the Department of Anesthesiology and Resuscitation of the Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology. We used the laboratory of the National Medical Research Center for Children's Health for laboratory studies, which were prescribed 1 to 5 times, depending on the length of stay of a given child at the ICU. The mean age of the children was 12.0 (5.75–15.0) years (Me (Q<sub>0.25</sub>-Q<sub>0.75</sub>)). The time options for laboratory studies were the first, third, fifth, seventh and 14th days from the day of injury. The comparison group was comprised of 34 patients (15 boys (44.1%), 19 girls (55.9%); 34 observation sessions) with mild/moderate injury (MInj) treated at the Department of Neurotrauma. The control group was comprised of 80 apparently healthy children, all of them underwent medical examination at the National Medical Research Center for Children's Health. The children were comparable in age and sex: age – 12.41 (4.4–16.2) years (Me (Q<sub>0.25</sub>-Q<sub>0.75</sub>)); 47 boys (58.7%), 33 girls (41.3%).

Assessing the injury, we relied on the Injury Severity Score (ISS) and the Glasgow Coma Scale (GCS). The outcome of an SInj was assessed with the help of the Glasgow Outcome Scale (GOS) and the Severe Injury Outcomes Scale (OISS) [10]. These scales were applied to assess the condition of the patient at discharge from the hospital.

The patients in our study met the following criteria: severe injury (ISS ≥ 16), aged 1-18 years, admittance to the ICU within 72 hours. Concomitant acute

inflammatory and chronic diseases were a reason for exclusion.

At the first stage, we analyzed the results from the control group, the MInj (ISS 4.0 (4.0-9.0) (Me (Q<sub>0.25</sub>-Q<sub>0.75</sub>))) and the SInj group (ISS 26.0 (21.0-29.0) (Me (Q<sub>0.25</sub>-Q<sub>0.75</sub>))). At the second stage, we analyzed the two groups from SInj formed with the help of GOS and OISS, the favorable outcome group (SInjfav, n = 47) and the unfavorable outcome group (SInjunfav, n = 40). The distribution into these groups was based on the scores: patients were allocated to the SInjfav group if they scored 4-5 points on the GOS scale and 1-2 points on the OISS scale, and to the SInjunfav group if they scored 1-3 points on the GOS scale and 3-5 points on the OISS scale.

Clinical and laboratory indicators of systemic inflammatory response syndrome and organ failure were evaluated in all patients with severe injury. Organ functioning was assessed daily after admission to the ICU using MODS (Multiple Organ Dysfunction Score) [7]. Patients with severe injury were divided into groups depending on infectious complications (IC n = 16) and the development of MODS (MODS n = 11).

We assessed the absolute cell count of T127hi – CD4<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup>CD25<sup>high</sup>, Th17 – CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>, Treg – CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup> and their ratio Th17/Treg, T127hi/Treg, and Th17/T127hi in the patients. Two-platform technology enabled assessment of the quantitative indicators of the subpopulation composition of peripheral blood T lymphocytes. The absolute number of lymphocytes was calculated with the help of a Sysmex XT-2000i hematology analyzer (Sysmex Corporation; Japan). The preparation of samples for cytofluorimetric analysis included incubation of 100 µL of whole blood with 10 µL of monoclonal antibodies tagged with fluorochromes for 20 min in a dark place. The erythrocytes were lysed with BD FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences; USA); the duration of incubation therewith in the dark at room temperature did not exceed 10-12 minutes. The resulting samples were analyzed in a Novocyte flow cytometer (ACEA Biosciences; USA). The surface markers used to determine lymphocyte subpopulations were as follows: CD45, IgG1, IgG2a, CD3, CD4, CD25, CD127, CD161 (Beckman Coulter, USA; BD Biosciences, USA; SONY corp., Japan).

We used MS Excel 2016 (Microsoft corp.; USA), Statistica 10 (StatSoft, Inc.; USA) to process the data obtained. The results are presented as a median (Me) and quartiles (Q<sub>0.25</sub>-Q<sub>0.75</sub>). Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis test enabled comparison of differences in the attributes. The conclusions were considered significant at p < 0.05 (\*).

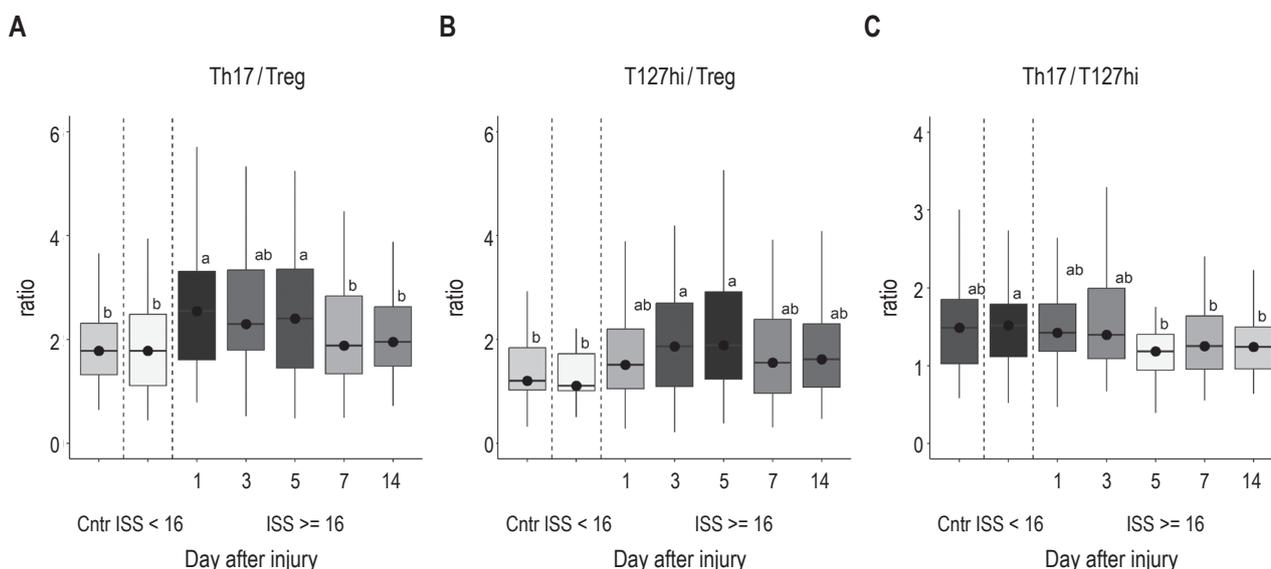
## Results and discussion

Using the nonparametric Kruskal–Wallis test, we compared the differences in Th17/Treg, T127hi/Treg, and Th17/T127hi ratio in children with injury over time in different groups: Control group, Minj and Sinj groups (Table 1, Figure 1). For Sinj group, a pronounced increase of Th17/Treg ratio in the acute post-traumatic period with a decrease to 14 days was revealed groups (Figure 1A). The values of T127hi/Treg and Th17/T127hi in the first day for indicators of patients with MInj correspond to the values of control group and significantly differ from patients with SInj in the 3–5<sup>th</sup> day and in the 5–14<sup>th</sup> day after the injury respectively (Figure 1B, C).

Using the nonparametric Mann–Whitney test, we compared the differences in Th subsets ratio in children with severe injury over time in different groups: with and without MOF, with and without IC and outcome groups (Table 1).

Significant differences in Th17/Treg ratio level were found in IC groups – on 7<sup>th</sup> day, in OISS groups on 14<sup>th</sup> day from, and no reliable differences in groups with and without MOF throughout the observation period. Significant differences in T127hi/Treg ratio level were found in IC groups from 1<sup>st</sup> to 3<sup>rd</sup> day and from 7<sup>th</sup> to 14<sup>th</sup> day, in IC and OISS – no reliable differences. Also, there were no significant differences

in the level of Th17/T127hi for all comparison groups in children with severe trauma (Table 1, Figure 2C–F, see 3<sup>rd</sup> page of cover). Even though the levels of Th subsets ratio in the groups were determined in a wide range of values, patients with MOF had lower median concentrations within from 7<sup>th</sup> to 14<sup>th</sup> day for Th17/Treg and from 3<sup>rd</sup> to 14<sup>th</sup> day – for T127hi/Treg than patients without MOF (Table 1, Figure 2A, B, see 3<sup>rd</sup> page of cover). This is due to differences in the kinetics of the levels of Th subsets in the acute post-traumatic period in children. The level of T127hi lymphocytes reach normal values by 5<sup>th</sup> day, unlike Th17 and Treg, the level of which remains reduced for up to 7–14 days. The patients with MOF and/or with IC had significantly lower median concentrations of Th17 and Treg within 1–7 days after admission to the ICU than patients without MOF/IC (Figure 2, see 3<sup>rd</sup> page of cover). Zhang et al. demonstrated that the level of Th17 showed increased initially and then decreased in patients with thoracic trauma. The frequency of Th17 was significantly increased in traumatic patients compared to healthy controls on the day after admission [11]. Another studies have shown that on trauma patients found elevated Th17/CD4<sup>+</sup>Treg ratios in trauma patients who developed sepsis, furthermore the ratio of Th17 cells to CD4<sup>+</sup>Tregs was skewed in favor of Th17 cells in non-surviving patients [1, 3].



**Figure 1. Dynamics of Th17/Treg (A), T127hi/Treg (B), and Th17/T127hi (C) ratio in the critical period of injury in children**

Note. Me ( $Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$ ) Min–Max; the significance is represented by letters according to pairwise comparison through the Kruskal–Wallis test; comparison groups: Cntr – control group; ISS < 16 – MInj group; ISS >= 16 – SInj group by day after severe injury.

TABLE 1. DYNAMICS OF Th17/Treg, T127hi/Treg, AND Th17/T127hi RATIO IN THE CRITICAL PERIOD OF SEVERE INJURY IN CHILDREN (Sinj GROUP) IN COMPARATION WITH CONTROL GROUP AND Minj GROUP AND IN Sinj GROUP DEPENDING OF IC, MOF DEVELOPMENT AND OUTCOME PREDICTION OF OISS, Me (Q<sub>0.25</sub>-Q<sub>0.75</sub>)

Factor		Control	Minj	Sinj, day after injury				
				1	3	5	7	14
n		80	34	68	87	35	74	67
Th17/Treg	ratio c. u.	1.78 (1.32-2.31)	1.78 (1.11-2.48)	2.58 (1.83-3.36)	2.45 (1.82-3.43)	2.47 (1.50-3.43)	1.88 (1.34-2.84)	1.95 (1.49-2.63)
MOF Th17/Treg	N			2.59 (1.61-3.34)	2.52 (1.80-3.61)	2.50 (1.67-3.86)	2.04 (1.36-2.92)	2.07 (1.54-2.72)
	Y			2.45 (2.21-3.57)	2.28 (2.04-2.97)	2.33 (1.13-2.59)	1.45 (1.18-2.08)	1.49 (1.34-1.99)
IC Th17/Treg	N			2.77 (2.09-3.42)	2.57 (1.94-3.75)	2.47 (1.41-3.20)	2.13 (1.46-2.98)*	2.02 (1.53-2.63)
	Y			2.03 (1.65-2.48)	2.24 (1.77-2.65)	3.21 (2.18-4.56)	1.28 (1.00-1.82)*	1.52 (1.17-2.38)
OISS Th17/Treg	F			2.61 (1.60-3.28)	2.27 (1.77-3.44)	2.38 (1.90-3.85)	2.22 (1.27-3.05)	2.20 (1.77-2.92)*
	UF			2.50 (1.90-4.51)	2.65 (1.99-3.29)	2.54 (1.13-2.88)	1.81 (1.39-2.15)	1.58 (1.32-2.46)*
T127hi/ Treg	ratio c. u.	1.20 (1.03-1.84)	1.11 (1.01-1.73)	1.55 (1.08-2.46)	1.87 (1.09-2.73)	1.89 (1.23-2.92)	1.55 (0.96-2.39)	1.62 (1.08-2.30)
MOF T127hi/ Treg	N			1.53 (1.04-2.23)	1.89 (1.13-2.77)	1.90 (1.40-2.95)	1.63 (1.14-2.40)	1.73 (1.15-2.47)
	Y			1.87 (1.23-3.01)	1.20 (0.82-2.14)	1.22 (0.98-1.89)	0.94 (0.83-2.11)	1.27 (0.99-1.71)
IC T127hi/ Treg	N			1.70 (1.16-2.69)*	2.11 (1.13-2.87)**	1.89 (1.25-2.89)	1.70 (1.11-2.44)*	1.78 (1.15-2.47)*
	Y			1.00 (0.82-1.38)*	1.20 (0.83-1.68)**	2.10 (1.11-3.73)	1.09 (0.77-1.46)*	1.26 (0.78-1.40)*
OISS T127hi/ Treg	F			1.70 (1.10-2.34)	1.69 (1.02-2.51)	1.88 (1.44-2.91)	1.67 (1.01-2.38)	2.01 (1.16-2.82)
	UF			1.41 (1.04-2.74)	2.05 (1.18-2.82)	1.89 (1.06-2.89)	1.45 (0.98-2.31)	1.44 (1.05-1.95)
Th17/ T127hi	ratio c. u.	1.49 (1.03-1.85)	1.52 (1.12-1.79)	1.47 (1.21-2.10)	1.40 (1.09-1.99)	1.18 (0.94-1.40)	1.25 (0.96-1.64)	1.24 (0.96-1.50)

Table 1 (continued)

Factor		Control	MInj	SInj, day after injury				
				1	3	5	7	14
n		80	34	68	87	35	74	67
MOF Th17/ T127hi	N			1.48 (1.21-2.10)	1.38 (1.09-1.96)	1.16 (0.91-1.36)	1.25 (0.94-1.58)	1.20 (0.96-1.56)
	Y			1.36 (1.24-1.61)	1.44 (0.95-2.52)	1.27 (1.26-1.45)	1.46 (1.08-1.82)	1.32 (0.99-1.44)
IC Th17/ T127hi	N			1.42 (1.14-2.09)	1.37 (1.07-1.91)	1.18 (0.89-1.33)	1.25 (0.96-1.63)	1.19 (0.91-1.50)
	Y			1.62 (1.44-2.20)	2.03 (1.26-2.56)	1.22 (1.00-1.66)	1.27 (0.97-1.86)	1.32 (1.12-1.53)
OISS Th17/ T127hi	F			1.43 (1.20-1.80)	1.43 (1.10-2.03)	1.27 (0.90-1.52)	1.33 (0.96-1.62)	1.24 (0.96-1.47)
	UF			1.60 (1.26-2.24)	1.29 (1.09-1.86)	1.08 (1.00-1.27)	1.20 (0.96-1.69)	1.24 (0.97-1.51)

Note. Mann-Whitney U test; \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; comparison groups: MOF group (N, no; Y, yes); Infectious complication (N, no; Y, yes); Outcome (F, favorable outcome; UF, unfavorable outcome); c. u., conventional units.

## Conclusions

Therefore, we have characterized and analyzed the dynamics of Th subsets ratio – Th17/Treg, T127hi/Treg, and Th17/T127hi in the critical period of severe injury in children, which may play an important role in the post-traumatic immunosuppression, and thereby the recovery from trauma. The lower-level T127hi/Treg ratio in trauma patients admitted to the ICU is significantly associated with develop the infectious complications and MOF. The lower-level Th17/Treg is significantly associated with develop the infectious complications and outcome of the traumatic disease.

## Compliance with ethical standards

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Committee on Biomedical Ethics of Institute of Urgent Children Surgery and Traumatology (Protocol No. 2 of 26.05.2020). All study participants signed an informed consent.

## Acknowledgments

The authors express their gratitude to all patients who participated in the study, as well as colleagues from the Department of Combined Trauma, Anesthesiology and Intensive Care Unit of Institute of Urgent Children Surgery and Traumatology.

## References

1. Guo J., Tao W., Tang D., Zhang J., Th17/Regulatory T cell imbalance in sepsis patients with multiple organ dysfunction syndrome: attenuated by high-volume hemofiltration. *Int. J. Artif. Organs*, 2017, Vol. 40, pp. 607-614.
2. Gupta D.L., Bhoi S., Mohan T., Galwnkar S., Rao D.N. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with post traumatic sepsis. *Cytokine*, 2016, Vol. 88, pp. 214-221.
3. Hefele F., Ditsch A., Krysiak N., Caldwell C.C., Biberthaler P., van Griensven M., Huber-Wagner S., Hanschen M. Trauma Induces Interleukin-17A Expression on Th17 cells and CD4<sup>+</sup> regulatory T cells as well as platelet dysfunction. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2389. doi: 10.3389/fimmu.2019.02389.
4. Killien E.Y., Zahlan J.M., Lad H., Watson R.S., Vavilala M.S., Huijsmans R.L.N., Rivara F.P. Epidemiology and outcomes of multiple organ dysfunction syndrome following pediatric trauma. *J. Trauma Acute Care Surg.*, 2022, Vol. 93, no. 6, pp. 829-837.

5. MacConmara M.P., Maung A.A., Fujimi S., McKenna A.M., Delisle A., Lapchak P.H., Rogers S., Lederer J.A., Mannick J.A. Increased CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. *Ann. Surg.*, 2006, Vol. 124, pp. 179-188.
6. Manson J., Cole E., De'Ath H.D., Vulliamy P., Meier U., Pennington D., Brohi K. Early changes within the lymphocyte population are associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in trauma patients. *Crit. Care*, 2016, Vol. 20, no. 1, 176. doi: 10.1186/s13054-016-1341-2.
7. Marshall J.C. Measuring organ dysfunction in the intensive care unit: why and how? *Can. J. Anaesth.*, 2005, Vol. 52, no. 3, pp. 224-230.
8. Mukhametov U., Lyulin S., Borzunov D., Ilyasova T., Gareev I., Sufianov A. Immunologic response in patients with polytrauma. *Noncoding RNA Res.*, 2023, Vol. 8, no. 1, pp. 8-17.
9. Noack M., Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.*, 2014, Vol. 13, pp. 668-677.
10. Wolfson N., Lerner A., Roshal L. Orthopedics in disasters: orthopedic injuries in natural disasters and mass casualty events. *Springer Berlin Heidelberg*; 2016. 448 p.
11. Zhang Y., Li X.F., Wu W., Chen Y. Dynamic changes of circulating T-helper cell subsets following severe thoracic trauma. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015, Vol. 8, no. 11, pp. 21106-21113.

---

**Авторы:**

**Закиров Р.Ш.** — врач клинической лабораторной диагностики клиничко-диагностической лаборатории ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; научный сотрудник лаборатории иммунологических, цитохимических и биохимических методов исследования ГБУЗ города Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

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

**Authors:**

**Zakirov R.Sh.**, Clinical Laboratory Doctor, Clinical Diagnostic Laboratory, National Medical Research Center for Children's Health; Research Associate, Laboratory of Immunology, Cytochemistry and Biochemistry, Institute of Urgent Children Surgery and Traumatology, Moscow, Russian Federation

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

**Фрейдлин Е.В.** — лаборант-исследователь лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

**Янюшкина О.Г.** — научный сотрудник отдела сочетанной травмы, анестезиологии и реанимации ГБУЗ города Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

**Карасева О.В.** — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе, руководитель отдела сочетанной травмы, анестезиологии и реанимации ГБУЗ города Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» Департамента здравоохранения города Москвы; заведующая отделением неотложной хирургии и травмы у детей ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Freidlyn E.V.**, Research Laboratory Assistant, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

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

**Yanyushkina O.G.**, Research Associate, Department of Multiple Trauma and Intensive Care Unit, Institute of Urgent Children Surgery and Traumatology, Moscow, Russian Federation

**Karaseva O.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Research, Chief of Department of Multiple Trauma and Intensive Care Unit, Institute of Urgent Children Surgery and Traumatology; Head, Department of Emergency Surgery and Trauma in Children, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 14.05.2023  
Принята к печати 29.06.2023

---

Received 14.05.2023  
Accepted 29.06.2023

## ФАЗЫ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ СЕПТИЧЕСКОМ И ГЕМОРРАГИЧЕСКОМ ШОКАХ

Зотова Н.В.<sup>1</sup>, Соломатина Л.В.<sup>1</sup>, Журавлёва Ю.А.<sup>1</sup>,  
Бражников А.Ю.<sup>2</sup>, Гусев Е.Ю.<sup>1</sup>

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

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

**Резюме.** Шоковые состояния различной природы можно рассматривать в качестве клинических эквивалентов системного воспаления (СВ), основными проявлениями которого являются выраженная гиперцитокинемия, другие проявления системной воспалительной реакции (СВР), коагулопатия, полиорганная недостаточность (ПОН), дистресс гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), системная тканевая альтерация. В совокупности эти феномены связаны прямыми и обратными связями с системными микроциркуляторными расстройствами, определяющими патогенез шоковых состояний. Целью исследования стало выявление особенностей развития фаз СВ при развитии двух вариантов септического шока, а именно при остром (первая неделя процесса) и затяжном/подостром сепсисе (от 2 до 6 недель с начала манифестации), а также геморрагического шока (исследование через 4–12 часа от начала массивной кровопотери). Для верификации фаз СВ использовали ранее предложенную нами шкалу СВ, включающую значение шести уровней СВР (УР-0–5), а также дополнительные критерии СВ, а именно ПОН (шкала SOFA), а в плазме крови: D-димеры (> 500 нг/мл), кортизол (> 1380 нмоль/мл), маркеры альтерации – миоглобин (> 800 нг/мл) и/или тропонин I (> 0,2 нг/мл). Для расчета УР определяли содержание в плазме крови: CRP и 4 цитокинов (IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ ). Наличие СВ устанавливали при значении шкалы СВ  $\geq$  5 баллов (цифровые значения УР + наличие дополнительных критериев, каждый равен 1 баллу). При верификации фаз учитывали время и тяжесть развития критического состояния, а также значения УР. При этом выделяли 3 основные фазы СВ: развития, цитокинового шторма / флогогенного удара (УР-4–5) и депрессивную фазу (фазу истощения), последняя характеризуется относительно небольшими значениями СВР (УР-2–3). Летальность при шоке на фоне острого сепсиса (n = 13) составила 71,4%, при затяжном сепсисе (n = 17) – 94,1%, при геморрагическом шоке, не купированном в течении 24 часов после массивной кровопотери (n = 13), – 53,8%. Развитие шока при остром сепсисе и геморрагиче-

### Адрес для переписки:

Соломатина Лилия Владимировна  
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»  
Уральского отделения Российской академии наук  
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.  
Тел./факс: 8 (343) 374-00-70.  
E-mail: slv10@list.ru

### Address for correspondence:

Liliya V. Solomatina  
Institute of Immunology and Physiology  
106 Pervomayskaya St  
Yekaterinburg  
620049 Russian Federation  
Phone/fax: +7 (343) 374-00-70.  
E-mail: slv10@list.ru

### Образец цитирования:

Н.В. Зотова, Л.В. Соломатина, Ю.А. Журавлёва,  
А.Ю. Бражников, Е.Ю. Гусев «Фазы системного  
воспаления при септическом и геморрагическом шоках»  
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,  
№ 3. С. 273–280.  
doi: 10.46235/1028-7221-9974-POS

© Зотова Н.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

N.V. Zotova, L.V. Solomatina, Yu.A. Zhuravleva,  
A.Yu. Brazhnikov, E.Yu. Gusev “Phases of systemic  
inflammation in septic and haemorrhagic shocks”, Russian  
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 273–280.  
doi: 10.46235/1028-7221-9974-POS

© Zotova N.V. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-9974-POS

ском шоке (исследование в первые 4-12 часов после начала массивной кровопотери) сопровождается выраженностью критической фазы цитокинового шторма / ФФУ с преобладанием УР-5 в случаях летальных исходов, а при затяжном сепсисе – депрессивной фазы (УР-2-3). Общая летальность (по всем группам) на фазе ФФУ составила 66,7%, на депрессивной фазе – 89,5%, а на фазе развития при геморрагическом шоке – 15,4% (при этом не исключен переход этой фазы в более критические фазы СВ до момента летального исхода).

В основе шоковых состояний как септической, так и асептической природы лежит типовой патологический процесс СВ, который необходимо дифференцировать от признаков СВР, характерных для высокоинтенсивного канонического воспаления. СВ отличается от классического воспаления и характеризуется более высокими значениями цитокинемии (фаза цитокинового шторма) или наличием комплекса дополнительных феноменов СВ при относительно умеренных значениях СВР (депрессивная фаза СВ). При этом депрессивная фаза СВ по своей критичности является более фатальной для исхода заболевания по сравнению с фазой цитокинового шторма с большей выраженностью СВР.

*Ключевые слова: системное воспаление, сепсис, геморрагический шок, септический шок, полиорганная недостаточность, цитокины*

## PHASES OF SYSTEMIC INFLAMMATION IN SEPTIC AND HAEMORRHAGIC SHOCKS

Zotova N.V.<sup>a</sup>, Solomatina L.V.<sup>a</sup>, Zhuravleva Yu.A.<sup>a</sup>, Brazhnikov A.Yu.<sup>b</sup>, Gusev E.Yu.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** Shocks of different origin (both septic and aseptic) be be considered clinical equivalents of systemic inflammation (SI) with following main manifestations : pronounced hypercytokinemia, other markers of systemic inflammatory response (SIR), coagulopathy, multiple organ failure (MOF), hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) distress, systemic tissue alteration. In general, these phenomena are directly and inversely related to systemic microcirculatory disturbances which determine the pathogenesis of distinct shock states. The aim of our study was to identify the features of SI phases in the development of two variants of septic shock, i.e., acute course (first week of the process) and prolonged/subacute sepsis (2 to 6 weeks from the onset of manifestations), as well as haemorrhagic shock studied 4-12 hours from the onset of massive blood loss. To verify the SI phases, we used the previously proposed SI scale, including the value of six SIR levels (RL-0-5), as well as additional criteria of SI, i.e., evaluation of clinical MOF grade (SOFA scale), plasma D-dimers (> 500 ng/mL), cortisol (> 1380 nmol/mL), tissue alteration markers, e.g., myoglobin (> 800 ng/mL) and/or troponin I (> 0.2 ng/mL). To calculate RL in SIR, plasma CRP and four cytokines (IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ ) were determined. The presence of SI was established if the SI scale exceeded 5 points (numerical RL values + presence of additional criteria, each equal to 1 point). The time and severity of the developing critical state, as well as the RL scores, were taken into account when reviewing the phases.

There were three main SI phases: (1) evolving condition, (2) cytokine storm/phlogogenic hit (SD-4-5), and depressive (exhausting) phase. The latter was characterized by relatively low SIR values (RL-2-3). The lethality rate for shock in the presence of acute sepsis (n = 13) was 71.4%, reaching 94.1% in prolonged sepsis (n = 17). For haemorrhagic shock after massive blood loss, if not resolved within 24 hours the mortality rates was 53.8% (n = 13). Development of shock in acute sepsis, and haemorrhagic shock (within 4 to 12 hours after the onset of massive blood loss) is accompanied by the severity of critical-phase cytokine storm/PPS with a predominance of RL-5 in cases of lethal outcomes, and by a depression phase (RL-2-3) in prolonged sepsis. Overall mortality (for all groups) was 66.7% in the PS phase, 89.5% in the depressive phase and 15.4% in the evolving phase of haemorrhagic shock (with possible transition from this phase to the more critical SI phases until lethal outcome).

Shock states of both septic and aseptic origin are based on a typical pathological process of SI, which should be distinguished from the signs of SIR characteristic of high-intensity canonical inflammation. It is characterized by higher cytokinemia (cytokine storm phase) or by the presence of additional SI phenomena with relatively moderate SIR levels (depressive SI phase). Thus, the depressive phase of SI is more fatal for disease outcome compared to the cytokine storm phase with higher intensity of SIR.

*Keywords: systemic inflammation, sepsis, hemorrhagic shock, septic shock, multiple organ failure, cytokines*

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

## Введение

В основе любого воспалительного процесса лежит стрессорная реакция клеток и тканей на воздействие факторов реального или потенциального повреждения [6, 7]. При этом воспаление можно подразделить на три самостоятельных общепатологических процесса: (1) хроническое воспаление низкой интенсивности, или метаболическое воспаление, (2) классическое воспаление с характерными очаговыми проявлениями воспалительного процесса, (3) системное гипервоспаление (СВ). Все три варианта воспаления имеют системную составляющую в виде системной воспалительной реакции (СВР), но с различной степенью ее интенсивности и критичности. Наиболее драматичным для жизни пациентов вариантом воспаления является острое СВ, которое характеризуется микроциркуляторными расстройствами в жизненно важных органах, диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови (ДВС), полиорганной недостаточностью (ПОН), признаками системной тканевой альтерации, шоковыми состояниями. При этом динамика СВ определяется сменой фаз с различной выраженностью СВР и тяжести состояния, в зависимости от длительности критического состояния и интенсивности системного повреждения [1, 3].

Наиболее очевидным клиническим эквивалентом СВ является рефрактерный дистрибутивный шок, прежде всего септический шок (СШ) [2]. В свою очередь, геморрагический шок характеризуется критической гиповолемией, но при несвоевременном купировании этот процесс приобретает свойства дистрибутивного шока, связанного с системными микроциркуляторными расстройствами [2, 5].

Ключевым иммунологическим параметром СВ является выраженность СВР, определяемая, прежде всего, по уровням цитокинemia (УР). В предыдущих наших исследованиях для стандартной оценки интенсивности СВР, выраженной шестью уровнями (УР-0-5), в плазме крови

определяли концентрацию С-реактивного белка (CRP) и 4 цитокинов: IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$  [9, 10]. При этом УР-0 соответствует референсным интервалам нормы, УР-1 практически исключает острое СВ, УР-2-3 могут характеризовать гиперцитокинемию при выраженном классическом воспалении, но также и гипоэргическую (депрессивную) фазу СВ (ДФ), а УР-4-5 могут характеризовать феномен цитокинового шторма или, иначе, гиперэргические фазы СВ (фазы флогогенного удара – ФФУ). Таким образом, для верификации СВ, помимо уровней СВР, необходимо регистрировать и другие феномены СВ, включая: ДВС, ПОН, дистресс нейроэндокринной системы, системную тканевую альтерацию. Определение всех этих феноменов, наряду с УР, в рамках предлагаемой нами интегральной шкалы СВ позволяет не только верифицировать СВ, но и определить фазы этого процесса, а именно фазы развития и разрешения, ФФУ и ДФ [9, 11].

**Целью исследования** стало выявление особенностей развития фаз СВ при разных видах шоковых состояний: септическом шоке, возникшем на фоне острого или затяжного/подострого сепсиса и геморрагическом шоке.

## Материалы и методы

### Пациенты

Пациенты с шоковыми состояниями инфекционного и неинфекционного генеза были выбраны для выявления особенностей динамики развития СВ. Всего было проанализировано 4 группы:

1. Септический шок (СШ). Согласно критериям «Сепсис-3» [8], у пациентов с сепсисом на 1-2-е сутки после поступления в отделение интенсивной терапии, наличие гипотонии, не реагирующей на вазопрессоры, оценка по шкале SOFA от 6 до 14 баллов, средняя – 9,75 (n = 14, средний возраст – 49,1 $\pm$ 17,8 лет, мужчины/женщины = 57,1%/42,9%). Летальные исходы (n = 10) в 71,4% случаев;

2. Третичный перитонит (ТП) с затяжным (14-30 дней) и подострым (> 30 дней от начала манифестации) септическим процессом с раз-

витиём септического шока (ТП СШ),  $n = 17$ , средний возраст –  $50,2 \pm 15,6$  лет, мужчины/женщины =  $64,7\%/35,3\%$ , оценка по шкале SOFA не рассчитывалась. Летальные исходы ( $n = 16$ ) в  $94,1\%$  случаев. Данная группа рассматривалась как подострый вариант септического шока в сравнении с «острым» вариантом СШ при сепсисе, согласно дефинициям «Сепсис-3» [8].

Пациенты с острой патологической кровопотерей при осложненном течении беременности и родов более  $10\text{--}15\%$  объема циркулирующей крови. Причинами кровотечения стали: отслойка плаценты, эмболия амниотической жидкостью, разрыв матки, кесарево сечение, выскабливание полости матки и прочие. Случаи с наличием острого инфекционного заболевания, септическими осложнениями беременности и родов, хроническими инфекционными заболеваниями в стадии обострения на момент исследования, системными аутоиммунными заболеваниями соединительной ткани из исследования исключались.

3. Шок купируемый – пациентки, у которых течение беременности и родов было осложнено кровотечением с развитием геморрагического шока, а в  $76,9\%$  случаев ( $10$  из  $13$ ) и ПОН. Шок был купирован соответствующей терапией в течение  $24$  часов ( $n = 13$ , возраст  $23\text{--}41$  год, средний возраст –  $28,9 \pm 6,0$  лет, балл по шкале SOFA у пациентов с ПОН от  $2$  до  $4$ , средний балл =  $2,3$ ). Объем кровопотери составил от  $2000$  мл до  $4800$  мл, среднее –  $3000$  мл.

4. Шок некупируемый – кровотечение с развитием геморрагического шока, не купируемого в течение первых  $24$  часов ( $n = 13$ , возраст  $24\text{--}36$  лет, средний возраст –  $29,5 \pm 5,3$  лет). Объем кровопотери – от  $1500$  мл до  $12000$  мл, среднее –  $3523,1$  мл.

Пациентам всех исследуемых групп проводилась соответствующая инфузионно-трансфузионная, заместительная гемостатическая, противошоковая терапия.

Группа сравнения для групп шок купируемый/некупируемый – пациентки, у которых течение беременности и родов было осложнено кровотечением без развития геморрагического шока ( $n = 13$ , возраст  $16\text{--}35$  лет, средний возраст –  $26,8 \pm 1,7$  года), при этом у одной пациентки отмечалось развитие ПОН, балл по шкале SOFA –  $3$ , с терапевтической коррекцией ПОН к исходу первых  $24$  часов. Объем кровопотери у  $10$  пациенток составил  $750\text{--}1500$  мл ( $76,9\%$ ),  $1500\text{--}2000$  мл в двух случаях ( $15,4\%$ ) и в одном случае  $> 2000$  мл ( $7,7\%$ ).

Контрольная группа – здоровые доноры крови в возрасте  $18\text{--}55$  лет ( $n = 50$ , средний возраст –  $34,1 \pm 10,4$  года, мужчины/женщины =  $52\%/48\%$ ).

#### Измерение биомаркеров

Мы исследовали стабилизированную цитратом плазму крови, предварительно замороженную при  $-20$  °С. Уровни IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ , CRP, кортизола, миоглобина, тропонина I и D-димеров в образцах плазмы крови анализировали с помощью закрытой системы для иммунохемилюминесцентного анализа Immulite (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, США).

#### Верификация системного воспаления

Мы использовали ранее предложенные нами шкалы СВ и УР для верификации СВ и его фаз, а также выраженности СВР [9, 10].

#### Статистический анализ

Описательная статистика представлена по основным характеристикам:  $m$  – среднее значение,  $Me$  – медиана,  $Q_{0,25}\text{--}Q_{0,75}\%$  – квартили. Для проверки гипотезы о ненормальности распределения выборок использовались тесты Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Сравнение эмпирических данных проводили с помощью теста Манна–Уитни, частотных распределений в группах – с помощью теста Хи-квадрат ( $\chi^2$ ) для категориальных переменных. Все результаты считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Согласно данным таблицы 1, шоковые состояния разной этиологической природы характеризовались выраженным повышением в крови практически всех молекулярных маркеров СВ, что подтверждает общепатологический характер этого процесса. Однако выявлены существенные отличия при сопоставлении как септического и асептического шока, так и двух вариантов СШ (купируемого и некупируемого). Септический шок при остром сепсисе в сравнении с затяжным/подострым процессом (третичный перитонит) отличался более высокими значениями большинства показателей СВР (IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ , баллы по шкалам УР и СВ), при сопоставимости маркеров других феноменов СВ (табл. 1). Подобная закономерность прослеживалась при использовании интегральных критериев (табл. 2). Так, при двух вариантах СШ у пациентов в  $100\%$  случаях фиксировались только наиболее критичные для жизни фазы СВ, а именно фазы флогогенного удара (ФФУ) и депрессивная фаза (ДФ). Между тем, при остром сепсисе (группа № 2) преобладали ФФУ ( $78,6\%$ ), а при затяжном

**ТАБЛИЦА 1. ОПИСАТЕЛЬНАЯ СТАТИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ГРУППАХ ПАЦИЕНТОВ С ШОКАМИ (m / Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>) %)**

**TABLE 1. DESCRIPTIVE STATISTICS OF THE INDICATORS STUDIED IN THE GROUPS OF PATIENTS WITH SHOCKS (m / Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>) %)**

Группы (№) Groups (No.)	Доноры (№ 1) Donors (No. 1) n = 24	СШ (№ 2) Septic shock (No. 2) n = 14	ТП СШ (№ 3) TP SS (No. 3) n = 17	Купируемый шок (№ 4) Manageable shock (No. 4) n = 13	Некупируемый шок (№ 5) Unresponsive shock (No. 5) n = 13
Показатели Parameter					
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	< 5 / < 5	4168,86 / 2583,50 (341,00-4074,00)	410,06 / 75,10 (59,60-99,00) <sup>1</sup>	75,15 / 32,50 (25,50-51,10)	4674,85 / 114,00 (73,50-3640,00) <sup>2</sup>
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	< 10 < 5 (< 5,00-5,50)	698,57 / 493,00 (149,00-999,00)	140,46 / 65,90 (48,10-185,00) <sup>1</sup>	145,05 / 21,50 (7,90-327,00)	2245,28 / 138,00 (51,40-1342,00)
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	< 5 / < 5	116,51 / 93,20 (47,60-176,00)	11,25 / 7,80 (4,90-11,90) <sup>1</sup>	68,93 / 49,70 (< 5,00-106,00)	748,15 / 90,30 (38,10-597,00)
TNF $\alpha$ , пг/мл TNF $\alpha$ , pg/mL	< 8 / < 8	258,28 / 45,50 (26,00-141,00)	17,99 / 17,80 (15,50-20,00) <sup>1</sup>	171,63 / 19,60 (15,00-123,00)	291,46 / 50,20 (23,10-161,00)
CRP, мг/л CRP, mg/L	0,19 / 0,15 (0,10-0,22)	25,34 / 28,25 (10,80-34,00)	20,62 / 11,10 (8,50-25,10)	2,96 / 1,40 (0,78-3,50)	1,82 / 1,20 (0,36-2,99)
Тро, нг/мл Tro, ng/mL	< 0,2 / < 0,2	0,76 / 0,21 (0,19-0,27)	1,58 / 0,23 (0,19-1,10)	0,40 / < 0,2 (< 0,20-0,56)	24,69 / 0,55 (< 0,20-1,70)
Мио, нг/мл Myo, ng/mL	13,92 / 13,05 (11,50-15,10)	224,47 / 121,00 (31,00-289,00)	276,78 / 166,00 (105,00-259,00)	177,86 / 155,00 (89,00-175,00)	423,03 / 364,00 (96,70-682,00)
Кор, пмоль/л Cor, pmol/L	370,87 / 352,50 (254,00-523,50)	1467,29 / 1430,00 (970,00-1920,00)	1061,12 / 1015,00 (513,00-1396,00)	1049,60 / 1084,00 (308,00-1266,00)	1479,23 / 1395,00 (946,00-1532,00)
SOFA, балл SOFA, point	0	9,75 / 10,00 (8,50-11,00)	8,06 / 8,00 (5,00-11,00)	2,31 / 3,00 (2,00-3,00)	10,15 / 10,00 (6,00-14,00) <sup>2</sup>
УР RL	0,00 / 0,00 (0,00-0,00)	4,14 / 4,00 (4,00-5,00)	2,71 / 3,00 (2,00-3,00) <sup>1</sup>	3,00 / 3,00 (3,00-3,00)	3,54 / 3,00 (3,00-5,00)
СВ, балл SI, point	0	7,00 / 7,00 (6,00-8,00)	5,65 / 6,00 (5,00-6,00) <sup>1</sup>	5,08 / 5,00 (4,00-6,00)	6,77 / 7,00 (7,00-8,00) <sup>2</sup>

Примечание. <sup>1</sup> – статистически значимые отличия (U-критерий Манна–Уитни, p < 0,05) между группами № 2 и № 3, <sup>2</sup> – статистически значимые отличия (U-критерий Манна–Уитни, p < 0,05) между группами № 4 и № 5.

Note. <sup>1</sup>, statistically significant differences (Mann-Whitney (U) test, p < 0.05) between groups No. 2 and No. 3; <sup>2</sup>, statistically significant differences (Mann-Whitney (U) test, p < 0.05) between groups No. 4 and No. 5.

сепсисе (группа № 3) – ДФ (94,1%). Уменьшение соотношения ФФУ/ДФ при увеличении длительности процесса являлось общей закономерностью СВ. При этом доминирование ДФ являлось неблагоприятным прогностическим фактором, что подтверждается высоким уровнем летальности в группе № 3 (94%).

При массивной кровопотере (> 1500 мл) критерии СВ регистрировали однократно в период 4-12 часов после ее начала. При этом в случае предотвращения развития геморрагического шока развитие СВ не характерно (группа № 6, табл. 2). Напротив, при наличии геморрагического шока СВ выявлялось у большинства пациен-

**ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА (%) РЕГИСТРАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ЗНАЧЕНИЙ УР, РЕГИСТРАЦИИ СВ И ЕГО ФАЗ, ЛЕТАЛЬНЫХ ИСХОДОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ**

TABLE 2. FREQUENCY OF DIFFERENT RL, REGISTRATION OF SI, LETHAL OUTCOMES, AND RATE OF SI PHASES IN THE STUDIED GROUPS (%)

Группы (№) Groups (No.)	УР RL					СВ SI	ЛИ LO	Фазы СВ SI phases		
	1	2	3	4	5			Развития Developmental	ФФУ PPS 5	ДФ DP
Доноры (№ 1) Donors (No. 1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
СШ (№ 2) Septic shock (No. 2)	0,0	7,1 <sup>1</sup>	14,3 <sup>1</sup>	42,9 <sup>1</sup>	35,7 <sup>1</sup>	100	71,4	0,0	78,6 <sup>1</sup>	21,4 <sup>1</sup>
ТП СШ (№ 3) TP SS (No. 3)	0,0	35,3	58,8	5,9	0,0	100	94,1	0,0	5,9	94,1
Купируемый шок (№ 4) Manageable shock (No. 4)	0,0	23,1	53,8	23,1	0,0	76,9 <sup>2</sup>	0,0	53,8	23,1	0,0
Некупируемый шок (№ 5) Unresponsive shock (No. 5)	7,7	15,4	30,8	7,7	38,5 <sup>2</sup>	92,3 <sup>2</sup>	53,8 <sup>2</sup>	46,2	46,2	0,0
Кровопотеря без шока (№ 6) Bleeding without shock (No. 6)	7,7	61,5	23,1	7,7	0,0	7,7	0,0	0,0	7,7	0,0

Примечание. <sup>1</sup> – статистически значимые отличия ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ) между группами № 2 и № 3, <sup>2</sup> – статистически значимые отличия ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ) между группами № 4 и № 5, СШ – септический шок, ТП СШ – септический шок при третичном перитоните, ЛИ – летальные исходы, ФФУ – фаза флогогенного удара, ДФ – депрессивная фаза. Доноры (контроль) в 100% случаев УР = 0.

Note. <sup>1</sup>, statistically significant difference ( $\chi^2$ ,  $p < 0.05$ ) between groups No. 2 and No. 3; <sup>2</sup>, statistically significant difference ( $\chi^2$ ,  $p < 0.05$ ) between groups No. 4 and No. 5; SS, septic shock; TS SS, septic shock in tertiary peritonitis; LO, lethal outcome; PSP, phlogogenic stroke phase; DP, depressive phase. Donor (control) in 100% of cases RL = 0.

тов. В этих случаях фиксировались две фазы СВ, а именно относительно некритичная фаза развития и ФФУ. При этом у пациентов с некупируемым в течение 24 часов шоком (группа № 5), в отличие от группы № 4 с купированным шоком, доминировала максимальная интенсивность СВР (УР-5), а во втором случае – УР-4 (табл. 2). Подобная закономерность подтверждалась и наличием значимых ( $p < 0,05$ ) различий между этими группами по ряду других показателей СВР и СВ, представленных в таблице 1 (IL-6, баллы по шкалам СВ и SOFA).

Следует отметить, что динамика СВ при геморрагическом шоке отличалась большей стремительностью (вариант «прорыв») в отличие от острого сепсиса (вариант «продавливание», за

исключением молниеносного сепсиса) [3, 9], что требует мониторинга этого процесса в течение первых суток. Так, исследование динамики вариантов «прорыв» с летальными исходами в четырех случаях эмболий околоплодными водами показало, что фаза развития определяется в первые 3-5 часов от момента наступления критического состояния, затем эта фаза переходит в ФФУ (2 летальных исхода), а ДФ (2 других летальных исхода) развивается примерно к концу первых или в начале 2-х суток от момента возникновения критического состояния [4]. Таким образом, менее четкие, чем при сепсисе, результаты определения критических фаз развития СВ при геморрагическом шоке можно отчасти объяснить однократностью этого динамического исследова-

ния в 1-е сутки процесса. Учитывая указанную неоднозначность, нельзя исключить связь определенной части летальных исходов, особенно начиная с конца первых суток после начала массивной кровопотери, с развитием именно ДФ. Вероятно, и реальный процент СВ в группах геморрагического шока, особенно некупированного, мог быть выше при многократных определениях исследуемых параметров в течение первых 24 часов развития этого патологического процесса. Тем не менее можно утверждать, что СВ, особенно его фаза развития и начальные проявления ФФУ, не являются фатальным приговором для пациентов, поскольку своевременное применение интенсивной терапии может успешно купировать дальнейшее развитие СВ. При этом общая летальность (по всем исследуемым группам) на

фазе ФФУ в настоящем исследовании составила 66,7%, на ДФ – 89,5%, а на фазе развития при геморрагическом шоке – 15,4%.

## Заключение

Шоковые состояния как септической, так и асептической природы в большинстве случаев патогенетически связаны с развитием СВ. В свою очередь, развитие СВ характеризуется сменой нескольких фаз. При этом фаза цитокинового шторма (фаза флогогенного удара) не является единственной критической фазой при сопоставлении ее с депрессивной фазой, которая характеризуется более низкими значениями выраженности СВР, но такой же и даже более высокой вероятностью летальных исходов.

## Список литературы / References

1. Гусев Е.Ю., Зотова Н.В., Лазарева М.А. Цитокиновый ответ и другие отличительные особенности критических фаз системного воспаления при сепсисе // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 2. С. 173-182. [Gusev E.Yu., Zotova N.V., Lazareva M.A. Cytokine response and other distinctive features of critical phases of systemic inflammation in sepsis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 2, pp. 173-182. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-2-173-182.
2. Гусев Е.Ю., Зотова Н.В., Черешнев В.А. «Сепсис-3»: новая редакция – старые проблемы. Анализ с позиции общей патологии // Инфекция и иммунитет, 2021. Т. 11, № 4. С. 649-662. [Gusev E.Yu., Zotova N.V., Chereshevnev V.A. Sepsis-3: new edition – old problems. Analysis from the perspective of general pathology. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, Vol. 11, no. 4, pp. 649-662. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-SAN-1629.
3. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А. Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть. 4. Динамика процесса // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2014. Т. 58, № 4. С. 4-16. [Gusev E.Yu., Chereshevnev V.A. Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part IV. A dynamics of the process. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy*, 2014, Vol. 58, no. 4, pp. 4-16. (In Russ.)]
4. Brazhnikov A., Zotova N., Solomatina L., Sarapultsev A., Spirin A., Gusev E. Shock-associated systemic inflammation in amniotic fluid embolism, complicated by clinical death. *Pathophysiology*, 2023, Vol. 30, no. 1, pp. 48-62.
5. Eastridge B.J., Holcomb J.B., Shackelford S. Outcomes of traumatic hemorrhagic shock and the epidemiology of preventable death from injury. *Transfusion*, 2019, Vol. 59, no. S2, pp. 1423-1428.
6. Gusev E.Yu., Zotova N.V. Cellular stress and general pathological processes. *Curr. Pharm. Des.*, 2019, Vol. 25, no. 3, pp. 251-297.
7. Gusev E., Zhuravleva Y. Inflammation: A new look at an old problem. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 9, 4596. doi: 10.3390/ijms23094596.
8. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M, Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Cooper-Smith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016, Vol. 315, no. 8, pp. 801-810.
9. Zotova N.V., Chereshevnev V.A., Gusev E.Yu. Systemic inflammation: methodological approaches to identification of the common pathological process. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 5, e0155138. doi: 10.1371/journal.Pone.0155138.

10. Zotova N.V., Zhuravleva Y.A., Zubova T.E., Gusev E.Y. Integral estimation of systemic inflammatory response under sepsis. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2020, Vol. 39, no. 1, pp. 13-26.

11. Zotova N., Zhuravleva Y., Chereshev V., Gusev E. Acute and chronic systemic inflammation: features and differences in the pathogenesis, and integral criteria for verification and differentiation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 2, 1144. doi: 10.3390/ijms24021144.

---

**Авторы:**

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

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

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

**Бражников А.Ю.** — к.м.н., доцент кафедры анестезиологии, реаниматологии, токсикологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

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

**Authors:**

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

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

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

**Brazhnikov A. Yu.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Anesthesiology, Resuscitation, Toxicology and Transfusiology, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

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

---

Поступила 15.05.2023

Отправлена на доработку 29.06.2023

Принята к печати 05.07.2023

---

Received 15.05.2023

Revision received 29.06.2023

Accepted 05.07.2023

## **ЭФФЕКТ СОВМЕСТНОГО ВЛИЯНИЯ МЕТОТРЕКСАТА И МЕТАБОЛИТОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ НА ПРОДУКЦИЮ TNF $\alpha$ И IFN $\gamma$ МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

**Иванова Е.В., Чайникова И.Н., Бекпергенова А.В., Бондаренко Т.А.,  
Челпаченко О.Е., Здвизжкова И.А., Перунова Н.Б., Бухарин О.В.**

*Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН – обособленное структурное подразделение  
ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Оренбург, Россия*

**Резюме.** Метотрексат является препаратом первой линии для лечения ряда ревматических и неревматических заболеваний, включая онкопатологию, однако его терапевтическая эффективность ограничивается выраженной токсичностью в отношении многих органов (миело-, гепато-, нефротоксичность, мукозит, энтерит, дисбиоз различных биотопов человека и др.). В последнее время в ряде исследований установлено, что метаболиты бифидо- и лактобактерий способны усиливать терапевтический эффект химиотерапевтических препаратов и ограничивать их токсические свойства. Целью работы явилось исследование возможного потенцирующего эффекта бесклеточных супернатантов бифидобактерий при совместном с метотрексатом воздействии на секрецию провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  мононуклеарными клетками периферической крови человека. Изучение иммунорегуляторного влияния метаболитов бифидобактерий, метотрексата и их совместной комбинации оценивали по способности изменять продукцию цитокинов TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  на модели мононуклеаров при сокультивировании в условиях *in vitro*. Анализ сочетанного влияния метаболитов бифидобактерий и цитостатика на продукцию цитокинов выявил их синергидный эффект в отношении двух ключевых провоспалительных цитокинов – TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ : усиление, по сравнению с контролем (пробы с метотрексатом без супернатантов бифидобактерий), ингибирования продукции раннего провоспалительного цитокина TNF $\alpha$  и, напротив, усиление стимуляции секреции IFN $\gamma$ , регулирующего клеточные эффекторы. Полученные результаты на примере исследуемых цитокинов свидетельствуют о наличии потенцирующего влияния метаболитов бифидобактерий на противовоспалительные и иммунорегуляторные свойства метотрексата. Таким образом, метаболиты бифидобак-

### **Адрес для переписки:**

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

### **Address for correspondence:**

Elena V. Ivanova  
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis  
11 Pionerskaya St  
Orenburg  
460000 Russian Federation.  
Phone: +7 (3532) 77-26-19.  
E-mail: walerewna13@gmail.com

### **Образец цитирования:**

Е.В. Иванова, И.Н. Чайникова, А.В. Бекпергенова,  
Т.А. Бондаренко, О.Е. Челпаченко, И.А. Здвизжкова,  
Н.Б. Перунова, О.В. Бухарин «Эффект совместного  
влияния метотрексата и метаболитов  
бифидобактерий на продукцию TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$   
мононуклеарами периферической крови человека»  
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,  
№ 3. С. 281–286.  
doi: 10.46235/1028-7221-9839-CEO

© Иванова Е.В. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

E.V. Ivanova, I.N. Chainikova, A.V. Bekpergenova,  
T.A. Bondarenko, O.E. Chelpachenko, I.A. Zdvizhkova,  
N.B. Perunova, O.V. Bukharin “Combined effect of  
methotrexate and Bifidobacteria metabolites on TNF $\alpha$  and  
IFN $\gamma$  production by human peripheral blood mononuclears”,  
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 281–286.  
doi: 10.46235/1028-7221-9839-CEO

© Ivanova E.V. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.46235/1028-7221-9839-CEO

терий могут рассматриваться в качестве перспективного средства, потенцирующего терапевтические свойства метотрексата посредством подавления секреции  $TNF\alpha$  и стимуляции  $IFN\gamma$  иммунокомпетентными клетками. Дальнейшее изучение сочетанного влияния метотрексата и метаболитов кишечной микробиоты на продукцию цитокинов различных функциональных групп эффекторными клетками целесообразно для разработки способов усиления терапевтического эффекта метотрексата и ограничения его токсических свойств метаболитами бифидобактерий.

*Ключевые слова:* бифидобактерии, бесклеточные супернатанты, метотрексат, цитокины, мононуклеары периферической крови человека

## COMBINED EFFECT OF METHOTREXATE AND BIFIDOBACTERIA METABOLITES ON $TNF\alpha$ AND $IFN\gamma$ PRODUCTION BY HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEARS

Ivanova E.V., Chainikova I.N., Bekpergenova A.V., Bondarenko T.A., Chelpachenko O.E., Zdvizhkova I.A., Perunova N.B., Bukharin O.V.

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

**Abstract.** Methotrexate (Mtx) is a first-line drug for the treatment of numerous rheumatic and non-rheumatic disorders, including oncological diseases. However, therapeutic efficacy of Mtx is limited by severe toxicity to many organs (myelo-, hepato-, nephrotoxicity, mucositis, enteritis, dysbiosis at various human biotopes, etc.). Recently, a number of studies showed that some metabolites of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* are able to enhance effect of chemotherapeutic drugs and limit their toxic properties. The aim of the present work was to study the possible potentiating action of *Bifidobacteria* cell-free supernatants and methotrexate upon secretion of pro-inflammatory  $TNF\alpha$  and  $IFN\gamma$  cytokines by human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The immunoregulatory effects upon production of  $TNF\alpha$  and  $IFN\gamma$  was evaluated in the *in vitro* model of cultured PBMC supplemented with *Bifidobacteria* metabolites, methotrexate, or their combination. Analysis of the combined effect of *Bifidobacteria* metabolites and Mtx on the cytokine production revealed their synergism towards the key pro-inflammatory cytokines ( $TNF\alpha$  and  $IFN\gamma$ ). We found an increase against the control cultures (with Mtx only), inhibition of the early pro-inflammatory cytokine  $TNF\alpha$  production. On the contrary, we revealed an increased secretion of  $IFN\gamma$  which regulates the effector cells. The results obtained with these cytokines suggest the presence of a potentiating effect of *Bifidobacteria* metabolites upon anti-inflammatory and immunoregulatory properties of methotrexate. Thus, *Bifidobacteria* metabolites can be considered a promising agent which potentiates the therapeutic action of methotrexate by suppressing  $TNF\alpha$  secretion and stimulating  $IFN\gamma$  by immunocompetent cells. Further studies of the combined effects of Mtx and metabolites from the intestinal microbiota upon the cytokine production by effector cells could be recommended, aiming to enhance therapeutic effect of methotrexate and limit its toxic properties using the *Bifidobacteria* metabolites.

*Keywords:* *Bifidobacteria*, cell-free supernatants, methotrexate, cytokines, peripheral blood mononuclear cells, human

### Введение

Метотрексат является препаратом первой линии для лечения ряда ревматических и неревматических заболеваний, включая онкопатологию. Благодаря иммуносупрессивным свойствам, МТХ также используется для лечения аутоиммунных заболеваний [3, 15]. Противовоспалитель-

ная и иммуномодулирующая активность МТХ определяют его эффективность применения при воспалительных заболеваниях кишечника, рассеянном склерозе, системных заболеваниях [4]. Механизмы действия МТХ как противовоспалительного препарата с иммуномодулирующей активностью включают модуляцию аденозиновой сигнализации, изменение цитокиновых сетей,

генерацию активных форм кислорода, регуляцию экспрессии некоторых длинных некодирующих РНК [4], подавление медиатора воспаления алармина HMGB1, хемотаксиса и адгезии воспалительных клеток [3].

Широкое применение МТХ ограничивается его токсичностью. Одними из клинически значимых проявлений кишечных нарушений вследствие химиотерапии является мукозит, энтерит, в развитии которых нарушения микробиоты играют решающую роль. Изменение микробиоты кишечника человека под влиянием МТХ носит дозозависимый характер [10, 14]. Вместе с тем установлено, что изменения кишечной микробиоты или ее метаболитов могут непосредственно влиять на эффективность и токсичность терапевтических средств [1, 7]. Так, несмотря на выраженные противовоспалительные эффекты МТХ, существует высокая доля пациентов, которые не реагируют на МТХ или имеют серьезные побочные токсические эффекты. Предполагают, что эти межиндивидуальные различия частично связаны с микробиотой кишечника пациентов [14]. Поэтому некоторые характеристики кишечного микробиома предлагается рассматривать как предиктор клинического ответа на МТХ [12].

В последнее время в ряде исследований установлено, что метаболиты штаммов микробиоты способны усиливать терапевтический эффект химиотерапевтических препаратов, например, установлено усиление терапевтического эффекта химиотерапевтического препарата 5-фторурацила (5-FU) под влиянием супернатанта лактобактерий *Lactobacillus plantarum* [2].

Учитывая высокую эффективность, широкое применение и вместе с тем многочисленные побочные реакции МТХ, одним из подходов оптимизации лечения и снижения токсичности данного препарата может быть использование природных соединений, являющихся вторичными метаболитами нормобиоты человека с широким спектром биологической активности и способных потенцировать терапевтические эффекты метотрексата. **Целью работы** явилось исследование возможного потенцирующего эффекта бесклеточных супернатантов бифидобактерий при совместном с МТХ воздействии на секрецию провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  мононуклеарными клетками периферической крови человека.

## Материалы и методы

Объектами исследования служили штаммы *Bifidobacterium bifidum* (ICIS-310, ICIS-643, ICIS-202, ICIS-504, ICIS-629) и *Bifidobacterium longum* (ICIS-505, ICIS-206, ICIS-500, ICIS-627) из коллекции лаборатории инфекционной сим-

биологии ИКВС УрО РАН. Микробные метаболиты получали из бульонных культур бифидобактерий двукратным центрифугированием при 3200 об/мин с последующей фильтрацией (мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, Millipore, США).

Мононуклеарные лейкоциты выделяли из гепаринизированной крови здоровых доноров методом градиентного центрифугирования (400 g) в градиенте плотности фиколл-верографин (Pharmacia, Швеция) плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup>. Продукция провоспалительных цитокинов IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  исследовалась в культуре мононуклеаров, сокультивируемых с метаболитами бифидобактерий с добавлением метотрексата (МТХ, «Сандоз», Словения; лекарственная форма – раствор для инъекций) (опыт 1) в концентрации 5 мкг/мл и без МТХ (опыт 2). В качестве контроля были использованы пробы, где к периферическим мононуклеарам добавлялся только МТХ (контроль 1) или культуральная среда (контроль 2). После 24-часовой инкубации клеток ( $2 \times 10^6$ ) при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в полной культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной фетальной сыворотки (Sigma, США) и 80 мкг/мл гентамицина. Исследования проводили в 9 дублях для каждого штамма и каждого вида цитокинов. Уровень спонтанной продукции цитокинов после сокультивирования мононуклеаров с метаболитами бактерий исследовали ИФА («Цитокин», Санкт-Петербург). Регистрация результатов проводилась на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия), длина волны 492 нм.

Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, США) с оценкой различий между величинами по критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ ).

## Результаты и обсуждение

Анализ влияния метаболитов бифидобактерий на модели мононуклеаров периферической крови человека показал, что метаболиты и *B. bifidum*, и *B. longum* подавляли продукцию ключевого провоспалительного цитокина TNF $\alpha$  в 3-5 раз относительно контроля лимфоцитов ( $350,0 \pm 15,0$  пг/мл), ( $p \leq 0,05$ ). Добавление к периферическим мононуклеарам цитостатика МТХ без метаболитов бактерий сопровождалось снижением продукции TNF $\alpha$  в 3,5 раза в сравнении с контролем ( $p \leq 0,05$ ). Сочетанное влияние метаболитов бифидобактерий и МТХ также характеризовалось ингибирующим эффектом ( $68,2-84,7$  пг/мл) в отношении провоспалительного цитокина TNF $\alpha$  ( $p \leq 0,05$ ). Метаболиты штаммов *B. longum* обладали более выраженным потенцирующим действием в отношении влияния на секрецию данного цитокина ( $p \leq 0,05$ ). Концентра-

ция TNF $\alpha$  в среде культивирования снижалась до 60,0 $\pm$ 1,5 пг/мл в присутствии MTX и метаболитов штамма *B. longum* ICIS-505 и до 70,1 $\pm$ 2,1 пг/мл – MTX и метаболитов штамма *B. longum* ICIS-206 ( $p \leq 0,05$ ).

Вместе с тем содержание другого провоспалительного цитокина IFN $\gamma$  увеличивалось при добавлении к мононуклеарным лейкоцитам как метаболитов бифидобактерий (в 2-3,5 раза в сравнении с контролем лимфоцитов – 30,4 $\pm$ 2,3 пг/мл) ( $p \leq 0,05$ ), так и цитостатика MTX (в 2,3 раза относительно контроля) ( $p \leq 0,05$ ). Причем выраженность стимулирующего эффекта возрастала при сочетанном влиянии MTX и метаболитов бифидобактерий (в среднем до 85,4 $\pm$ 3,6 пг/мл) ( $p \leq 0,05$ ). Метаболиты штамма *B. longum* ICIS-206 в присутствии MTX стимулировали секрецию IFN $\gamma$  только до 55,0 $\pm$ 3,8 пг/мл ( $p \leq 0,05$ ), а штаммов *B. longum* ICIS-500 и *B. bifidum* ICIS-643 – до 114,0 $\pm$ 4,3 пг/мл и 107,6 $\pm$ 6,1 пг/мл, соответственно ( $p \leq 0,05$ ).

Таким образом, было установлено разнонаправленное влияние метаболитов бифидобактерий и MTX, а также их сочетаний на продукцию двух ключевых провоспалительных цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови человека – TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ . Показано потенцирующее влияние метаболитов бифидобактерий на ингибирующий эффект цитостатика MTX в отношении продукции лимфоцитами флогенного фактора TNF $\alpha$ . Наиболее выраженным эффектом обладали метаболиты штаммов *B. longum* ICIS-505 и *B. longum* ICIS-206. Вместе с тем, метаболиты бифидобактерий потенцировали стимулирующее влияние MTX в отношении секреции медиатора клеточного иммунного ответа – IFN $\gamma$ .

Оценивая полученные в настоящей работе результаты об усилении бесклеточными супернатантами *B. bifidum* и *B. longum* эффекта воздействия метотрексата на продукцию провоспалительных цитокинов, можно предположить, что выявленный потенцирующий эффект обеспечивается наличием в культуральных супернатантах бифидобактерий определенного спектра биологически активных молекул (метаболитов), таких как короткоцепочечные жирные кислоты (SCFAs), представленные ацетатом, пропионатом и бутиратом [7]. Различные таксоны микроорганизмов ответственны за синтез SCFAs. Для *Bifidobacterium* spp. специфичными метаболитами являются ацетат, пропионат, лактат и в меньшей степени бутират. После попадания в эпителиальные клетки кишечника SCFAs выполняют регуляторную роль, взаимодействуя со специфическими рецепторами, связанными с

G-белком (GPCR) и/или гистондеацетилазами (HDACs) [6].

В настоящее время метаболитам бифидобактерий отводится важная роль в усилении терапевтического эффекта ряда химиотерапевтических препаратов. Благодаря способности бифидобактерий и их метаболитов к биотрансформации противоопухолевых препаратов [13], образуются соединения с усиленной цитотоксичностью в отношении раковых клеток [9]. Протективный эффект бифидо- и лактобактерий и их метаболитов проявляется в антиоксидантных и антипролиферативных эффектах через ингибирование NF- $\kappa$ B, участвующего в пролиферации клеток и играющего критическую роль в воспалительном процессе [5], в регуляции генов с про- и антиапоптотической активностью [8]. Наряду с бифидобактериями, усиливать действие MTX могут и *Bacteroides fragilis*. В работе Zhou B. и соавт. (2022) на мышинной модели коллаген-индуцированного артрита показано, что MTX не оказывает терапевтического эффекта при отсутствии в кишечнике *Bacteroides fragilis* [15]. Введение *B. fragilis* восстанавливало эффективность MTX и сопровождалось увеличением уровня бутирата.

## Заключение

Поиск перспективных природных компонентов, направленных на уменьшение токсичности и побочных эффектов химиотерапевтических препаратов, в частности метотрексата, представляет собой будущее направление в терапии различных воспалительных, аутоиммунных и лимфолиферативных заболеваний. Современные терапевтические стратегии, использующие кишечную микробиоту и ее метаболиты в сочетании с химиотерапией и иммунотерапией, могут предоставить новые возможности для кишечной микробиоты и ее метаболитов стать адьювантами для специфической терапии пролиферативных заболеваний [11]. Результаты настоящего исследования дают основание для дальнейшей разработки направления, позволяющего рассматривать метаболиты бифидобактерий в качестве перспективного средства, потенцирующего терапевтические свойства метотрексата посредством подавления секреции TNF $\alpha$  и стимуляции IFN $\gamma$  иммунокомпетентными клетками. Дальнейшее изучение сочетанного влияния цитостатиков, в частности метотрексата, и метаболитов кишечной микробиоты целесообразно для разработки способов усиления терапевтического эффекта метотрексата и ограничения его токсических свойств метаболитами бифидобактерий.

## Список литературы / References

1. Alexander J.L., Wilson I.D., Teare J., Marchesi J.R., Nicholson J.K., Kinross J.M. Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2017, Vol. 14, no. 6, pp. 356-365.
2. An J., Ha E.M. Combination therapy of *Lactobacillus plantarum* supernatant and 5-fluorouracil increases chemosensitivity in colorectal cancer cells. *J. Microbiol Biotechnol.*, 2016, Vol. 26, no. 8, pp. 1490-14503.
3. Bedoui Y., Guillot X., Sélambarom J., Guiraud P., Giry C., Jaffar-Bandjee M.C., Ralandison S., Gasque P. Methotrexate an old drug with new tricks. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 20, 5023. doi: 10.3390/ijms20205023.
4. Cronstein B.N., Aune T.M. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2020, Vol. 16, no. 3, pp. 145-154.
5. Faghfoori Z., Faghfoori M.H., Saber A., Izadi A., Yari Khosroushahi A. Anticancer effects of bifidobacteria on colon cancer cell lines. *Cancer Cell. Int.*, 2021, Vol. 21, no. 1, 258. doi: 10.1186/s12935-021-01971-3.
6. Husted A.S., Trauelsen M., Rudenko O., Hjorth S.A., Schwartz T.W. GPCR-mediated signaling of metabolites. *Cell Metab.*, 2017, Vol. 25, no. 4, pp. 777-796.
7. Koh A., de Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Bäckhed F. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 2016, Vol. 165, no. 6, pp. 1332-1345.
8. Nowak A., Paliwoda A., Błasiak J. Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2019, Vol. 59, no. 21, pp. 3456-3467.
9. Oliveira Silva E., Cruz de Carvalho T., Parshikov I.A., Alves dos Santos R., Silva Emery F., Jacometti Cardoso Furtado N.A. Cytotoxicity of lapachol metabolites produced by probiotics. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2014, Vol. 59, no. 1, pp. 108-114.
10. Renuka R., Nayak M.A., Ishani D., Kye Stapleton-Gray, Bipin R., Patterson A.D., Ubeda C., Scher J.U., Turnbaugh P.J. Methotrexate impacts conserved pathways in diverse human gut bacteria leading to decreased host immune activation. *Cell Host Microbe*, 2021, Vol. 29, no. 3, pp. 362-377.e11.
11. Said S.S., Ibrahim W.N. Cancer resistance to immunotherapy: comprehensive insights with future perspectives. *Pharmaceutics*, 2023, Vol. 15, no. 4, 1143. doi: 10.3390/pharmaceutics15041143.
12. Scher J.U., Nayak R.R., Ubeda C., Turnbaugh P.J., Abramson S.B. Pharmacomicrobiomics in inflammatory arthritis: gut microbiome as modulator of therapeutic response. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2020, Vol. 16, no. 5, pp. 282-292.
13. Wei H., Chen L., Lian G., Yang J., Li F., Zou Y., Lu F., Yin Y. Antitumor mechanisms of bifidobacteria. *Oncol. Lett.*, 2018, Vol. 16, no. 1, pp. 3-8.
14. Yan H., Su R., Xue H., Gao C., Li X., Wang C. Pharmacomicrobiology of methotrexate in rheumatoid arthritis: gut microbiome as predictor of therapeutic response. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 789334. doi: 10.3389/fimmu.2021.789334.
15. Zhou B., Dong C., Zhao B., Lin K., Tian Y., Zhang R., Zhu L., Xu H., Yang L. *Bacteroides fragilis* participates in the therapeutic effect of methotrexate on arthritis through metabolite regulation. *Front. Microbiol.*, 2022, Vol. 13, 1015130. doi: 10.3389/fmicb.2022.1015130.

---

### Авторы:

**Иванова Е.В.** — д.м.н., доцент, заведующая лабораторией инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН — обособленное структурное подразделение ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Оренбург, Россия

**Чайникова И.Н.** — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН — обособленное структурное подразделение ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Оренбург, Россия

**Бекпергенова А.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН — обособленное структурное подразделение ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Оренбург, Россия

### Authors:

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

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

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

**Бондаренко Т.А.** — научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН — обособленное структурное подразделение ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Оренбург, Россия

**Челпаченко О.Е.** — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН — обособленное структурное подразделение ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Оренбург, Россия

**Здвижкова И.А.** — научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН — обособленное структурное подразделение ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Оренбург, Россия

**Перунова Н.Б.** — д.м.н., профессор РАН, заместитель директора по научной работе, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН — обособленное структурное подразделение ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Оренбург, Россия

**Бухарин О.В.** — д.м.н., академик РАН, научный руководитель, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН — обособленное структурное подразделение ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Оренбург, Россия

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

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

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

**Perunova N.B.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Research, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Bukharin O.V.**, PhD, MD (Medicine), Full Member, Russian Academy of Sciences, Scientific Director, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

---

Поступила 15.05.2023  
Принята к печати 29.06.2023

Received 15.05.2023  
Accepted 29.06.2023

# **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ СИНТЕТИЧЕСКИМ АНАЛОГОМ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГОРМОНА ТИМУСА ТИМОПОЭТИНА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА**

**Ковалева С.В.<sup>1</sup>, Нестерова И.В.<sup>1, 2</sup>, Пиктурно С.Н.<sup>1</sup>,  
Чудилова Г.А.<sup>1</sup>, Ломтатидзе Л.В.<sup>1</sup>, Тетерин Ю.В.<sup>1</sup>, Пирогова А.И.<sup>1</sup>,  
Просолупова Н.С.<sup>1</sup>, Чулкова А.М.<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

**Резюме.** Хронические воспалительные заболевания органов малого таза (ХВЗОМТ) у женщин одна из основных и недостаточно изученных проблем в гинекологии во всем мире с неблагоприятными медицинскими и социально-экономическими последствиями, что обосновывает необходимость дальнейшего изучения иммунопатогенеза и разработки новых подходов к лечению. Цель — разработать новые иммунотерапевтические подходы к коррекции комбинированных нарушений функционирования иммунной системы иммунокомпromетированных женщин с ХВЗОМТ и оценить их клинико-иммунологическую эффективность.

Проведено клинико-анамнестическое и иммунологическое обследование 55 женщин 20-40 лет: 35 женщин — в период обострения вялотекущих или рецидивирующих ХВЗОМТ, резистентных к традиционной терапии, до начала (группа исследования 1 — ГИ-1) и после (группа исследования 2 — ГИ-2) комплексного лечения; 20 здоровых женщин (группа сравнения). Оценены содержания Т- и В-лимфоцитов, естественных киллерных клеток (ЕКК) (CYTOMICS FC500, США), фагоцитарная и микробицидная функции нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в ГИ-1 и ГИ-2 до и через 2-3 дня после

## **Адрес для переписки:**

Ковалева Светлана Валентиновна  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ  
350912, Россия, г. Краснодар, ул. Ярославского, 99, кв. 12.  
Тел.: 8 (918) 989-11-76,  
E-mail: 3483335@mail.ru

## **Address for correspondence:**

Svetlana V. Kovaleva  
Kuban State Medical University  
99 Yaroslavsky St, Apt 12  
Krasnodar  
350912 Russian Federation  
Phone: +7 (918) 989-11-76,  
E-mail: 3483335@mail.ru

## **Образец цитирования:**

С.В. Ковалева, И.В. Нестерова, С.Н. Пиктурно, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе, Ю.В. Тетерин, А.И. Пирогова, Н.С. Просолупова, А.М. Чулкова «Эффективность иммуномодулирующей терапии синтетическим аналогом активного центра гормона тимуса тимопоэтина в комплексном лечении иммунокомпromетированных женщин с хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями органов малого таза» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 287-294.  
doi: 10.46235/1028-7221-10011-EOI

© Ковалева С.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## **For citation:**

S.V. Kovaleva, I.V. Nesterova, S.N. Pikturno, G.A. Chudilova, L.V. Lomtadidze, Yu.V. Teterin, A.I. Pirogova, N.S. Prosolupova, A.M. Chulkova "Effectiveness of immunomodulatory therapy with a synthetic analogue of the active center of thymopoietin in the complex treatment of immunocompromised women with chronic infectious and inflammatory diseases of the pelvic organs", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 287-294.  
doi: 10.46235/1028-7221-10011-EOI

© Kovaleva S.V. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-10011-EOI

проведения комплексного лечения с включением иммунотерапии препаратом на основе гексапептида (ГП) в дозе 45 мкг/мл внутримышечно ежедневно в течение 10 дней.

В ГИ-1 до лечения выявлено снижение Т CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> и В CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> лимфоцитов на фоне не меняющихся значений общего количества лейкоцитов и лимфоцитов. При явном снижении клеточных механизмов адаптивного иммунитета отмечено увеличение в 2 раза содержания ЕКК CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>. Выявлены дефекты функционирования системы НГ дефицит «активно фагоцитирующих» НГ, снижение их переваривающей функции, NADPH-оксидазной активности – отсутствие ответа как на воспаление и на дополнительную индукцию антигеном. После лечения в ГИ-2 наблюдается восстановление содержания Т CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> и В CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> лимфоцитов, ЕКК CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, усиление эффекторных функций НГ – процессов захвата и киллинговой способности за счет активации NADPH-оксидазы и нормализации микробицидных резервных возможностей НГ. Положительный клинический эффект: уменьшение клинических проявлений в острый период, отсутствие обострений ХВЗОМТ в анамнезе 6 месяцев в 85,6% случаев. Возникшие обострения ХВЗОМТ связаны медицинскими манипуляциями (5,7%) и вследствие незащищенных половых контактов (5,7%).

Разработанный иммунопатогенетически обоснованный подход к коррекции комбинированных нарушений функционирования иммунной системы иммунокомпromетированных женщин с ХВЗОМТ демонстрирует позитивный клинико-иммунологический эффект.

*Ключевые слова: хронические воспалительные заболевания органов малого таза, врожденный иммунитет, адаптивный иммунитет, иммунокомпromетированность, иммунотерапия, гексапептид*

## EFFECTIVENESS OF IMMUNOMODULATORY THERAPY WITH A SYNTHETIC ANALOGUE OF THE ACTIVE CENTER OF THYMOPOIETIN IN THE COMPLEX TREATMENT OF IMMUNOCOMPROMISED WOMEN WITH CHRONIC INFECTIOUS AND INFLAMMATORY DISEASES OF THE PELVIC ORGANS

Kovaleva S.V.<sup>a</sup>, Nesterova I.V.<sup>a, b</sup>, Pikturno S.N.<sup>a</sup>, Chudilova G.A.<sup>a</sup>, Lomtadze L.V.<sup>a</sup>, Teterin Yu.V.<sup>a</sup>, Pirogova A.I.<sup>a</sup>, Prosolupova N.S.<sup>a</sup>, Chulkova A.M.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

<sup>b</sup> P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Chronic inflammatory diseases of the pelvic organs (pelvic inflammatory disease, PID) in women is among the main understudied problems in gynecology worldwide with adverse medical and socio-economic consequences, thus justifying the need for further study of immunopathogenesis and development of new approaches to treatment. Our objective was to develop new immunotherapeutic approaches to correction of combined disorders of the immune system functioning in immunocompromised women with PID and to evaluate their clinical and immunological efficacy.

55 women aged 20-40 years were examined, i.e., 35 patients with exacerbation of sluggish or recurrent PID, resistant to conventional therapy. Testiung was performed before complex treatment (study group 1 – GI-1) and after the course (study group 2 – GI-2). Contents of T and B lymphocytes, natural killer cells (NK) (CYTOMICS FC500, USA), phagocytic and microbicidal functions of neutrophilic granulocytes (NG) were assessed in SG-1 and SG-2 before and 2-3 days after complex treatment with addition of an immunotherapeutic drug based on hexapeptide (HP) at a daily dose of 45 mg/ml intramuscularly for 10 days.

In patients from SG-1, a decrease in T cells (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>) and B cells (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>), a 2-fold increase in the content of NK CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> was found, along with altered functioning of NG (deficiency of actively phagocytizing NG, a decrease in their digestive function and NADPH-oxidase activity). In SG-2 patients, the treatment was followed by restoration of the T (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>) and B cells (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>), NK cells (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), like as an increase in effector functions, i.e., microbial capture by NG and their killing ability due to activation of NADPH oxidases and normalization of microbicidal reserve capacity in the NG cell population. Positive clinical effect included reduction of clinical symptoms in acute period, absence of PID

exacerbations over follow-up for 6 months (85.6% of cases). Occasional exacerbations of PID were associated with medical manipulations (5.7%) and unprotected sexual contacts (5.7%).

The immunopathogenetically proven approach to correction of combined functional impairment of immune system in the women with PID shows a positive clinical and immunological effect.

*Keywords: pelvic organs, chronic inflammatory diseases, innate immunity, adaptive immunity, immunocompromised, immunotherapy, hexapeptide*

## Введение

В настоящее время, несмотря на совершенствование методов диагностики и лечения, проблема хронических инфекционно-воспалительных заболеваний органов малого таза (ХВЗОМТ) по-прежнему остается одной из ведущих в структуре гинекологических заболеваний. Количество женщин с хроническими вялотекущими формами воспалительных процессов генитального тракта в амбулаторной практике достигает до 60–65% и до 30% в стационарах, при этом отсутствует тенденция к снижению [8]. ХВЗОМТ представляют собой социальную и экономическую проблему, вследствие возникновения в молодом репродуктивном возрасте, и характеризуются высокой частотой рецидивирования, вялотекущим и затяжным течением воспалительного процесса, полимикробной этиологией, что существенно ухудшает прогноз реализации репродуктивной функции [11].

Значительную роль в формировании ВЗОМТ играют инфекции, передаваемые половым путем (ИППП), вызванные *Neisseria gonorrhoeae* (25–50%) и *Chlamydia trachomatis* (25–30%), *Mycoplasma genitalium* (7–20%) [4]. В то же время при нарушении иммунокомпетентности стали чаще встречаться ХВЗОМТ (метроэндометриты, сальпингоофориты, вульвовагиниты, цервициты), нарушения микробиоты влагалища (бактериальный вагиноз (БВ)), обусловленные условно-патогенными (оппортунистическими) микроорганизмами, нежели ХВЗОМТ, вызванные абсолютными патогенами. Полимикробная этиология ХВЗОМТ представлена облигатно-анаэробными и факультативно-анаэробными патогенами и их ассоциацией, которые в низких титрах могут присутствовать в составе нормальной микрофлоры влагалища (*Bacteroides* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Peptostreptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Prevotella* spp., *Streptococcus* spp. и т. д.) и вирусами [1, 7, 12].

Определение вида возбудителя при ХВЗОМТ не всегда представляется возможным с использованием стандартных методов диагностики и в 70% случаев этиология заболеваний остается неизвестной. Применение современных методов молекулярной биологии и культивирования позволяет выявить новые виды бактерий, ассоциированных с БВ (грамотрицательные анаэробы *Sneathia (Leptotrichia) sanguinegens*, *Sneathia (Leptotrichia) amnionii*, грамположительные анаэробы *Atopobium vaginae*), которые в 3,5 раза повышают вероятность эндометрита, длительно

сохраняются в генитальном тракте ввиду неэффективности традиционных методов лечения, что приводит к рецидивам ХВЗОМТ и бесплодию [13].

Функционирование иммунной системы (ИС) влияет на течение и исход воспалительного процесса в генитальном тракте. У женщин с ХВЗОМТ отмечается недостаточная эффективность гуморального и клеточного звена иммунитета, снижение активности клеток фагоцитарной системы, цитокиновый дисбаланс [3, 9], что свидетельствует о формировании или усугублении вторичной иммунной недостаточности и определяет характер течения заболевания, а также недостаточную эффективность стандартной терапии с развитием антибиотикорезистентности и преобладанием в качестве возбудителей условно-патогенных микроорганизмов и коинфицирования [2, 6, 14].

Исследованиями показано, что использование иммуотропной терапии в острый период ХВЗОМТ позволяет уменьшить нарушения в иммунной системе и предупредить рецидивирование воспалительного процесса [5, 10]. Позитивный клинико-иммунологический эффект получен при использовании ряда иммуотропных препаратов в комплексном лечении ХВЗОМТ. Так, показано, что при применении азоксимера бромида, аминодигидрофалазиндиона натрия отмечен положительный эффект влияния на клеточное и гуморальное звено иммунитета – увеличение TCD3<sup>+</sup> лимфоцитов, иммунорегуляторного индекса (ИРИ), увеличение синтеза IgA и нормализация уровня IgG. Среди лекарственных средств, обладающих иммуномодулирующими свойствами, особый интерес представляет гексапептид – аргинил-альфа-аспартил-лизил-валлил-тирозил-аргинин (ГП), который является активным центром гормона тимуса тимопоэтина и обладает иммунорегуляторными свойствами, а также способностью вызывать инактивацию свободно-радикальных и перекисных соединений, восстанавливая баланс окислительно-антиокислительных реакций при инфекционно-воспалительных заболеваниях.

В связи с изложенным уточнение иммунопатогенеза ХВЗОМТ у женщин с клиническими признаками иммунокомпрометированности представляется актуальным и перспективным для разработки персонализированной иммунотерапии, направленной на устранение дисфункций ИС.

**Цель исследования** – разработать новые иммунотерапевтические подходы к коррекции комбинированных нарушений функционирования им-

мунной системы иммунокомпрометированных женщин с ХВЗОМТ и оценить их клиничко-иммунологическую эффективность.

## Материалы и методы

Под нашим наблюдением находились 35 женщин репродуктивного возраста от 20 до 40 лет с ХВЗОМТ в период обострения, поступивших в отделение дневного стационара Клиники ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Были сформированы 2 группы исследования: группа исследования 1 (ГИ-1) – до начала комплексного лечения и группа исследования 2 (ГИ-2) – после комплексного лечения. Группу сравнения составили 20 условно здоровых женщин репродуктивного возраста, обратившихся в клинику с целью контрацепции (установка внутриматочной спирали).

ХВЗОМТ у женщин ГИ-1 характеризовались длительным анамнезом (более 5 лет), частыми обострениями (3 и более раз в год) или вялотекущим затяжным течением обострений, отсутствием стойкого клинического эффекта при использовании традиционной системной и местной противовоспалительной терапии. При изучении данных анамнеза выявлены дополнительные критериальные признаки иммунокомпрометированности: в 28,5% выявлялись латентные или рецидивирующие моно- или микстгерпесвирусные инфекции – ГВИ (ВПГ I и II типов инфекции, генитальной и орофациальной локализации с частотой обострений до 5-6 раз в год, папилломавирусная инфекция (кондиломы аногенитальной области), рекуррентные ОРВИ с частотой эпизодов до 7-8 раз год.

У пациенток ГИ-1 использовали традиционные терапевтические подходы (антибактериальная, противогрибковая, противовоспалительная), а также дополнительно применяли иммуномодулирующую терапию, включающую препарат на основе ГП. Схема применения препарата на основе ГП в дозе 45 мкг/мл 1 мл внутримышечно 1 раз в сутки в течение 10 дней.

Методом проточной цитофлуориметрии (FC500 Beckman Coulter, США) с соответствующими MkAT Beckman Coulter International S.A. (Франция) проведено иммунофенотипирование Т- и В-лимфоцитов ( $CD3^+CD19^-$ ,  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD3^+CD19^+$ ), естественных киллерных клеток (ЕКК –  $CD3^+CD16^+CD56^+$ ) периферической крови (ПК), рассчитан иммунорегуляторный индекс (ИРИ –  $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ ). Тестирование фагоцитарной и микробицидной функции нейтрофильных гранулоцитов (НГ) осуществлялось с определением количества активно фагоцитирующих *St. aureus* НГ (%ФАН), захвата (фагоцитарное число – ФЧ, фагоцитарный индекс – ФИ), оценкой переваривающей активности (процент переваривания – %П, индекс переваривания – ИП). NADPH-оксидазную ак-

тивность НГ определяли по показателям NBT-теста спонтанного (сп.) и стимулированного (ст.) (*St. aureus*); при этом учитывался % формазан-позитивных клеток (%ФПК), средний цитохимический индекс (СЦИ), по соотношению %ФПКст/%ФПКсп рассчитывался коэффициент мобилизации (КМ). Тестирование иммунной системы проводилось до и через 2-3 дня после проведения лечения с включением иммунотерапии препаратом на основе ГП. Статистическую обработку данных осуществляли в компьютерных программах Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2010. Использовали непараметрические статистические критерии Вилкоксона и Манна–Уитни. Результаты представляли в виде медианы (верхний и нижний квартиль) – Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ). Статистически значимые различия определяли при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

При анализе показателей клеточного иммунитета показано, что у женщин с ХВЗОМТ ГИ-1 обострение воспалительного процесса сопровождается значимым снижением  $TCD3^+CD19^-$  лимфоцитов до 69,8 (63,8-72,0)% против 76,1 (73,4-78,1)% в группе сравнения ( $p < 0,05$ ) на фоне не меняющихся значений общего количества лейкоцитов и лимфоцитов. Выявлено параллельное снижение содержания  $TCD3^+CD4^+$  хелперов и ЦТЛ  $CD3^+CD8^+$  ( $p_{1,2} > 0,05$ ) (табл. 1). Данные изменения свидетельствуют о дефекте Т-клеточного иммунитета и отсутствии адекватного ответа на клинически выраженный воспалительный процесс.

Также особенностью ГИ-1 является снижение в 1,6 раза содержания  $BVD3^+CD19^+$  лимфоцитов до 9,1 (6,3-10,4)% против 14,4 (12,3-16,1)% в группе сравнения ( $p < 0,05$ ), что предполагает функциональную несостоятельность гуморального иммунитета (табл. 1).

При явном снижении клеточных механизмов адаптивного иммунитета отмечается увеличение в 2 раза содержания ЕКК  $CD3^+CD16^+CD56^+$  до 19,4 (15,6-23,0)% против 10,7 (9,8-12,5)% в группе сравнения ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). Вероятно, увеличение ЕКК связано с ответом на наличие у женщин с ХВЗОМТ других критериев иммунокомпрометированности в виде рекуррентных ОРВИ, ГВИ, ВПЧ-инфекции.

Помимо этого выявлены дефекты функционирования системы НГ в виде отсутствия количественного прироста НГ и снижения их эффекторных функций. Так, показано снижение %ФАН 54,0 (47,5-56,5)% против 61,0 (60,0-63,0)% в группе сравнения ( $p < 0,05$ ), снижение переваривающей активности НГ – %П 40,6 (39,8-45,0)% против 56,0 (51,0-58,0)% в группе сравнения ( $p < 0,05$ ), и ИП 0,8 (0,6-1,0) против 1,6 (1,4-2,4) в группе сравнения ( $p < 0,05$ ). Нарушение NADPH-оксидазной активности связано с отсутствием ответа как на воспалительный про-

цесс в спонтанном NBT-тесте, так и на дополнительную индукцию *St. aureus* в стимулированном NBT-тесте (табл. 2).

Выявленная дисрегуляция иммунной системы, обусловленная комбинированным дефектным функционированием Т- и В-клеточного иммунитета и системы НГ, способствует поддержанию воспалительного процесса и диктует необходимость ее коррекции.

Включение в комплексное лечение препарата на основе ГП позволило добиться позитивных иммуномодулирующих эффектов. Так, после курса лечения наблюдается повышение до значений группы сравнения как содержания TCD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> лимфоцитов, так и VCD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> лимфоцитов ( $p_{1,2} < 0,05$ ), снижение содержания ЕКК CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ( $p > 0,05$ ) (табл. 1).

Также показано усиление фагоцитарной активности НГ, которое проявлялось в повышении количества «активно фагоцитирующих» НГ и, что особенно важно, киллинговой способности НГ. Так, %П составил 47,3 (46,0-52,5)% против 40,6 (39,8-45,0)% в ГИ-1 ( $p < 0,05$ ) и достиг показателя группы сравнения 56,0 (51,0-58,0) ( $p > 0,05$ ). Кроме того, отмечено и увеличение

микробицидной активности каждого НГ – ИП составил 1,7 (1,5-3,0) против 0,8 (0,6-1,0) в ГИ-1 и 1,6 (1,4-2,4) ( $p < 0,05$ ) в группе сравнения ( $p > 0,05$ ). Улучшение переваривающей активности НГ произошло прежде всего за счет активации кислородзависимых микробицидных механизмов (NADPH-оксидаз). При оценке NBT-теста отмечалось повышение %ФПК ( $p > 0,05$ ) СЦИ ( $p < 0,05$ ) как в спонтанном, так и в стимулированном тесте ( $p_{1,2} > 0,05$ ) с сохранением резервного потенциала НГ – КМ 2,0 (1,96-3,2) в ГИ-2 после лечения против 1,34 (1,26-1,56) в ГИ-1 до лечения ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Выявленные эффекты коррекции дефектного функционирования иммунной системы сопровождались положительной клинической динамикой. В частности, отмечалась регрессия воспалительного процесса при обострении ХВЗОМТ у иммунокомпрометированных женщин в виде уменьшения болевого синдрома, изменения характера и количества выделений из половых путей, субъективных ощущений. Оценка отдаленных результатов показала, что через 6 месяцев лечения в 85,7% случаев обострений ХВЗОМТ не было. Однако в 5,7% случаев возникло обострение

**ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН В ПЕРИОД ОБОСТРЕНИЯ ХВЗОМТ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОМ НА ОСНОВЕ ГЕКСАПЕПТИДА, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. INDICATORS OF THE CELLULAR LINK OF THE IMMUNE SYSTEM OF IMMUNOCOMPROMISED WOMEN DURING THE EXACERBATION OF PID AGAINST THE BACKGROUND OF TREATMENT WITH A HEXAPEPTIDE-BASED DRUG, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Показатель Indicator	Группа сравнения Comparison group	Группа исследования до лечения (ГИ-1) Study group before treatment (SG-1)	Группа исследования после лечения (ГИ-2) Study group after treatment (SG-1)
Lx 10 <sup>9</sup> /л WBC, 10 <sup>9</sup> /л	6,1 (5,4-6,8)	5,8 (5,40-6,63)	5,3 (4,9-6,4)
ЛФ, % LY, %	30,1 (29,0-32,2)	31,3 (28,9-38,5)	35,7 (32,1-39,9)
ЛФх 10 <sup>9</sup> /л LY, 10 <sup>9</sup> /л	1,82 (1,56-2,14)	1,82 (1,63-2,22)	1,99 (1,66-2,26)
Т-лимфоциты CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> , % T lymphocytes CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> , %	76,1 (73,4-78,1)	69,8 (63,8-72,0)*	74,0 (72,2-76,9)^
Т-хелперы CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , % T helpers CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %	43,4 (41,4-44,8)	40,9 (35,2-43,7)	42,7 (36,6-44,3)
ЦТЛ CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , % CTL CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	31,4 (24,8-33,5)	30,1 (28,2-33,3)	30,7 (28,2-35,6)
ИРИ CD4/CD8 IRI CD4/CD8	1,4 (1,2-1,8)	1,3 (1,1-1,5)	1,4 (1,1-1,6)
В-лимфоциты CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , % B lymphocytes CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> , %	14,4 (12,3-16,1)	9,1 (6,3-10,4)*	11,1 (10,5-12,4)^
НК CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> , %	10,7 (9,8-12,5)	19,4 (15,6-23,0)*	13,5 (9,6-18,8)

Примечание. \* – достоверность различий показателей от значений группы сравнения,  $p < 0,05$ ; ^ – достоверность различий показателей по отношению к группе исследования 1,  $p < 0,05$ .

Note. \*, the reliability of differences in indicators from the values of the comparison group,  $p < 0.05$ ; ^, the reliability of differences in indicators in relation to research group 1  $p < 0.05$ .

**ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ФАГОЦИТАРНОЙ И НАДРН-ОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН В ПЕРИОД ОБОСТРЕНИЯ ХВЗОМТ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОМ НА ОСНОВЕ ГЕКСАПЕПТИДА, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 2. INDICATORS OF PHAGOCYtic AND NADPH-OXIDASE ACTIVITY OF IMMUNOCOMPROMISED WOMEN DURING THE PERIOD OF EXACERBATION OF PID AGAINST THE BACKGROUND OF TREATMENT WITH A HEXAPEPTIDE-BASED DRUG, ME (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Показатель Indicator	Группа сравнения Comparison group	Группа исследования до лечения (ГИ-1) Study group before treatment (SG-1)	Группа исследования после лечения (ГИ-2) Study group after treatment (SG-2)
НГ, % NG, %	57,0 (53,0-60,6)	54,6 (52,3-56,2)	55,7 (46,7-58,2)
ФАН, % %PhAN	61,0 (60,0-63,0)	54,0 (47,5-56,5)*	60,0 (57,0-63,8)^
ФЧ PhI	2,8 (2,8-3,0)	2,14 (1,875-2,350)	2,55 (2,22-2,71)
ФИ PhI	1,7 (1,7-1,8)	1,42 (1,22-1,65)	1,465 (1,27-1,74)
%П %D	56,0 (51,0-58,0)	40,6 (39,8-45,0)*	47,3 (46,0-52,5)^
ИП DI	1,6 (1,4-2,4)	0,8 (0,6-1,0)*	1,7 (1,5-3,0)^
НВТ-тест NBT-test			
СЦИ спонтанный MCI spontaneous	0,17 (0,12-0,27)	0,12 (0,07-0,17)	0,19 (0,10-0,33)**
%ФПК спонтанный %FPC spontaneous	3,5 (2,00-6,75)	2,8 (2,0-5,0)	3 (2,75-4,00)
СЦИ стимулированный MCI stimulated	0,39 (0,32-0,42)	0,19 (0,10-0,32)	0,36 (0,14-0,73)
%ФПК стимулированный %FPC stimulated	8,5 (4,00-10,75)	5,5 (3,00-8,75)	9,0 (4,0-16,0)
КМ MC	2,14 (1,25-3,00)	1,34 (1,26-1,56)	2 (1,96-3,20)^

Примечание. См примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ХВЗОМТ вследствие медицинских манипуляций (биопсия шейки матки, ЭКО с предшествующим введением глюкокортикостероидов) – 5,7% случаев вследствие незащищенных половых контактов. Кроме того, в 100% случаев как во время лечения препаратом на основе ГП, так и в более поздние сроки после лечения побочных эффектов иммунотерапии не зарегистрировано.

## Заключение

Проведенные исследования позволили уточнить особенности иммунопатогенеза ХВЗОМТ, ассоциированные с дефектным или неадекватным ответом иммунной системы (Т- и В-клеточного иммунитета, эффекторных функций НГ) на воспалительный процесс, вызванный преимущественно условно-патогенными микроорганизмами и их ассоциациями, приобретающими патогенные свойства при развитии иммунокомпрометации.

Полученные результаты исследования свидетельствуют о целесообразности применения препарата Имунофан®, основной субстанцией которого является ГП, в комплексном лечении иммунокомпрометированных женщин с вялотекущими или рецидивирующими ХВЗОМТ, у которых в анамнезе отмечался кратковременный и недостаточный эффект от проведения традиционной терапии. Выявленное иммуномодулирующее влияние препарата на основе ГП способствует устранению дисрегуляции основных противoinфекционных механизмов адаптивного и врожденного иммунитета, что позитивно сказывается на характере и исходе обострения воспалительного процесса, а также уменьшает риск возникновения рецидивов ХВЗОМТ. Успех комплексной терапии с включением препарата на основе ГП также связан с хорошей переносимостью лечения, отсутствием побочных эффектов и осложнений (аллергические реакции, дисбактериоз слизистых уrogenитального тракта и кишечника, иммуносупрессивное действие и др.).

## Список литературы / References

1. Дикке Г.Б. Полимикробные ассоциации в этиологии воспалительных заболеваний половых органов у женщин // *Акушерство и гинекология*, 2017. № 6. С. 151-158. [Dikke G.B. Polymicrobial associations in the etiology of inflammatory diseases of the female genital organs. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2017, Vol. 6, pp. 151-158. (In Russ.)]
2. Зиганшин А.М., Мудров В.А. Оптимизация комплексной терапии воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин // *Гинекология*, 2019. Т. 21, № 3. С. 30-34. [Ziganshin A.M., Mudrov V.A. Optimization of complex therapy of inflammatory diseases of women pelvic organs. *Ginekologiya = Gynecology*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 30-34. (In Russ.)]
3. Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Филиппов Е.Ф., Ковалева С.В., Крутова В.А., Сторожук А.П. Особенности иммунного статуса женщин репродуктивного возраста с генитальными инфекционно-воспалительными процессами // *Кубанский научный медицинский вестник*, 2017. Т. 24, № 6. С. 65-70. [Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Filippov E.F., Kovaleva S.V., Krutova V.A., Storozhuk A.P. Features of the immune status of women of reproductive age suffering from genital infectious-inflammatory processes. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2017, Vol. 24, no. 6, pp. 65-70. (In Russ.)]
4. Кузнецова И.В., Рашидов Т.Н. Место иммуномодуляторов в лечении воспалительных заболеваний органов малого таза // *Гинекология*, 2016. Т. 18, № 5. С. 26-31. [Kuznetsova I.V., Rashidov T.N. Place of immunomodulators in the treatment of pelvic inflammatory diseases. *Ginekologiya = Gynecology*, 2016, Vol. 18, no. 5, pp. 26-31. (In Russ.)]
5. Лисицына О.И., Хилькевич Е.Г. Антибиотикорезистентность – проблема современности поиск возможных решений в терапии ВЗОМТ // *Медицинский совет*, 2018. № 13. С. 136-140. [Lisitsyna O.I., Khilkevich E.G. Antibiotic resistance – a modern global health problem. The search for possible solutions in treating PID. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2018, Vol. 13, pp. 136-140. (In Russ.)]
6. Нестерова И.В. Таргетная иммунотерапия при вторичных иммунодефицитах с инфекционным синдромом // *Российский иммунологический журнал*, 2019. Т. 13, № 4 (22). С. 1512-1516. [Nesterova I.V. Targeted immunotherapy for secondary immunodeficiency with infectious syndrome *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 4 (22), pp. 1512-1516. (In Russ.)]
7. Пестрикова Т.Ю., Юрасова Е.А., Котельникова А.В. Характеристика микробиоты влагалища при сочетании бактериального вагиноза с патологией влагалища и шейки матки воспалительного генеза // *Гинекология*, 2017. Т. 19, № 4. С. 15-19. [Pestrikova T.Yu., Yurasova E.A., Kotelnikova A.V. Characteristics of the vaginal microbiota with a combination of bacterial vaginosis with the pathology of the vagina and cervix inflammatory genesis *Ginekologiya = Gynecology*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 15-19. (In Russ.)]
8. Сандакова Е.А., Осипович О.А., Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Эффективность вспомогательных репродуктивных технологий у женщин с гинекологическими и экстрагенитальными воспалительными заболеваниями в анамнезе // *Медицинский альманах*, 2017. № 6 (51). С. 69-72. [Sandakova E.A., Osipovich O.A., Godovalov A.P., Karpunina T.I. The effectiveness of assisted reproductive technologies in women with gynecological and extragenital inflammatory diseases in anamnesis. *Meditsinskiy almanakh = Medical Almanac*, 2017, no. 6 (51), pp. 69-72. (In Russ.)]
9. Соловьев А.М. Иммуноterapia в комплексном лечении рецидивирующих бактериальных инфекций урогенитального тракта // *Consilium Medicum*, 2017, № 19 (6). С. 43-52. [Solovjev A.M. Immunotherapy in combination treatment of bacterial genitourinary tract infections. *Consilium Medicum = Consilium Medicum*, 2017, no. 19 (6), pp. 43-52. (In Russ.)]
10. Уракова Н.А., Ипатова Т.В. Иммуноterapia как способ повышения эффективности комплексного лечения воспалительных заболеваний органов малого таза // *РМЖ. Мать и дитя*, 2018. Т. 1, № 2. С. 120-123. [Urakova N.A., Ipatova T.V. Immunotherapy as a way to increase the effectiveness of comprehensive treatment of pelvic inflammatory diseases. *RMZH. Mat i ditya = Russian Journal of Woman and Child Health*, 2018, Vol. 1, no. 2, pp. 120-123. (In Russ.)]
11. Хадарцева К.А., Кузибаева Р.К. Роль прегравидарной подготовки в улучшении перинатальных исходов у женщин с воспалительными заболеваниями половых путей // *Акушерство и гинекология*, 2017. № 26. С. 1934-1937. [Khadartseva K.A., Kuzibaeva R.K. The role of pregravid preparation in improving perinatal outcomes in women with inflammatory diseases of the genital tract. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2017, no. 26, pp. 1934-1937. (In Russ.)]
12. Darville T. Pelvic inflammatory disease due to neisseria gonorrhoeae and chlamydia trachomatis: immune evasion mechanisms and pathogenic disease pathways. *J. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 224, no. 12, Suppl. 2, pp. S39-S46.
13. Haggerty C.L., Totten P.A., Tang G., Astete S.G., Ferris M.J., Norori J., Bass D.C., Martin D.H., Taylor B.D., Ness R.B. Identification of novel microbes associated with pelvic inflammatory disease and infertility. *Sex. Transm. Infect.*, 2016, Vol. 92, no. 6, pp. 441-446.
14. Ravel J., Moreno I., Simón C. Bacterial vaginosis and its association with infertility, endometritis, and pelvic inflammatory disease *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2021, Vol. 224, no. 3, pp. 251-257.

**Авторы:**

**Ковалева С.В.** — д.м.н., доцент, старший научный сотрудник отдела клинко-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

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

**Пиктурно С.Н.** — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

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

**Ломатидзе Л.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник отдела клинко-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Тетерин Ю.В.** — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Пирогова А.И.** — ординатор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Просолупова Н.С.** — заведующая консультативно-диагностическим отделением Клиники ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Чулкова А.М.** — к.м.н., заведующая дневным стационаром Клиники ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Authors:**

**Kovaleva S.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Scientific Research Laboratory, Associate Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

**Pikturno S.N.**, Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

**Lomatidze L.V.**, PhD (Biology), Head, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Scientific Research Laboratory, Associate Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Teterin Yu.V.**, Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Pirogova A.I.**, Resident, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Prosolypova N.S.**, Head, Consulting and Diagnostic Department of the Clinics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Chulkova A.M.**, PhD (Medicine), Head, Outpatient Hospital Clinic, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

## ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У ЛИЦ ЮНОШЕСКОГО ВОЗРАСТА С РЕКУРРЕНТНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ И ПОЛИПОЗНЫМ РИНОСИНУСИТОМ, ПУТИ ИХ КОРРЕКЦИИ

**Коркмазов А.М., Киселева Е.О., Фролова В.Д., Романюго Г.Д.**

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

**Резюме.** Приводится краткий обзор исследований, посвященных одному из актуальных вопросов оториноларингологии – полипозному риносинуситу у лиц с рекуррентными инфекциями. Отмечено, что пациенты с полипозным риносинуситом чаще привержены острым респираторным инфекциям чем лица без полипоза носа и у них наблюдается значимый иммунологический дисбаланс. Исследованы сыровороточные уровни IL-8, IL-1 $\beta$ , противовоспалительного IL-4 и продукция IFN $\alpha$  у 48 часто болеющих пациентов с наличием в анамнезе респираторную аллергопатологию и полипозный синусит. Все пациенты, согласно клинических рекомендаций, получали комплексную консервативную терапию. Контрольную группу составили 21 человек, болевшие респираторными инфекциями не более одного или двух раз в течении года и анамнез, которых не был отягощен полипозным риносинуситом. В результате выявлено достоверное снижение уровней IFN $\alpha$  и увеличение содержания концентраций IL-8, IL-1 $\beta$  и IL-4, что в свою очередь подтверждает нарушение иммунореактивности организма, снижение локального и системного иммунитета у пациентов с рекуррентными инфекциями и полипозным риносинуситом. Полученные результаты определяют необходимость использования в комплексной терапии этих пациентов иммуннокорректирующих мероприятий.

**Ключевые слова:** цитокины, полипозный риносинусит, рекуррентные инфекции, иммунотерапия

## CYTOKINE PROFILE IN ADOLESCENTS WITH RECURRENT INFECTIONS AND POLYPOSIS SINUSITIS, WAYS OF THEIR CORRECTION

**Korkmazov A.M., Kiseleva E.O., Frolova V.D., Romanyugo G.D.**

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Abstract.** We present a brief review on the polypous rhinosinusitis in persons with recurrent infections, a topical issue of otorhinolaryngology. The patients with polyposis rhinosinusitis are more often committed to

### Адрес для переписки:

Коркмазов Арсен Мусосович  
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.  
Тел.: 8 (932) 010-00-06.  
E-mail: Korkmazov74@gmail.com

### Address for correspondence:

Arsen M. Korkmazov  
South Ural State Medical University  
64 Vorovsky St  
Chelyabinsk  
454092 Russian Federation  
Phone: +7 (932) 010-00-06.  
E-mail: Korkmazov74@gmail.com

### Образец цитирования:

А.М. Коркмазов, Е.О. Киселева, В.Д. Фролова,  
Г.Д. Романюго «Цитокиновый профиль у лиц  
юношеского возраста с рекуррентными инфекциями  
и полипозным риносинуситом, пути их коррекции»  
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,  
№ 3. С. 295-300.  
doi: 10.46235/1028-7221-7738-CPI

© Коркмазов А.М. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

A.M. Korkmazov, E.O. Kiseleva, V.D. Frolova,  
G.D. Romanyugo "Cytokine profile in adolescents with  
recurrent infections and polyposis sinusitis, ways of their  
correction", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 295-300.  
doi: 10.46235/1028-7221-7738-CPI

© Korkmazov A.M. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-7738-CPI

acute respiratory infections than those without nasal polyposis, and they exhibit a sufficient immunological imbalance. Serum levels of IL-8, IL-1 $\beta$ , anti-inflammatory IL-4 and IFN $\alpha$  production were examined in 48 often ill patients with a history of respiratory allergopathology and polypous sinusitis. According to clinical recommendations, all patients received complex conservative therapy. The control group consisted of 21 people who had respiratory infections no more than one or two times *per* year and absence of polypous rhinosinusitis in their clinical history. As a result, a significant decrease in IFN $\alpha$  levels and an increase in the IL-8, IL-1 $\beta$ , and IL-4 concentrations were revealed in the patients with recurrent infections and polypous rhinosinusitis, thus suggesting an impaired immune response, i.e., a decrease in local and systemic immunity in this group. The results obtained confirm a need for the usage of immunocorrective treatment in combined therapy of these patients.

*Keywords: cytokines, polyposis sinusitis, recurrent infections, immunocorrection*

## Введение

Актуальным вопросом современной медицины является своевременное лечение рекуррентных инфекционных заболеваний, сопряженных с коморбидными состояниями. Как правило, рекуррентные инфекции (РИ), формулируемые в определениях болезней как «часто болеющие дети», в своем большинстве случаев представлены респираторными вирусными и бактериальными инвазиями. К настоящему времени известны более 200 вирусов, способных поражать респираторный тракт, из которых наиболее известными являются риновирусы, респираторно-синцициальный вирус, аденовирусы, вирусы гриппа и парагриппа, реовирусы и т. д., по диагностике и лечению которых изданы и обновляются клинические и методические рекомендации, совершенствуются стандарты оказания медицинской помощи [1, 2, 3, 4]. Особый интерес у этой категории пациентов имеют лица юношеского возраста с коморбидными состояниями, наиболее значимыми из которых являются респираторные аллергии (РА) с формированием аллергического ринита, хронические аденоидиты и риносинуситы, в том числе с полипозом носа [5, 6, 7, 8]. Приобретая затяжной, вялотекущий и рецидивирующий характер полипозные риносинуситы (ПРС) вносят определенный вклад в развитие иммунологического дисбаланса в организме, увеличивают время реабилитации и значительно ухудшают качество жизни пациентов [9, 10]. Разрастаясь полипозные вегетации затрудняют носовое дыхание и вызывают гипоксию, угнетают мукоцилиарный клиренс, способствуют контаминации и персистенции бактериальной флоры, отрицательно сказываются на повседневной жизни, работе, учебе, спорте и т. д. [11, 12]. В дальнейшем патологический процесс, распространяясь к лимфоглоточному кольцу и евстахиевым трубам, провоцирует возникновение гнойных отитов. Наблюдаемая агрессия триггерных факторов,

участвующих в формировании острых и хронических отитов, приводит к дополнительным локальным иммунологическим нарушениями, морфологическим и биохимическим конформациям структур височной кости, провоцирует возникновение прогрессирующей тугоухости [13, 14].

На этапах маршрутизации пациентов с рекуррентными инфекциями, РА и ПРС нужен комплексный подход для правильной верификации диагноза и лечения. Необходимо активно привлекать клинических аллергологов-иммунологов, проводить специфические лабораторные исследования. Тщательная оценка полученных результатов во многом облегчает определение гиперчувствительности пациентов к конкретным аллергенам, а иммунологические исследования, например, сывороточные уровни IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-4 и продукция IFN $\alpha$  у обследуемых позволят выявить иммунологическую толерантность и резистентность пациентов.

**Цель исследования** – на основании изучения характера цитокинового профиля и продукции IFN $\alpha$ , у лиц юношеского возраста, с рекуррентными инфекциями, анамнез которых отягощен респираторными аллергопатологическими состояниями и полипозным риносинуситом, определить эффективные возможности ранней реабилитации.

## Материалы и методы

Исследование проведено на клинических базах кафедры оториноларингологии Южно-Уральского государственного медицинского университета за период с 2022 по 2023 год. В соответствии с поставленной целью, в исследование были включены 48 часто болеющих пациентов с наличием в анамнезе РА и ПРС. Все больные, согласно клиническим рекомендациям, получали комплексную консервативную терапию. Контрольную группу составил 21 человек, болевший

респираторными инфекциями не более одного или двух раз в течение года и анамнез которых не был отягощен полипозным риносинуситом. Для оценки иммунореактивности организма, состояния локального и системного иммунитета основной задачей исследования было изучение изменений уровня  $IFN\alpha$  и содержания концентраций  $IL-8$ ,  $IL-1\beta$  и  $IL-4$ , последние представляют собой сигнальные молекулы, играют существенную роль в иммунологической, биологической и химической регуляции. Провоспалительные цитокины, являясь продуктом синтеза таких клеток, как эндотелиоциты, моноциты, мастоциты, лимфоциты, гранулоциты и фибробласты, имеют концентрацию не более 10 нг на клетку, при этом значительный вклад в процесс вносят медиаторы межклеточного взаимодействия: хемокины, интерфероны, колониестимулирующие факторы, интерлейкины и трансформирующие ростовые факторы, фактор некроза опухоли и др. Интегрирование патофизиологических реакций формирует инициацию супрессорных амплифицирующих сигналов, клинически проявляющихся стрессом на клеточном и организменном уровне, повреждением тканей, запуском опухолевых процессов и т. д. Важным представляется способность разных цитокинов одинаково воздействовать (дублировать) на конкретные клетки-мишени. Например, среди интерлейкинов  $IL-1$ , продуцируемый в большей степени макрофагами, реже фибробластами, глиальными и эпителиальными клетками, кератиноцитами, представлен в двух формах  $IL-1\alpha$  и  $IL-1\beta$ . Повышение в сыворотке крови уровня  $IL-1\beta$ , как лимфоцит-активирующего и эндогенного пирогена с молекулярной массой 17,5 кД, является индикативным показателем воспаления. Наглядно можно охарактеризовать повышение  $IL-1$  при обострении аллергического ринита, в частности повышается продукция  $IL-1\beta$  периферической крови [15].

Продуцируемый активированными Т-хелперами 2-го типа  $IL-4$  активно участвует равно как в потенцировании и переключении синтеза  $IgG1$  на  $IgG4$  и  $IgE$  [13], так и в инициации пролиферации В-лимфоцитов и тканевых базофилов за счет влияния на дифференцировку Т-клеток и усиления  $Th2$ -ответа. Как антагониста  $IFN\gamma$ , существенная роль  $IL-4$  состоит в его возможности торможения цитотоксической активности макрофагов, продукции провоспалительных медиаторов ( $TNF\alpha$ ,  $IL-1$ ,  $IL-12$ ) и Т-лимфоцитов. Основной функцией взятого нами в исследование  $IL-8$  является повышение миграции в зону воспаления эозинофилов, лейкоцитов, моноцитов,

лимфоцитов, экспрессия адгезивных молекул, усиление хемотаксиса, активация нейтрофилов. С клинической точки зрения это имеет важное значение, так как показатели  $IL-8$  вследствие быстрого достижения пика концентрации более информативны и с большей вероятностью позволяют прогнозировать тяжесть заболевания. Выявление в исследовании уровней  $IFN\alpha$  в сыворотке крови (нарушение продукции, повышение уровня и т. д.) с большей вероятностью помогало клинически верифицировать развитие вирусной инфекции, его стадию, возможность рецидивов, например, при хронических рекуррентных инфекциях у молодых лиц юношеского возраста наблюдается повышение  $IFN\alpha$  в сыворотке крови [12].

Таким образом, основной задачей было провести клиничко-лабораторные и иммунологические исследования у детей юношеского возраста с рекуррентными инфекциями и полипозным риносинуситом, выявить состояние местного и системного иммунитета и установить их клиничко-диагностическую значимость.

Полученные данные были обработаны общепринятыми методами вариационной статистики. Полученные сведения были отражены в электронных таблицах MS Excel 2000. Все статистические вычисления были проведены при использовании лицензионной программы SPSS Statistics 19.0 на персональном компьютере. Критерий Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса был применен с целью проверки на нормальность распределения количественных показателей. Непараметрические критерии применялись в силу того, что полученные данные не подчинялись нормальному закону распределения. Сравнение проводилось при помощи критерия Хи-квадрат Пирсона. Критический уровень значимости равен 0,05.

Во время выполнения работы все пациенты давали добровольное согласие на обработку результатов общеклинических, лабораторных и иммунологических методов обследований и участие в исследовании. Определение уровней  $IFN\alpha$ , содержания и концентраций в сыворотке крови  $IL-8$ ,  $IL-1\beta$ , и  $IL-4$  проводили по общепринятой методике с помощью иммуноферментного анализа.

## Результаты и обсуждение

Анализируя литературные источники, можно выделить целый ряд триггерных факторов, начиная от нарушений внутренней анатомической архитектоники полости носа, хронических

воспалительных заболеваний верхних и нижних дыхательных путей, генетической предрасположенности, отягощенного аллергического фона, нарушений метаболизма арахидоновой кислоты и др., которые в полной мере могут являться одним из пусковых механизмов в формировании рекуррентных инфекций и полипозного риносинусита. При всем многообразии существующих гипотез по формированию полипозов носа до настоящего времени отсутствует единое мнение о причине заболевания и требуются дальнейшие исследования [8, 9, 12]. В этом контексте результаты статистической обработки анамнестических данных основной группы исследования показали, что доминирующей предпосылкой развития рекуррентных инфекций и полипозного риносинусита у лиц юношеского возраста является генетическая предрасположенность. Так, в 64% случаях, близкие родственники исследуемых пациентов страдали в детстве гипертрофией аденоидов и хроническим аденоидитом, аллергическими заболеваниями, в 17% выявлена бронхиальная астма. Основным диагнозом полипозного риносинусита на фоне рекуррентных инфекций в основной группе установлен 58% случаях ( $n = 28$ ), полипозный риносинусит в сочетании рекуррентных инфекций и бронхиальная астма – в 21% ( $n = 10$ ) случаях. В 42% ( $n = 20$ ) случаях у пациентов был диагностирован аллергический ринит, 8% ( $n = 4$ ) – выставлен диагноз атопический дерматит, что указывало на наличие сопутствующих коморбидных патологических состояний практически у всех обследованных пациентов. Сравнительная оценка и анализ иммунологических показателей были проведены в обеих группах пациентов. В контрольной группе, включающей условно здоровых юношей, обработка результатов иммунологиче-

ских данных указывала из проведенные ранее исследования. При анализе результатов проведенной работы выявлено наличие цитокинового дисбаланса при достоверном ( $p < 0,05$ ) повышении содержания уровней сывороточных цитокинов: IL-8 –  $9,77 \pm 0,67$  ( $p < 0,05$ ) и у условно здоровых –  $4,21 \pm 0,61$ ; IL-1 $\beta$  –  $8,44 \pm 0,68$  ( $p < 0,05$ ) и у условно здоровых –  $2,11 \pm 0,33$ ; противовоспалительного IL-4 –  $3,21 \pm 0,2$  ( $p < 0,05$ ) и у условно здоровых –  $0,69 \pm 0,42$ ; снижение продукции IFN $\alpha$  у пациентов основной группы –  $7,4 \pm 0,38$  ( $p < 0,05$ ) и у условно здоровых –  $10,45 \pm 1,32$ .

Выявленное достоверное снижение уровней IFN $\alpha$  и увеличение содержания концентраций IL-8, IL-1 $\beta$ , и IL-4 в сыворотке крови у пациентов с рекуррентными инфекциями и полипозным риносинуситом подтверждает наличие нарушения иммунореактивности организма, снижение локального и системного иммунитета, длительное угнетение дифференцировки CD4-лимфоцитов и их активации в сторону Th2-защиты, ингибирование обеспечивающего гуморальный иммунитет, переключения В-лимфоцитов на синтез IgE.

Таким образом, выявленный иммунологический дисбаланс, снижение неспецифической защиты и реактивности организма у лиц с рекуррентными инфекциями и полипозным риносинуситом обуславливают необходимость совершенствования методов лечения.

## Заключение

Полученные результаты предопределяют необходимость использования в комплексной терапии этих пациентов иммуннокорректирующих мероприятий.

## Список литературы / References

1. Болезни уха, горла и носа в детском возрасте: национальное руководство / Под ред. М.Р. Богомилского. – М.: ГЭОТАР-медиа, 2021. 1072 с. [Ear, nose and throat diseases in childhood: a national guideline / Ed. M.R. Bogomilsky. 2<sup>nd</sup> ed., revised and additional]. Moscow: GEOTAR-Media. 2021, 1072 p.
2. Булгакова В.А. Лечение острой респираторной инфекции у детей: выбор препарата этиопатогенетического действия как подход к предупреждению полипрагмазии // Лечащий врач, 2017. № 9. С. 39-43. [Bulgakova V.A. Treatment of acute respiratory infection in children: the choice of an etiopathogenetic drug as an approach to the prevention of polypharmacy. *Lechashchiy vrach = Attending Physician*, 2017, no. 9, pp. 39-43. (In Russ.)]
3. Дубинец И.Д., Коркмазов М.Ю., Синицкий А.И., Учаев Д.А., Ангелович М.С. Изменение элементного состава височной кости у пациентов с хроническим гнойным средним отитом // Вестник оториноларингологии, 2020. Т. 85, № 5. С. 44-50. [Dubinets I.D., Korkmazov M.Y., Sinitsky A.I., Uchaev D.A., Angelovich M.S. Changes in the elemental composition of the temporal bone in patients with chronic suppurative otitis media. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2020, Vol. 85, no. 5, pp. 44-50. (In Russ.)]

4. Дубинец И.Д., Коркмазов М.Ю., Синицкий А.И., Даньшова Е.И., Скирпичников И.Н., Мокина М.В., Мирзагалиев Д.М. Окислительный стресс на локальном и системном уровне при хронических гнойных средних отитах // Медицинский совет, 2021. № 18. С. 148-156. [Dubinets I.D., Korkmazov M.Yu., Sinitskii A.I., Danshova E.I., Skirpichnikov I.N., Mokina M.V., Mirzagaliev D.M. Local and systemic oxidative stress in chronic suppurative otitis media. *Meditinskiy sovet = Medical Council*, 2021, no. 18, pp. 148-156. (In Russ.)]
5. Козлов В.С., Савлевич Е.Л., Горбунов С.А., Фельшин Д.И. Эффективность локальной терапии при острых воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей // Вестник оториноларингологии, 2020. Т. 85, № 1. С. 68-73. [Kozlov V.S., Savlevich E.L., Gorbunov S.A., Felshin D.I. The effectiveness of local therapy of acute inflammatory diseases of the upper respiratory tract. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2020, Vol. 85, no. 1, pp. 68-73. (In Russ.)]
6. Коркмазов М.Ю., Солодовник А.В., Коркмазов А.М., Ленгина М.А. Перспективы использования растительного препарата в сочетании с физическими методами при комплексной терапии хронического аденоидита // Медицинский совет, 2021. № 18. С. 19-27. [Korkmazov M.Yu., Solodovnik A.V., Korkmazov A.M., Lengina M.A. Prospects for using herbal preparation in combination with physical methods in complex therapy of chronic adenoiditis. *Meditinskiy sovet = Medical Council*, 2021, no. 18, pp. 19-27. (In Russ.)]
7. Коркмазов М.Ю., Дубинец И.Д., Ленгина М.А., Коркмазов А.М., Корнова Н.В., Рябенко Ю.И. Отдельные показатели иммунологической реактивности при хирургической альтерации лор-органов // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 201-206. [Korkmazov M.Yu., Dubinets I.D., Lengina M.A., Korkmazov A.M., Kornova N.V., Ryabenko Yu.I. Distinct indexes of immunological reactivity in surgical alteration of ORL organs. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 201-206. (In Russ.)]
8. Коркмазов М.Ю., Ленгина М.А., Дубинец И.Д., Коркмазов А.М., Смирнов А.А. Возможности коррекции отдельных звеньев патогенеза аллергического ринита и бронхиальной астмы с оценкой качества жизни пациентов // Медицинский совет, 2022. Т. 16, № 4. С. 24-34. [Korkmazov M.Yu., Lengina M.A., Dubinets I.D., Korkmazov A.M., Smirnov A.A. Opportunities for correction of individual links of the pathogenesis of allergic rhinitis and bronchial asthma with assessment of the quality of life of patients. *Meditinskiy sovet = Medical Council*, 2022, Vol. 16, no. 4, pp. 24-34. (In Russ.)]. doi: 10.46235/1028-7221-1121-DIO.
9. Коркмазов М.Ю., Ленгина М.А. Необходимость дополнительных методов реабилитации больных с кохлео-вестибулярной дисфункцией // Вестник оториноларингологии, 2012. № 55. С. 76-77. [Korkmazov M.Yu., Lengina M.A. The need for additional methods of rehabilitation of patients with cochleo-vestibular dysfunction. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2012, no. 55, pp. 76-77. (In Russ.)]
10. Коркмазов М.Ю., Коркмазов А.М., Дубинец И.Д., Ленгина М.А., Кривопапов А.А. Особенности альтеративного воздействия импульсного шума на кохлеарный анализатор у спортсменов: прогноз, методы коррекции и профилактики // Человек. Спорт. Медицина, 2021. Т. 21, № 2. С. 189-200. [Korkmazov M.Yu., Korkmazov A.M., Dubinets I.D., Lengina M.A., Krivopalov A.A. Features of the alterative effect of impulse noise on the auditory analyzer in athletes: prognosis, correction and prevention. *Chelovek. Sport. Meditsina = Human. Sport. Medicine*, 2021, Vol. 21, no. 2, pp. 189-200. (In Russ.)]
11. Руселевич М.В., Маликова Л.М., Комаров С.Г., Харина Д.В. Медико-социальные факторы формирования респираторных аллергозов пыльцевой этиологии у детей // Социальные аспекты здоровья населения, 2018. Т. 59, № 1. С. 9. [Ruselevich M.V., Malikova L.M., Komarov S.G., Kharina D.V. Medical and social factors in development of respiratory allergies of pollen etiology in children. *Sotsialnye aspekty zdorovya naseleniya = Social Aspects of Population Health*, 2018, Vol. 59, no. 1, p. 9. (In Russ.)]
12. Талибов А.Х., Коркмазов М.Ю., Ленгина М.А., Кривопапов А.А., Гришаев Н.В. Персонализированный подход к повышению качества жизни и психофизической готовности спортсменов-гиревиков коррекцией сенсорных и вазомоторных расстройств ЛОР-органов // Человек. Спорт. Медицина, 2021. Т. 21, № 4. С. 29-41. [Talibov A.Kh., Korkmazov M.Yu., Lengina M.A., Krivopalov A.A., Grishaev N.V. Personalized approach to improving the quality of life and psychophysical readiness of weightlifters through the correction of sensory and vasomotor disorders of ENT organs. *Chelovek. Sport. Meditsina = Human. Sport. Medicine*, 2021, Vol. 21, no. 4, pp. 29-41. (In Russ.)]
13. Щетинин С.А., Гизингер О.А., Коркмазов М.Ю. Клинические проявления и дисфункции иммунного статуса у детей с хроническим аденоидитом и методы их коррекции с использованием озонотерапии // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 3-1. С. 255-257. [Shchetinin S.A., Gisinger O.A., Korkmazov M.Yu. Clinical manifestations and dysfunctions of the immune status in children with chronic

adenoiditis and methods of their correction using ozone therapy. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 3-1, pp. 255-257. (In Russ.)]

14. Fokkens W.J., Lund V.J., Hopkins C., Hellings P.W., Kern R., Reitsma S., Toppila-Salmi S., Bernal-Sprekelsen M., Mullol J., Alobid I., Anselmo-Lima W.T., Bachert C., Baroody F., von Buchwald C., Cervin A., Cohen N., Constantinidis J., De Gaborry L., Desrosiers M., Diamant Z., Douglas R.G., Gevaert P.H., Hafner A., Harvey R.J., Joos G.F., Kalogjera L., Knill A., Kocks J.H., Landis B.N., Limpens J., Lebeer S., Lourenco O., Meco C., Matricardi P.M., O'Mahony L., Philpott C.M., Ryan D., Schlosser R., Senior B., Smith T.L., Teeling T., Tomazic P.V., Wang D.Y., Wang D., Zhang L., Agius A.M., Ahlstrom-Emanuelsson C., Alabri R., Albu S., Alhabash S., Aleksic A., Aloulah M., Al-Qudah M., Alsaleh S., Baban M.A., Baudoin T., Balvers T., Battaglia P., Bedoya J.D., Beule A., Bofares K.M., Braverman I., Brozek-Madry E., Richard B., Callejas C., Carrie S., Caulley L., Chussi D., de Corso E., Coste A., Hadi U.El., Elfarouk A., Eloy P.H., Farrokhi S., Felisati G., Ferrari M.D., Fishchuk R., Grayson W., Goncalves P.M., Grdnic B., Grgic V., Hamizan A.W., Heinichen J.V., Husain S., Ping T.I., Ivaska J., Jakimovska F., Jovancevic L., Kakande E., Kamel R., Karpischenko S., Kariyawasam H.H., Kawachi H., Kjeldsen A., Klimek L., Krzeski A., Kopacheva Barsova G., Kim S.W., Lal D., Letort J.J., Lopatin A., Mahdjoubi A., Mesbahi A., Netkovski J., Nyenbue Tshipukane D., Obando-Valverde A., Okano M., Onerci M., Ong Y.K., Orlandi R., Otori N., Ouenoughy K., Ozkan M., Peric A., Plzak J., Prokopakis E., Prepageran N., Psaltis A., Pugin B., Raftopoulos M., Rombaux P., Riechelmann H., Sahtout S., Sarafoleanu C.-C., Searyoh K., Rhee C.-S., Shi J., Shkoukani M., Shukuryan A.K., Sicak M., Smyth D., Sindvongs K., Sokli c Kosak T., Stjarne P., Sutikno B., Steinsvag S., Tantilipikorn P., Thanaviratananich S., Tran T., Urbancic J., Valiulius A., Vasquez de Aparicio C., Vicheva D., Virkkula P.M., Vicente G., Voegels R., Wagenmann M.M., Wardani R.S., Welge-Lussen A., Witterick I., Wright E., Zabolotniy D., Zsolt B., Zwetsloot C.P. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology*, 2020, Vol. 58, Suppl. S29, pp. 1-464.

15. Handbook of Pediatric Respiratory Medicine. Eds. E. Eber, F. Midulla. 1<sup>st</sup> ed. [S.l.]: European Respiratory Society (ERS), 2013. 719 p.

---

**Авторы:**

**Коркмазов А.М.** — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Киселева Е.О.** — ординатор кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Фролова В.Д.** — учащаяся подготовительного курса ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Романюго Г.Д.** — студент ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

---

**Authors:**

**Korkmazov A.M.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Kiseleva E.O.**, Resident, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Frolova V.D.**, Student, Preparatory Course, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Romanyugo G.D.**, Student, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

---

Поступила 10.05.2023

Отправлена на доработку 29.06.2023

Принята к печати 06.07.2023

---

Received 10.05.2023

Revision received 29.06.2023

Accepted 06.07.2023

## НЕКОТОРЫЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ПОЛИПОЗНОГО РИНОСИНУСИТА

Коркмазов М.Ю.<sup>1</sup>, Ленгина М.А.<sup>1</sup>, Дубинец И.Д.<sup>1</sup>, Кравченко А.Ю.<sup>2</sup>,  
Клепиков С.В.<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup> ГАУЗ «Областная клиническая больница № 3», г. Челябинск, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

**Резюме.** Особую актуальность в лечении хронического полипозного риносинусита за последнее десятилетие приобретает использование таргетной терапии различными моноклональными антителами. Связано это прежде всего с высокой частотой заболеваемости, полиэтиологичностью и особенностью патогенетических механизмов формирования полипозного процесса, малой эффективностью существующих методов лечения, склонностью к рецидивам и коморбидным состояниям. В статье приводится краткая историческая справка об участии различных предикторов в ремоделировании слизистой оболочки полости носа и околоносовых пазух на этапах формирования полипозного процесса, обосновывающих необходимость использования в лечении моноклональных антител. На основе рассмотрения ведущей роли Th2-воспаления в иммунопатогенезе формирования полипозных вегетаций, теоретически оценено влияние таргетной терапии в лечении хронического полипозного риносинусита, освещены некоторые важные моменты, нуждающиеся в дальнейшей корректировке. Несомненно, ингибирование синтеза «нужных» интерлейкинов приводит к улучшению клинической симптоматики и уменьшению размеров полипозных вегетаций, но в то же время реальные биохимические трансформации слизистой оболочки полости носа мало изучены. Так, попытка ингибирования какого-то цитокина может привести к опосредованной блокировке других провоспалительных цитокинов. В этом контексте необходимо дальнейшее изучение фармакодинамики препаратов таргетной терапии с прописанием четких противопоказаний к их применению.

**Ключевые слова:** иммунопатогенез, цитокины, хронический полипозный риносинусит, таргетная терапия

### Адрес для переписки:

Коркмазов Мусос Юсуфович  
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.  
Тел.: 8 (932) 010-00-06.  
E-mail: Korkmazov74@gmail.com

### Address for correspondence:

Musos Yu. Korkmazov  
South Ural State Medical University  
64 Vorovsky St  
Chelyabinsk  
454092 Russian Federation  
Phone: +7 (932) 010-00-06.  
E-mail: Korkmazov74@gmail.com

### Образец цитирования:

М.Ю. Коркмазов, М.А. Ленгина, И.Д. Дубинец,  
А.Ю. Кравченко, С.В. Клепиков «Некоторые  
иммунологические аспекты таргетной терапии  
полипозного риносинусита» // Российский  
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 301-306.  
doi: 10.46235/1028-7221-8955-SIA

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

### For citation:

M. Yu. Korkmazov, M. A. Lengina, I. D. Dubinets,  
A. Yu. Kravchenko, S. V. Klepikov "Some immunological  
aspects of targeted therapy in polypous rhinosinusitis", Russian  
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 301-306.  
doi: 10.46235/1028-7221-8955-SIA

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

DOI: 10.46235/1028-7221-8955-SIA

## SOME IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF TARGETED THERAPY IN POLYPOUS RHINOSINUSITIS

Korkmazov M.Yu.<sup>a</sup>, Lengina M.A.<sup>a</sup>, Dubinets I.D.<sup>a</sup>, Kravchenko A.Yu.<sup>b</sup>, Klepikov S.V.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Chelyabinsk Regional Clinical Hospital No. 3, Chelyabinsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

**Abstract.** Over the past decade, targeted therapy with various monoclonal antibodies has become particularly relevant for the treatment of chronic polypous rhinosinusitis (PR). This is primarily due to the high incidence rate, polyetiologiological origin and pathogenetic features of polyposis development, low effectiveness of existing treatment approaches, the tendency for relapse, and comorbid conditions. The article provides a brief historical background concerning various predictors of the mucous membrane remodeling in the nasal cavity and paranasal sinuses at the stages of the polyposis formation thus justifying the need for implementation of monoclonal antibodies in the treatment schedules. Considering the leading role of Th2-inflammation in immunopathogenesis of developing polypous vegetations, the influence of targeted therapy upon treatment of chronic polypous rhinosinusitis is theoretically evaluated, and we highlight some important issues that should be further specified. Undoubtedly, inhibition of the synthesis of “necessary” interleukins leads to improvement in clinical symptoms and reduced size of polypous vegetations. At the same time, the real biochemical transformations of the nasal mucosa have been scarcely studied. E.g., an attempt to inhibit some cytokine may lead to indirect blockage of other pro-inflammatory cytokines. In future, it is necessary to study the pharmacodynamics of targeted drugs in order to clarify distinct contraindications to their use.

*Keywords:* immunopathogenesis, cytokines, chronic polypous rhinosinusitis, targeted therapy

### Введение

Как отмечено в последних Российских клинических рекомендациях по лечению хронического полипозного риносинусита (ХПРС) и Европейских согласительных документах EPOS-2020 (European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps), для врача-оториноларинголога понимание патогенеза формирования полипозного процесса представляет исключительную важность. Связано это прежде всего с многогранной полиэтиологичностью, высокой частотой заболеваемости, склонностью к рецидивам и коморбидным состояниям [1, 4, 7].

### Материалы и методы

За последние десятилетия понимание иммунологических аспектов воспаления в патогенезе ХПРС расширялось, некоторые гипотезы были изучены, появлялись новые. Так, например, в конце XX века в полипозной ткани были выделены активированные эозинофилы (эозинофильное пропитывание) и подтверждено существенное влияние последних на хронизацию воспаления при полипозах носа [14]. В то же время другими учеными при ХПРС был зарегистри-

рован процесс активации IgE, эотаксина, IL-5, и лейкотриенов, что привело большему пониманию патогенетических механизмов [6]. Более детальное изучение патогенетических механизмов участия Th2-воспаления (термин, используемый до недавнего времени) в развитии изолированного полипозного процесса в околоносовых пазухах выявило еще опосредованное воздействие на приобретение хронического диффузного течения [15]. В предыдущей версии согласительного комитета EPOS 2012 были представлены убедительные доказательства влияния T2-цитокинов на активность эозинофилов при развитии ПРС [8]. Это послужило своего рода основанием признания Европейским обществом аллергологов и отоларингологов (ICAR) в 2016 году о ведущей роли IL-13 и IL-5 в патогенезе ХПРС [11]. Все высказанные мнения были отражены в клинических рекомендациях EPOS 2020. Главный акцент ставится на преобладании Th2-эндотипа в патогенезе формирования полипозного процесса и подчеркивается взаимосвязь ХПРС с активацией воспалительных клеток и медиаторов воспаления, таких как IL-4, IL-5, IL-13, эозинофилов и тучных клеток. Исходя из этого Европейским форумом исследований и образования в обла-

сти аллергии и заболеваний дыхательных путей (EUFOREA 2021) предложен контроль степени тяжести ХПРС и представлены методики терапевтической коррекции [12]. Одновременными исследователями ICAR (2021) было установлено, что 87% пациентов с ХПРС имеют Th2-эндотип (IL-4, IL-5, IL-13, эозинофильный катионный белок, Р-гликопротеин [9].

## Результаты и обсуждение

В пролонгированной инициации Th2-воспаления при ХПРС участвуют практически все клетки иммунной системы. При этом задействован как адаптивный иммунитет посредством В-лимфоцитов, синтезирующих иммуноглобулин Е (IgE), тучных клеток, базофилов, эозинофилов, так и клетки врожденного иммунитета (ILC2). В любом случае, ключевыми центральными цитокинами, вызывающими Th2-воспаление, являются IL-4, IL-5, IL-13. Так, например, одним из предикторов ремоделирования слизистой оболочки полости носа и околоносовых пазух и рецидива ПРС, продуцируемый Th2 и ILC2, IL-5 индуцирует эозинофилию, мобилизуя эозинофилы в слизистой оболочке, участвует в их дифференцировке, созревании, активации, что приводит к повреждению эпителия дыхательных путей, нарушению мукоцилиарного клиренса [13]. А IL-4 и IL-13, имеющие общую -цепь рецептора IL-4, индуцируют пролиферацию В-лимфоцитов, стимулируют локальный синтез IgE и IgG4, активируют sIgE-рецепторы, находящиеся на эозинофилах, моноцитах, базофилах и тучных клетках, стимулируя гиперплазию бокаловидных клеток, гиперсекрецию слизи, а также обеспечивают дифференцировку Th2 из Th0 [10]. Указанные цитокины влияют на нарушение целостности барьера, приводя к мезенхимальной трансформации эпителия, субэпителиальному фиброзу и ремоделированию ткани с образованием полипов [2].

Таким образом, изучение иммунопатогенеза позволило сформировать стратегии выбора лечения пациентов с ХПРС. Так, основываясь на результатах клинических исследований, руководящая группа EPOS-2020 предлагает использовать в лечении хронического риносинусита, в том числе с полипозным процессом, интраназальных глюкокортикостероидов (ин ГКС), в сочетании с короткими, 1 или 2 раза за 6-12 месяцев, курсами системных ГКС, антигистаминных препаратов, интраназальных деконгестантов, средств ирригационной терапии (физиологический изотонический раствор), а также инновационных лекарственных средств, прицельно воздей-

ствующих на Th2-воспаление – биологические препараты. Последние назначают при подтвержденном двустороннем назальном полипозе пациентам, в анамнезе которых имеет место эндоскопическое оперативное вмешательство по поводу удаления полипов носа. Согласно клиническим рекомендациям для назначения биологических препаратов необходимо наличие не менее трех критериев из нижеперечисленных: признаки Th2-воспаления, потребность ГКС системного действия или противопоказания к их назначению; значительное снижение показателей качества жизни, гипосмию, вплоть до полной аносмии, сопутствующую бронхиальную астму [3, 4, 7]. Критериями оценки ответа на терапию биологическими препаратами считают: уменьшение размеров полипов носа; снижение потребности в ГКС системного действия; повышение показателей качества жизни; восстановление либо улучшение обоняния; уменьшение влияния сопутствующих заболеваний. При отсутствии эффекта проводится хирургическое лечение [3, 5]. Среди противопоказаний к проведению лечения ХПРС биологическими препаратами выделяют: повышенную чувствительность к препарату или любому из его вспомогательных веществ, детский возраст до 6 лет у пациентов с атопическим дерматитом среднетяжелого и тяжелого течения в связи с неустановленными эффективностью и безопасностью, детский возраст до 12 лет у пациентов с бронхиальной астмой среднетяжелого и тяжелого течения в связи с неустановленными эффективностью и безопасностью.

Фармакодинамика генно-инженерных биологических препаратов обеспечивается благодаря механизму подавления сигналов от IL-4 и IL-13 посредством связывания рекомбинантного моноклонального антитела с общей для мембранных клеточных рецепторов IL-4 и IL-13 альфа-субъединицей рецептора IL-4. После присоединения моноклона к интерлейкину эти субъединицы образуют димер, который запускает внутриклеточную сигнализацию через JAK STAT путь и ингибирует передачу сигнала IL-4 через рецептор первого типа и передачу сигнала IL-4 и IL-13 через рецептор второго типа. Это приводит блокированию воспалительных клеток (В-лимфоцитов, эозинофилов, базофилов, тучных клеток, фибробластов) и медиаторов воспаления (IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-33, тимус-стромального липопротеина, эотаксина, тимус-ассоциированного регуляторного хемокина).

Однако необходимо учитывать, что имеющийся на поверхности клетки гетеродимерный мембранный клеточный рецептор, который состоит

из двух субъединиц, обладающих сродством к ИЛ-4, при взаимодействии с последним, активирует и В-лимфоциты, переключая их на синтез не только IgE, но и целого каскада гликопротеидов, в первую очередь продуцирование иммуноглобулинов класса А, G и М. Кроме того, моноклональные антитела блокируя клетки, несущие рецепторы к ИЛ-4, тормозят остальные каскады этих клеток, что может привести к выключению В-клеточного ответа, который в свою очередь несмотря на клиническое улучшение в виде уменьшения воспаления, вероятно, может повлечь за собой провоцирование отдаленных последствий.

Здесь необходимо учитывать возможную блокировку помимо какого-либо определенного медиатора воспаления, на функционирование которого направлено действие человеческого рекомбинантного моноклонального антитела, опосредованное торможением продукции других провоспалительных цитокинов.

В данном случае необходимо помнить о возможном формировании аутоиммунного механизма при контакте комплекса моноклональное антитело-иммуноглобулин с макрофагами, которые воспринимают клетку как поврежденную и ликвидируют ее.

В настоящее время известно о ведущей роли Th2-воспаления в патогенезе ХПРС, и в этом контексте необходимо разобрать несколько важных моментов нуждающихся в дальнейшей корректировке. Одним из них является функционирование ИЛ-13. Известно, что на мембране рецептор к ИЛ-13 состоит из 2 димеров, т. е. для того, чтобы отщепился ИЛ-13, расщепляется димер один — неактивный, а другой становится активным к ИЛ-13. Но моноклональное антитело специфично и связывается как с D-димером, так и ИЛ-13, функционирует на клетках и вне клеток. Синтез ИЛ-13 под воздействием моноклонального антитела, которые представлены на мембране клетки, приводя блокированию отщепления ИЛ-13, дополнительно блокируют саму клетку, которая продуцирует ИЛ-13. Таким образом, в сыворотке крови резко повышается не только сам ИЛ-13, но плюс еще на клетке, тем самым выключая эту клетку из работы. Сам димер неактивный, он находится на клетке, но введение моноклональных антител приводит блокировке самой клетки, которая имеет ИЛ-13, в виде рецептора, не отщепленного еще. Таким образом, спорным остается вопрос, утверждаемый некоторыми исследователями об интактности клетки от антител.

Другой момент, влияние комплекса антиген (клетка) — антитело и его связывание с клеточными рецепторами Fc-фрагменту, например,

макрофагов, дендритных клеток. Фагоциты через их Fc-рецепторы могут уничтожать данный комплекс АГАТ как чужеродный антиген и служить источником формирования аутоиммунных процессов. Fc-рецепторы имеются также и на нейтрофилах. Макрофаги и другие фагоциты, которые ликвидируют эти клетки, могут воспринимать ее как поврежденную, что в разы повышает риск формирования аутоиммунного процесса. Несомненно, ингибирование синтеза указанных интерлейкинов приводит к улучшению клинической симптоматики и уменьшению размеров полипозных вегетаций, но в то же время реальные биохимические трансформации слизистой оболочки полости носа мало изучены. Поэтому излишнее желание получить желаемый положительный эффект в отдаленном периоде может привести к непредсказуемым результатам. Ведь с осложнениями со стороны других органов пациенты будут обращаться не к оториноларингологам, а другим специалистам (урологам с повреждением почек, гепатологам с патологией печени, кардиологам с повреждением сердца и т. д.). Такие наблюдения также немногочисленны, и надо понимать, что моноклональные антитела — это вариант иммунносупрессии. Например, те же клетки, синтезирующие ИЛ-4, запускают пролиферацию не только В-лимфоцитов, продуцирующих IgE, но они при этом еще активируют синтез IgG, IgA, IgM В-лимфоцитами, отвечающими за многие варианты гуморального иммунного ответа. Отсюда понятно, что ингибирование работы клетки, синтезирующей IgE, приводит к блокированию всего каскада клеток, которые несут рецептор к ИЛ-4. Кроме того, необходимо помнить, что когда мы блокируем какой-то из этих цитокинов, есть дублирующие его функции другие цитокины, что может не всегда способствовать эффективности антицитокиновой терапии. Плюс к этому опосредованно мы блокируем и другие провоспалительные цитокины, которые могут синтезировать заблокированные клетки. Блокируется рецептор, в дальнейшем выключается вся клетка и секреция сформированных провоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-13, при этом отключаются и другие функции В-клеток, несущих этот рецептор.

## Заключение

Поэтому практическому врачу-оториноларингологу при принятии решения использовать в лечении ХПРС генно-инженерных биологических препаратов необходимо быть очень крайне осторожным, соблюдая следующие рекомендации:

1. При ведении пациентов с ХПРС необходим междисциплинарный подход с участием прежде всего аллергологов и иммунологов, пульмонологов, врачей общей практики, для выявления сопутствующих соматических заболеваний, а также проведения комплексного общеклинического и полного иммунологического обследования, в том числе и определения уровней

цитокинов, против которых направлена антицитокиновая терапия.

2. Несмотря на проведение масштабных клинических исследований, необходимо дальнейшее изучение таргетных препаратов с прописанием четких противопоказаний к применению генно-инженерной биологической терапии.

## Список литературы / References

1. Кормазов А.М., Дубинец И.Д., Ленгина М.А. Возможности топической антиоксидантной защиты оперированных полостей в практической оториноларингологии // Вестник оториноларингологии, 2017. Т. 82, № 55. С. 14-15. [Korkmazov A.M., Dubinets I.D., Lengina M.A. Possibilities of topical antioxidant protection of operated cavities in practical otorhinolaryngology. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2017, Vol. 82, no. 55, pp. 14-15. (In Russ.)]

2. Кормазов М.Ю., Ленгина М.А., Дубинец И.Д., Кормазов А.М., Смирнов А.А. Возможности коррекции отдельных звеньев патогенеза аллергического ринита и бронхиальной астмы с оценкой качества жизни пациентов // Медицинский совет, 2022. Т. 16, № 4. С. 24-34. [Korkmazov M.Yu., Lengina M.A., Dubinets I.D., Korkmazov A.M., Smirnov A.A. Opportunities for correction of individual links of the pathogenesis of allergic rhinitis and bronchial asthma with assessment of the quality of life of patients. *Meditinskiy sovet = Medical Council*, 2022, Vol. 16, no. 4, pp. 24-34. (In Russ.)]

3. Кормазов М.Ю., Дубинец И.Д., Ленгина М.А., Кормазов А.М., Корнова Н.В., Рябенко Ю.И. Отдельные показатели иммунологической реактивности при хирургической альтерации лор-органов // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 201-206. [Korkmazov M.Yu., Dubinets I.D., Lengina M.A., Korkmazov A.M., Kornova N.V., Ryabenko Yu.I. Distinct indexes of immunological reactivity in surgical alteration of ORL organs. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 201-206. (In Russ.)]. doi: 10.46235/1028-7221-1121-DIO.

4. Полипозный риносинусит. Клинические рекомендации. 2019. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.vodkb.ru/wp-content/uploads/pages/documents/klin-recomend/Polipoznyj-rinosinusit19.pdf> (Дата обращения: 26.01.2023). [Polypous rhinosinusitis. Clinical recommendations. 2019. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.vodkb.ru/wp-content/uploads/pages/documents/klin-recomend/Polipoznyj-rinosinusit19.pdf> (Date of the application: January 26, 2023)].

5. Савлевич Е.Л., Егоров В.И., Шачнев К.Н., Татаренко Н.Г. Анализ схем лечения полипозного риносинусита в Российской Федерации // Российская оториноларингология, 2019. Т. 18, № 1 (98). С. 124-134. [Savlevich E.L., Egorov V.I., Shachnev K.N., Tatarenko N.G. The analysis of polypous rhinosinusitis treatment regimens in the Russian Federation. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2019, Vol. 18, no. 1 (98), pp. 124-134. (In Russ.)]

6. Bachert C., Zhang L., Gevaert P. Current and future treatment options for adult chronic rhinosinusitis: focus on nasal polyposis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 136, no. 6, pp. 1431-1440.

7. Fokkens W.J., Lund V.J., Hopkins C., Hellings P.W., Kern R., Reitsma S., Toppila-Salmi S., Bernal-Sprekelsen M., Mullol J., Alobid I., Anselmo-Lima W.T., Bachert C., Baroody F., von Buchwald C., Cervin A., Cohen N., Constantinidis J., De Gaborly L., Desrosiers M., Diamant Z., Douglas R.G., Gevaert P.H., Hafner A., Harvey R.J., Joos G.F., Kalogjera L., Knill A., Kocks J.H., Landis B.N., Limpens J., Lebeer S., Lourenco O., Meco C., Matricardi P.M., O'Mahony L., Philpott C.M., Ryan D., Schlosser R., Senior B., Smith T.L., Teeling T., Tomazic P.V., Wang D.Y., Wang D., Zhang L., Agius A.M., Ahlstrom-Emanuelsson C., Alabri R., Albu S., Alhabash S., Aleksic A., Aloulah M., Al-Qudah M., Alsaleh S., Baban M.A., Baudoin T., Balvers T., Battaglia P., Bedoya J.D., Beule A., Bofares K.M., Braverman I., Brozek-Madry E., Richard B., Callejas C., Carrie S., Caulley L., Chussi D., de Corso E., Coste A., Hadi U.El., Elfarouk A., Eloy P.H., Farrokhi S., Felisati G., Ferrari M.D., Fishchuk R., Grayson W., Goncalves P.M., Grdnic B., Grgic V., Hamizan A.W., Heinichen J.V., Husain S., Ping T.I., Ivaska J., Jakimovska F., Jovancevic L., Kakande E., Kamel R., Karpischenko S., Kariyawasam H.H., Kawauchi H., Kjeldsen A., Klimek L., Krzeski A., Kopacheva Barsova G., Kim S.W., Lal D., Letort J.J., Lopatin A., Mahdjoubi A., Mesbahi A., Netkovski J., Nyenbue Tshipukane D., Obando-Valverde A., Okano M., Onerci M., Ong Y.K., Orlandi R., Otori N., Ouennoughy K., Ozkan M., Peric A., Plzak J., Prokopakis E., Prepageran N., Psaltis A., Pugin B., Raftopoulos M., Rombaux P., Riechelmann H., Sahtout S., Sarafoleanu C.-C., Searyoh K., Rhee C.-S., Shi J., Shkoukani M., Shukuryan A.K., Sicak M., Smyth D., Sindvongs K., Soklic Kosak T., Stjarne P., Sutikno B., Steinsvag S., Tantilipikorn P., Thanaviratnanich S., Tran T., Urbancic J., Valiulius A., Vasquez de Aparicio C., Vicheva D., Virkkula P.M.,

Vicente G., Voegels R., Wagenmann M.M., Wardani R.S., Welge-Lussen A., Witterick I., Wright E., Zabolotniy D., Zsolt B., Zwetsloot C.P. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2020. *Rhinology*, 2020, Vol. 58, Suppl. S29, pp. 1-464.

8. Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Baroody F., Cohen N., Cervin A., Douglas R., Gevaert P., Georgalas C., Goossens H., Harvey R., Hellings P., Hopkins C., Jones N., Joos G., Kalogjera L., Kern B., Kowalski M., Price D., Riechelmann H., Schlosser R., Senior B., Thomas M., Toskala E., Voegels R., Wang de Y., Wormald P.J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. *Rhinology*, 2012, Vol. 50, Suppl. 23, pp. 1-298.

9. Huriyati E., Darwin E., Yanwirasti Y., Wahid I. Association of inflammation mediator in mucosal and tissue of chronic rhinosinusitis with recurrent nasal polyp. Open Access Maced. *J. Med. Sci.*, 2019, Vol.7, no. 10, pp. 1635-1640.

10. Lavigne P., Lee S.E. Immunomodulators in chronic rhinosinusitis. *World J. Otorhinolaryngol. Head Neck Surg.*, 2018, Vol. 4, no. 3, pp. 186-192.

11. Orlandi R.R., Kingdom T.T., Hwang P.H., International consensus statement on allergy and rhinology: rhinosinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.*, 2016, Vol. 6, Suppl. 1, pp. S22-S209.

12. Orlandi R.R., Kingdom T.T., Smith T.L., International consensus statement on allergy and rhinology: Rhinosinusitis 2021. *Int. Forum Allergy Rhinol.*, 2021, Vol. 11, no. 3, pp. 213-739.

13. Schleimer R.P. Immunopathogenesis of rhinosinusitis and nasal polyposis. *Annu. Rev. Pathol.*, 2017, Vol. 12, pp. 331-357.

14. Stoop A.E., van der Heijden H.A., Biewenga J., van der Baan S. Eosinophils in nasal polyps and nasal mucosa: an immunohistochemical study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1993, Vol. 91, pp. 616-622.

15. van Bruaene N., Perez-Novo C., Basinski T.M., van Zele T., Holtappels G., de Ruyck N., Schmidt-Weber C., Akdis C., van Cauwenberge P., Bachert C., Gevaert P. T-cell regulation in chronic paranasal sinus disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 121, no. 6, pp. 1435-1441, 1441.e1-3.

---

**Авторы:**

**Коркмазов М.Ю.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Ленгина М.А.** — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Дубинец И.Д.** — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Кравченко А.Ю.** — заведующая отделением оториноларингологии ГАУЗ «Областная клиническая больница № 3», г. Челябинск, Россия

**Клепиков С.В.** — сотрудник отделения оториноларингологии ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

---

**Authors:**

**Korkmazov M. Yu.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Lengina M.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Dubinets I.D.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Kravchenko A. Yu.**, Head, Department of Otorhinolaryngology, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital No. 3, Chelyabinsk, Russian Federation

**Klepikov S.V.**, Employee, Department of Otorhinolaryngology, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

---

Поступила 10.05.2023

Отправлена на доработку 29.06.2023

Принята к печати 05.07.2023

---

Received 10.05.2023

Revision received 29.06.2023

Accepted 05.07.2023

# ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ И ГЛИКОЛИЗА В CD4<sup>+</sup>T-ЛИМФОЦИТАХ ВИЧ/ВГС КОИНФИЦИРОВАННЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НЕОТВЕТЧИКОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ SEAHORSE

**Королевская Л.Б., Власова В.В., Шмагель Н.Г., Сайдакова Е.В.**

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

**Резюме.** Окислительное фосфорилирование и гликолиз необходимы для выживания, деления и функционирования CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов. Однако косвенные данные свидетельствуют о том, что у ВИЧ-позитивных, коинфицированных вирусом гепатита С (ВГС) иммунологических неответчиков на антиретровирусную терапию изменены показатели метаболической активности CD4<sup>+</sup>T-клеток. Эти данные позволяют предположить, что в основе неспособности CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов иммунологических неответчиков продуктивно делиться и увеличивать свою численность после подавления вирусной репликации антиретровирусными препаратами может лежать метаболическая дисфункция. Ставшая доступной сравнительно недавно технология анализа внеклеточных потоков с использованием оборудования Seahorse XF дает возможность оценить метаболическую активность клеток. Целью настоящей работы была оценка эффективности окислительного фосфорилирования и гликолиза в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков с использованием технологии Seahorse. Исследованы образцы периферической крови пациентов двух групп: ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков с числом CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов менее 350/мкл крови и ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических ответчиков с числом CD4<sup>+</sup>T-клеток более 500/мкл крови. В изолированных из крови CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах проведена оценка базальной и максимальной скорости потребления кислорода комплексами электрон-транспортной цепи митохондрий, а также скорость закисления среды протонами, формирующимися в процессе гликолиза. Установлено, что у ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков сни-

---

**Адрес для переписки:**

Королевская Лариса Борисовна  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения Российской академии наук  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (342) 280-83-34.  
Факс: 8 (342) 280-92-11.  
E-mail: bioqueen@mail.ru

**Address for correspondence:**

Larisa B. Korolevskaya  
Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms  
13 Golev St  
Perm  
614081 Russian Federation.  
Phone: +7 (342) 280-83-34.  
Fax: +7 (342) 280-92-11.  
E-mail: bioqueen@mail.ru

---

**Образец цитирования:**

Л.Б. Королевская, В.В. Власова, Н.Г. Шмагель, Е.В. Сайдакова «Исследование показателей окислительного фосфорилирования и гликолиза в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков с применением технологии Seahorse» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 307-312.  
doi: 10.46235/1028-7221-9936-SOO

© Королевская Л.Б. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

**For citation:**

L.B. Korolevskaya, V.V. Vlasova, N.G. Shmagel, E.V. Saidakova "Study of oxidative phosphorylation and glycolysis in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes of HIV/HCV coinfecting immunological non-responders by means of the Seahorse technology", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 307-312.  
doi: 10.46235/1028-7221-9936-SOO

© Korolevskaya L.B. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-9936-SOO

жена как базальная, так и максимальная скорость потребления кислорода митохондриями CD4<sup>+</sup>T-клеток. Более того, в выделенных из крови CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах иммунологических неответчиков увеличена базальная скорость гликолиза. Можно предположить, что значительная часть CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков находится в состоянии активации и готовности к гомеостатической пролиферации, что обостряет необходимость получения дополнительной энергии и макромолекул. Однако клетки оказываются неспособными скоординированно изменять свой метаболизм для удовлетворения данных потребностей. Выявленная нами дисрегуляция метаболических путей может вносить вклад в низкую регенеративную способность CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов у ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков.

*Ключевые слова:* окислительное фосфорилирование, гликолиз, технология Seahorse technology, ВИЧ-инфекция, CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты, иммунологические неответчики

## STUDY OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION AND GLYCOLYSIS IN CD4<sup>+</sup>T LYMPHOCYTES OF HIV/HCV COINFECTED IMMUNOLOGICAL NON-RESPONDERS BY MEANS OF THE SEAHORSE TECHNOLOGY

Korolevskaya L.B., Vlasova V.V., Shmagel N.G., Saidakova E.V.

*Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

**Abstract.** Oxidative phosphorylation and glycolysis are essential for CD4<sup>+</sup>T lymphocyte survival, division, and functioning. However, indirect evidence suggests the parameters of metabolic activity CD4<sup>+</sup>T cell to be impaired in HIV/ hepatitis C virus (HCV)-coinfected immunological non-responders to antiretroviral therapy. These data imply that, in immunological non-responders, the failure of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes to divide and expand after viral suppression by antiretroviral drugs may be caused by metabolic dysfunction. The newly released technology for the analysis of extracellular fluxes using seahorse XF equipment permits assessment of the cells' metabolic activity. The aim of this study was to evaluate the efficiency of oxidative phosphorylation and glycolysis in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes of HIV/HCV co-infected immunological non-responders by means of the Seahorse technology. We studied peripheral blood samples from patients of two groups: HIV/HCV coinfected immunological non-responders with CD4<sup>+</sup>T lymphocyte counts of < 350/μL, and HIV/HCV coinfected immunological responders with CD4<sup>+</sup>T cell counts > 500/μL. In isolated CD4<sup>+</sup>T lymphocytes, we assessed the basal and maximal oxygen consumption rates by complexes of the mitochondrial electron transport chain, as well as the rates of incubation medium acidification by protons formed during glycolysis. We have found that, in HIV/HCV coinfected immunological non-responders, both basal and maximal oxygen consumption rates by CD4<sup>+</sup>T cell mitochondria are reduced. Moreover, the basal rate of glycolysis was found to be increased in isolated CD4<sup>+</sup>T lymphocytes of the non-responders. One may assume that a significant part of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes in HIV/HCV co-infected immunological non-responders is activated, thus being ready for homeostatic proliferation, with increasing requirements for additional energy and macromolecules. However, the cells are unable to change their metabolism in a coordinated manner to meet these demands. The revealed dysregulation of metabolic pathways may contribute to the low regenerative capacity of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes in HIV/HCV co-infected immunological non-responders.

*Keywords:* oxidative phosphorylation, glycolysis, Seahorse technology, HIV infection, CD4<sup>+</sup>T lymphocytes, immunological non-responders

Работа выполнена в рамках государственного задания № 121112500044-9; поддержана РФФИ и Пермским краем (научный проект № 20-415-596002).

## Введение

Для выживания, деления, выполнения эффекторных и регуляторных функций CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитам требуются энергия и макромолекулы, образуемые в ходе различных биохимических реакций. Магистральными метаболическими путями, обеспечивающими клетку не только аденозинтрифосфатом (АТФ), но и множеством промежуточных продуктов синтеза нуклеиновых кислот, белков и липидов являются гликолиз и окислительное фосфорилирование [6]. Эти метаболические пути критически важны для CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов.

Современным подходом к исследованию метаболической активности клеток является технология анализа внеклеточных потоков (англ. Extracellular flux (XF) analysis) с использованием оборудования Seahorse XF (Agilent Technologies, США). Анализатор клеточного метаболизма Seahorse XF фиксирует скорость поглощения кислорода и скорость закисления среды клетками, что позволяет оценить интенсивность митохондриального дыхания и скорость гликолиза соответственно. Добавление ингибиторов окислительного фосфорилирования и гликолиза расширяет возможности метода, позволяя определять не только базовые биоэнергетические параметры, но и измерять метаболическую приспособляемость клеток. Ввиду того, что технология Seahorse XF стала доступной относительно недавно, исследования с ее применением ограничены, в частности отсутствуют данные о метаболической активности CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов у коинфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирусом гепатита С (ВГС) иммунологических неответчиков на антиретровирусную терапию (АРТ).

Коинфекция ВИЧ и ВГС широко распространена в Пермском крае [1]. По сравнению с ВИЧ моноинфицированными субъектами ВИЧ/ВГС коинфицированные больные подвержены более высокому риску развития СПИД-неассоциированных заболеваний и смерти [3]. Более того, у зараженных ВИЧ коинфекция ВГС повышает вероятность развития иммунологического неответа на АРТ. При этом типе ответа на лечение подавление репликации ВИЧ под действием антиретровирусных препаратов не сопровождается значительным приростом численности CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов [2]. У иммунологических неответчиков (ИН) глубокая хро-

ническая CD4<sup>+</sup>T-лимфопения увеличивает риск развития СПИД и смерти [5]. Хотя показано, что нарушение регенерации CD4<sup>+</sup>T-клеток вызвано непродуктивным делением этих лимфоцитов, причины развития иммунологического неответа у значительной части ВИЧ/ВГС коинфицированных пациентов, получающих АРТ, остаются невыясненными.

Ранее мы показали, что у ИН изменены косвенные показатели энергетического обмена в CD4<sup>+</sup>T-клетках памяти, а именно увеличена масса митохондрий и снижена экспрессия генов, кодирующих компоненты комплексов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) [9].

**Цель настоящей работы** — оценка эффективности окислительного фосфорилирования и гликолиза в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков с использованием технологии Seahorse.

## Материалы и методы

Проведение исследования было одобрено этическим комитетом Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (рег. № комитета IRB00008964). Каждый участник подписал информированное согласие. Включенные в исследование пациенты соответствовали следующим требованиям: подтвержденные диагнозы ВИЧ- и ВГС-инфекций, приверженность АРТ в течение двух и более лет, вирусная нагрузка ВИЧ менее 50 копий/мл, отсутствие лечения интерферонами или анти-ВГС препаратами прямого действия.

Были сформированы две группы: 1) ВИЧ/ВГС коинфицированные ИН (n = 4) с числом CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов менее 350/мкл крови; 2) ВИЧ/ВГС коинфицированные иммунологические ответчики (ИО; n = 4) с числом CD4<sup>+</sup>T-клеток более 500/мкл крови.

Кровь объемом до 30 мл забирали натошак из кубитальной вены в вакуумные пробирки, содержащие литий гепарин (Weihai Hongyu Medical Devices Cj., Ltd, Китай). Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования двукратно разведенной фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко (DPBS, Gibco, США) периферической крови в градиенте плотности Диаколл (1,077 г/мл, «Диаэм», Россия). Выделенные клетки собирали, дважды отмывали раствором DPBS, подсчитывали в камере Горяева, после чего подвергали контролируемому замораживанию в жидком азоте в среде, содержащей 90% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Gibco, Колумбия) и 10% диметилсульфоксида (AppliChem, Германия). Перед проведением исследования клетки разморажива-

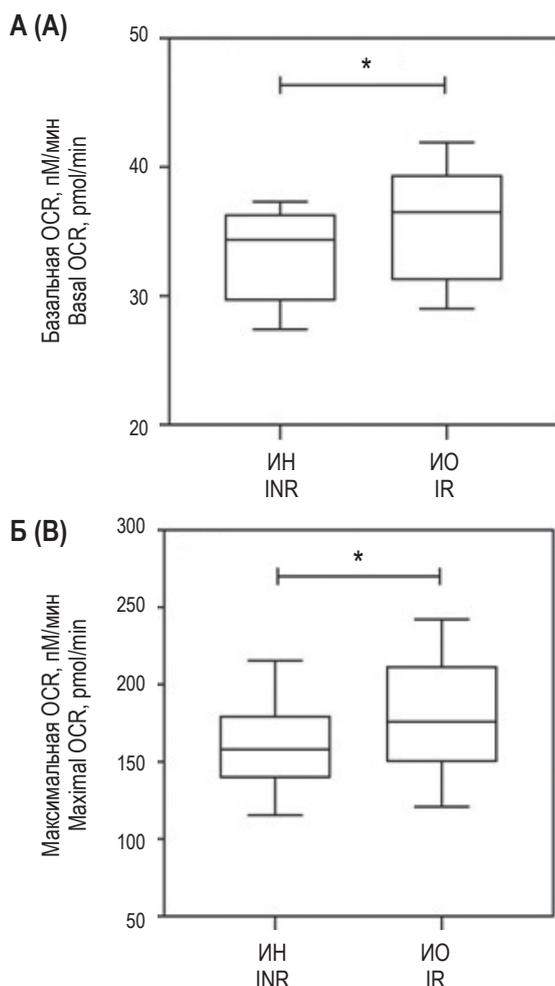


Рисунок 1. Базальная (А) и максимальная (Б) скорость потребления кислорода  $CD4^+$ Т-лимфоцитами ВИЧ/ВГС коинфицированных больных с различной эффективностью ответа на антиретровирусную терапию

Примечание. Группы обследованных: ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики. OCR (англ. oxygen consumption rate) – скорость потребления кислорода. Представлены медианы, интерквартильные интервалы и 10-90% размахи. Статистические расчеты выполнены по методу Манна–Уитни: \* –  $p < 0,05$ .

Figure 1.  $CD4^+$ T lymphocyte basal (A) and maximal (B) oxygen consumption rates in HIV/HCV coinfected patients with different response efficiency to antiretroviral therapy

Note. Groups: INR, immunological non-responders; IR, immunological responders. OCR, oxygen consumption rate. Medians, interquartile ranges, and 10-90% ranges are shown. Statistical calculations were made according to the Mann–Whitney method: \*,  $p < 0.05$ .

ли. Жизнеспособные лимфоциты подсчитывали, окрашивая клетки трипановым синим.

Негативную селекцию  $CD4^+$ Т-лимфоцитов проводили с использованием коммерческого набора Dynabeads Untouched Human  $CD4^+$ T cells (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя.

Изолированные  $CD4^+$ Т-клетки ресуспендировали в среде XF RPMI Medium (Agilent Technologies, США), содержащей 10 мМ глюкозы (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ глутамина («Диаэм», Россия) и 1 мМ пирувата натрия (Sigma-Aldrich, США), и вносили по  $2,5 \times 10^5$  клеток в лунки планшета (Agilent Technologies, США), предварительно обработанного поли-D-лизинном (50 мкг/мл, Sigma, США). Планшет центрифугировали в течение 4 мин при 200 g для формирования монослоя клеток. Объем среды в лунке доводили до 175 мкл, планшет инкубировали при  $+37^\circ C$  в течение 60 мин. Активность митохондриального дыхания и гликолиза определяли с использованием анализатора Seahorse XFe96 (Agilent Technologies, США) по показателям скорости потребления кислорода (англ. oxygen consumption rate – OCR) и скорости ацидификации среды (англ. extracellular acidification rate – ECAR) соответственно. Измерения производили на базальном уровне и после внесения ингибиторов дыхательной цепи митохондрий: олигомицина в конечной концентрации 2,5 мкМ, карбонилцианид-4-(трифлуорометокси)фенилгидразона (FCCP; 2 мкМ), ротенона и антимицина А (P/AA; 0,5 мкМ). Вышеперечисленные реагенты были получены в Agilent Technologies, США.

В пробах определяли базальную скорость потребления кислорода (разница между OCR на базальном уровне и OCR после внесения P/AA) и максимальную скорость потребления кислорода (разница между OCR после внесения FCCP и OCR после добавления P/AA). Показатель гликолиза – ECAR – определяли на базальном уровне и в ответ на действие P/AA. Анализ данных производили с использованием программного обеспечения Wave Desktop (Agilent Technologies, США).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием непараметрических методов. В выборке рассчитывали медиану и интерквартильный размах – Me ( $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ ). Достоверность различий между группами устанавливали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Проведение статистических расчетов и построение графиков осуществляли с использованием программы GraphPad Prism 8.0.1.

## Результаты и обсуждение

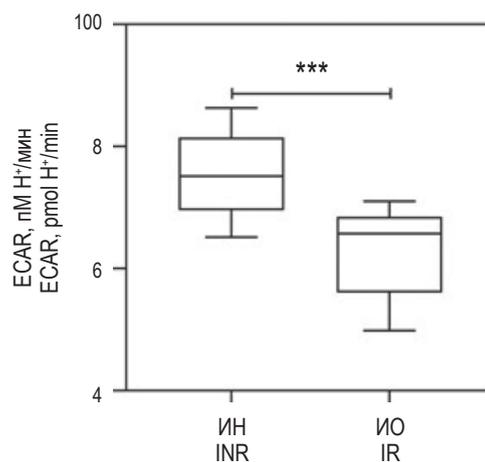
Исследование интенсивности окислительного фосфорилирования в изолированных из периферической крови  $CD4^+$ Т-лимфоцитах показало следующее. У ИН по сравнению с ИО снижена базальная скорость потребления кисло-

рода дыхательной цепью митохондрий в CD4<sup>+</sup>T-клетках (рис. 1А). Более того, в условиях повышенного запроса на АТФ, созданных внесением разобщителя окислительного фосфорилирования FCCP, митохондрии CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов ИН не могут достичь показателей интенсивности потребления кислорода, характерных для митохондрий ИО (рис. 1Б). Представленные данные подтверждают полученные нами ранее результаты: у ИН низкая экспрессия генов, кодирующих компоненты ЭТЦ, сопровождается снижением функциональной активности митохондрий CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов. По-видимому, клетки компенсируют нехватку генерируемой митохондриями АТФ посредством активизации внемитохондриального метаболического пути: гликолиза.

Для оценки этого предположения мы проанализировали, насколько интенсивно протекает гликолиз в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах субъектов исследуемых групп. Было установлено, что показатели базального гликолиза в CD4<sup>+</sup>T-клетках ИН значительно превосходят таковые в соответствующих лимфоцитах ИО (рис. 2). Известно, что покоящиеся клетки получают энергию за счет окислительного фосфорилирования, тогда как гликолитический фенотип характерен для активированных и делящихся Т-лимфоцитов [4]. Ранее было показано, что для CD4<sup>+</sup>T-клеток ИН свойственен высокий уровень хронической иммунной активации, ассоциированный, в том числе, с увеличенной плотностью экспрессии транспортера глюкозы Glut1 [7]. Также необходимо отметить, что у ИН малочисленные CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты постоянно получают сигналы для запуска гомеостатической пролиферации, которая, хоть и не является продуктивной, может быть сопряжена с переключением биоэнергетических показателей в пользу гликолиза.

## Заключение

Таким образом, мы показали, что при иммунологическом неответе на АРТ у ВИЧ/ВГС коинфицированных больных увеличена гликолитическая активность CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов, что может свидетельствовать об активированном статусе и готовности клеток к пролиферации. Примечательно, что этот феномен не сопровождается соответствующим приростом интенсивности окислительного фосфорилирования в митохондриях. Более того, интенсивность работы ЭТЦ митохондрий в CD4<sup>+</sup>T-клетках ИН снижается. Можно предположить, что лимфоциты, испытывающие потребность в АТФ и макромолекулах, оказываются неспособными скоординированно



**Рисунок 2.** Скорость закисления среды CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитами ВИЧ/ВГС коинфицированных больных с различной эффективностью ответа на антиретровирусную терапию

Примечание. Группы обследованных: ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики. ECAR (англ. extracellular acidification rate) – скорость закисления среды. Представлены медианы, интерквартильные интервалы и 10-90% размахи. Статистические расчеты выполнены по методу Манна–Уитни: \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Figure 2. Rate of medium acidification by CD4<sup>+</sup>T lymphocytes in HIV/HCV coinfected patients with different response efficiency to antiretroviral therapy

Note. Groups: INR, immunological non-responders; IR, immunological responders. ECAR, extracellular acidification rate. Medians, interquartile ranges, and 10-90% ranges are shown. Statistical calculations were made according to the Mann–Whitney method: \*\*\*,  $p < 0.001$ .

изменять свой метаболизм для удовлетворения потребностей. Следует отметить, что нарушение работы ЭТЦ останавливает клеточный цикл и не позволяет клеткам делиться *in vitro* [8], а гликолиз, хоть и поставляет АТФ и субстраты для синтеза белков, липидов и нуклеиновых кислот дочерних лимфоцитов, не может компенсировать недостаточность функциональной активности митохондрий. По-видимому, у ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН отмечается дисрегуляция метаболических путей, обеспечивающих биоэнергетические и биосинтетические потребности клетки. Это в свою очередь может вносить вклад в низкую регенеративную способность CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов.

## Благодарности

В работе было использовано оборудование ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

## Список литературы / References

1. Шмагель Н.Г., Шмагель К.В., Черешнев В.А. Клинические аспекты неэффективности высокоактивной антиретровирусной терапии // *Инфекционные болезни*, 2011. Т. 9, № 1. С. 5-10. [Shmagel N.G., Shmagel K.V., Chereshev V.A. Clinical aspects of inefficiency of highly active antiretroviral therapy. *Infektionnyye bolezni = Infectious Diseases*, 2011, Vol. 9, no. 1, pp. 5-10. (In Russ.)]
2. Autran B., Carcelain G., Li T.S., Gorochov G., Blanc C., Renaud M., Durali M., Mathez D., Calvez V., Leibowitch J., Katlama C., Debre P. Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy. *Immunol. Lett.*, 1999, Vol. 66, no. 1-3, pp. 207-211.
3. Chen T.Y., Ding E.L., Seage G.R. III, Kim A.Y. Meta-analysis: increased mortality associated with hepatitis C in HIV-infected persons is unrelated to HIV disease progression. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, Vol. 49, no. 10, pp. 1605-1615.
4. Grist J.T., Jarvis L.B., Georgieva Z., Thompson S., Kaur Sandhu H., Burling K., Clarke A., Jackson S., Wills M., Gallagher F.A., Jones J.L. Extracellular lactate: a novel measure of T cell proliferation. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, no. 3, pp. 1220-1226.
5. Gutierrez F., Padilla S., Masia M., Iribarren J.A., Moreno S., Viciano P., Hernandez-Quero J., Aleman R., Vidal F., Salavert M., Blanco J.R., Leal M., Drona F., Perez Hoyos S., del Amo J., and Ris Md Co. Patients' characteristics and clinical implications of suboptimal CD4 T-cell gains after 1 year of successful antiretroviral therapy. *Curr. HIV Res.*, 2008, Vol. 6, no. 2, pp. 100-107.
6. Li X.B., Gu J.D., Zhou Q.H. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes – new targets for lung cancer therapy. *Thorac. Cancer*, 2015, Vol. 6, no. 1, pp. 17-24.
7. Masson J.J.R., Cherry C.L., Murphy N.M., Sada-Ovalle I., Hussain T., Palchaudhuri R., Martinson J., Landay A.L., Billah B., Crowe S.M., Palmer C.S. Polymorphism rs1385129 within glut1 gene SLC2A1 is linked to poor CD4<sup>+</sup> T cell recovery in antiretroviral-treated HIV<sup>+</sup> individuals. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 17, no. 9, 900. doi: 10.3389/fimmu.2018.00900.
8. Wheaton W.W., Weinberg S.E., Hamanaka R.B., Soberanes S., Sullivan L.B., Anso E., Glasauer A., Dufour E., Mutlu G.M., Budigner G.S., Chandel N.S. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife*, 2014, Vol. 3, no. 3, e02242. doi: 10.7554/eLife.02242.
9. Younes S.A., Talla A., Pereira Ribeiro S., Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Shmagel K.V., Shive C.L., Freeman M.L., Panigrahi S., Zweig S., Balderas R., Margolis L., Douek D.C., Anthony D.D., Pandiyan P., Cameron M., Sieg S.F., Calabrese L.H., Rodriguez B., Lederman M.M. Cycling CD4<sup>+</sup> T cells in HIV-infected immune nonresponders have mitochondrial dysfunction. *J. Clin. Invest.*, 2018, Vol. 128, no. 11, pp. 5083-5094.

---

### Авторы:

**Королевская Л.Б.** — к.м.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

**Власова В.В.** — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

**Шмагель Н.Г.** — д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

**Сайдакова Е.В.** — д.б.н., заведующая лабораторией молекулярной иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

### Authors:

**Korolevskaya L.B.**, PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Vlasova V.V.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Shmagel N.G.**, PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Saidakova E.V.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

## РАЗРАБОТКА МОДЕЛЬНОГО ИММУНОФИЛЬТРАЦИОННОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНЬЮГАТА НА ОСНОВЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

**Кропанева М.Д., Храмцов П.В., Бочкова М.С., Раев М.Б.**

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

**Резюме.** Иммунофильтрационный формат диагностической системы для аналитического тестирования может стать альтернативой иммунохроматографическим аранжировкам тест-систем. Ввиду особенностей процедуры иммунофильтрационного анализа, его преимущества по сравнению с наиболее популярным форматом экспресс-тестов, иммунохроматографией, состоят в большей чувствительности, а также отсутствии хук-эффекта. В работе представлены данные по разработке иммунофильтрационного анализа для определения антител против S-белка коронавируса COVID-19. Целью исследования явилась оптимизация условий для модельного иммуноанализа в формате иммунофильтрации с использованием диагностических реагентов на основе пероксидазы хрена.

В качестве положительных сывороток в работе использовали остаточные образцы сыворотки крови пациентов «красной» зоны, с верифицированным диагнозом новой коронавирусной инфекции, в качестве отрицательных образцов были использованы сыворотки крови, полученные до 2019 года. Процедуру иммунофильтрационного анализа осуществляли с применением пула отрицательных и положительных сывороток крови. Суть метода иммунофильтрации состоит в нанесении небольшого объема образца (например, цельной крови или сыворотки крови пациента) на поверхность пористой мембраны, на которой предварительно сорбированы антигены: S-белок коронавируса. Избыток внесимого образца, равно как и всех участвующих в процедуре анализа растворов, фильтруется через мембрану и поглощается пористым материалом, находящимся под мембраной внутри пластикового корпуса иммунофильтрационной ячейки. При прохождении анализируемого образца сквозь поры мембраны происходит связывание иммуноглобулинов класса G (антител), специфичных к сорбированному антигену. После полного впитывания образца на мембрану наносится раствор диагностического реагента – цветной метки, конъюгированной с моноклональными антителами против IgG человека. Это приводит к тому, что с образовавшимся иммунным комплексом при наличии антител в образце связываются цветные метки, конъюгированные с антивидовыми моноклональными антителами. Избыток диагностического реагента фильтруется сквозь мембрану внутрь впитывающего эле-

### Адрес для переписки:

Кропанева Мария Дмитриевна  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения Российской академии наук  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (342) 280-77-94, (902) 808-09-29.  
Факс: 8 (342) 280-92-11.  
E-mail: kropanevamasha@gmail.com

### Address for correspondence:

Mariya D. Kropaneva  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,  
Ural Branch of the Russian Academy of Sciences  
13 Golev St  
Perm  
614081 Russian Federation  
Phone: +7 (342) 280-77-94, (902) 808-09-29.  
Fax: +7 (342) 280-92-11.  
E-mail: kropanevamasha@gmail.com

### Образец цитирования:

М.Д. Кропанева, П.В. Храмцов, М.С. Бочкова,  
М.Б. Раев «Разработка модельного  
иммунофильтрационного анализа с использованием  
конъюгата на основе пероксидазы хрена» // Российский  
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 313-320.  
doi: 10.46235/1028-7221-8003-DOA

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

### For citation:

M.D. Kropaneva, P.V. Khramtsov, M.S. Bochkova,  
M.B. Rayev "Development of a model immunofiltration assay  
using a conjugate based on horseradish peroxidase", Russian  
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 313-320.  
doi: 10.46235/1028-7221-8003-DOA

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

DOI: 10.46235/1028-7221-8003-DOA

мента ячейки. Описанная процедура приводит к образованию комплекса, включающего в себя метку, а каталитическая реакция с ее участием приводит к окрашиванию участков мембраны, где сорбирован S-белок. Были проведены исследования, оптимизирующие процедуру анализа и повышающие значимые характеристики теста.

Показано, что добавление додецилсульфата натрия до конечной концентрации 50 мкМ в субстратный буфер позволяет достичь более высокого аналитического сигнала и стабильного результата спустя 10 минут после окончания процедуры анализа. Оптимизированы такие условия иммунофильтрационного анализа, как разведения диагностического реагента, объем вносимого образца и количество S-белка коронавируса, наносимого на нитроцеллюлозную мембрану. Определено, что с помощью иммунофильтрационного анализа возможно определение антител против S-белка коронавируса в разведении образца сыворотки более чем 1/1000. Результаты иммунофильтрационного анализа воспроизводят результаты ИФА.

*Ключевые слова:* коронавирусная инфекция COVID-19, пероксидаза хрена, иммунофильтрационный анализ, лабораторная диагностика, иммуноферментный анализ, "point-of-care" тест-системы

## DEVELOPMENT OF A MODEL IMMUNOFILTRATION ASSAY USING A CONJUGATE BASED ON HORSE RADISH PEROXIDASE

Kropaneva M.D., Khramtsov P.V., Bochkova M.S., Rayev M.B.

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

**Abstract.** The immunofiltration format of a diagnostic system for analytical testing may become an alternative to immunochromatographic design of test systems. Due to the nature of the immunofiltration assay procedure, its advantages over immunochromatography, the most popular rapid test format, are as follows: higher sensitivity as well as absence of a hook effect. The paper presents data on development of an immunofiltration assay for the detection of antibodies against the S-protein of the SARS-CoV-2 virus. The aim of the present study was to optimize the conditions for a model immunoassay using the immunofiltration format by means of diagnostic reagents based on horseradish peroxidase.

The samples of blood serum taken in the "red" COVID-19 area from patients with a verified diagnosis of a new coronavirus infection were registered as positive samples, and blood sera obtained before 2019 were used as negative samples. The procedure of immunofiltration assay was carried out using a pool of negative and positive blood sera. The essence of the immunofiltration method consists in applying a small volume of a sample (for example, whole blood or patient's blood serum) to the surface of a porous membrane with pre-absorbed antigen, e.g., S-protein of the SARS-CoV-2 virus. The excess of applied sample as well as all solutions used in the assay procedure, are filtered through the membrane and absorbed by the porous material located under the membrane inside plastic housing of the immunofiltration cell. Upon passage of the analyzed sample through the pores of the membrane, the IgG immunoglobulins (antibodies) are binding to the absorbed antigen. After complete impregnation of the sample, a diagnostic reagent solution is applied to the membrane. The colored label is conjugated with monoclonal antibodies against human IgG. Hence, in the presence of antibodies in the sample, the immune complex binds with colored labels conjugated with anti-species monoclonal antibodies. The excess of diagnostic reagent is filtered through the membrane into the absorbent element of the work cell. The described procedure leads to the formation of a complex that includes the label. A following catalytic reaction with its participation leads to the staining of the membrane regions where the S-protein is sorbed. Studies have been carried out to optimize the assay procedure and improve the significant characteristics of the test.

It has been shown that the addition of sodium dodecyl sulfate to its final concentration of 50 μM in the substrate buffer enables a higher analytical signal and a stable result within 10 minutes after the end of the assay procedure. Other factors of immunofiltration assay, e.g., dilution of the diagnostic reagent, volume of the introduced sample and amounts of the coronavirus S-protein applied to the nitrocellulose membrane were optimized. It has been found that the usage of immunofiltration assay allows to detect antibodies against the S-protein of SARS-CoV-2 at more than 1/1000 dilution of a serum sample. The results of immunofiltration assay reproduce appropriate results obtained by ELISA technique.

*Keywords:* coronavirus infection COVID-19, horseradish peroxidase, immunofiltration assay, laboratory diagnostics, enzyme immunoassay, point-of-care test-system

Работа выполнена в рамках государственного задания, регистрационный номер НИОКТР 122010800029-1.

## Введение

На сегодняшний день существуют многочисленные коммерческие тест-системы, предназначенные для серологической диагностики COVID-19 и пригодные для мониторинга эффективности вакцинации [8]. Однако необходимым направлением исследований остается разработка тест-систем для применения в условиях ограниченных ресурсов [15]. К подобным тестам предъявляются такие требования, как простота, стабильность при хранении, доступность для массового производства. В настоящее время наиболее популярным форматом point-of-care тестов является иммунохроматография. Иммунохроматографические тесты демонстрируют высокую эффективность с точки зрения чувствительности и специфичности, которые могут достигать 97-99% [11]. Несмотря на это, иммунохроматографические тесты от ряда производителей не показали достаточной эффективности, и их производство и продажи были приостановлены регулирующими органами [3, 10].

Таким образом, несмотря на высокую эффективность коммерческих иммуноферментных и иммунохроматографических анализов, для детекции антител к антигенам коронавируса необходимы исследования, направленные на поиск новых форматов анализа и их оптимизацию в контексте применения для определения конкретных мишеней.

Альтернативой иммунохроматографическим анализам могут стать тест-системы в формате иммунофльтрации (ИФ). Суть метода иммунофльтрации состоит в нанесении небольшого объема образца (например, цельной крови или сыворотки крови пациента) на поверхность пористой мембраны, на которой предварительно сорбированы антигены: S-белок коронавируса. Избыток вносимого образца, равно как и всех участвующих в процедуре анализа растворов, фильтруется через мембрану и поглощается пористым материалом, находящимся под мембраной внутри пластикового корпуса иммунофльтрационной ячейки. При прохождении анализируемого образца сквозь поры мембраны происходит связывание иммуноглобулинов класса G (антител), специфичных к сорбированным антигенам. После полного впитывания образца на мембрану наносится раствор диагностического реагента — цветной метки, конъюгированной с моноклональными антителами против IgG человека. Это приводит к тому, что с образовавшимся иммун-

ным комплексом при наличии антител в образце связываются цветные метки, конъюгированные с антивидовыми моноклональными антителами. Избыток диагностического реагента фильтруется сквозь мембрану внутрь впитывающего элемента ячейки. Описанная процедура приводит к образованию комплекса, включающего в себя метку, а каталитическая реакция с ее участием приводит к окрашиванию участков мембраны, где сорбирован S-белок.

Ввиду особенностей описываемого формата анализа, преимущества иммунофльтрации (ИФ) по сравнению с наиболее популярным форматом экспресс-тестов, иммунохроматографией [12], состоят в большей чувствительности, а также отсутствии хук-эффекта (отсутствие сигнала при высоких концентрациях анализируемого вещества в образце) [13] ввиду наличия этапов промывки.

Соответственно, целью настоящего исследования явилась оптимизация условий для модельного иммуноанализа в формате иммунофльтрации для определения антител к Spike-белку коронавируса с использованием диагностических реагентов на основе пероксидазы хрена.

## Материалы и методы

### Сбор, аликвотирование и хранение сывороток крови

В работе использовали остаточные образцы сыворотки крови пациентов «красной» зоны, с верифицированным диагнозом новой коронавирусной инфекции (COVID-19), находившиеся на лечении в КМСЧ № 1 г. Перми и давшие письменное согласие на использование обезличенных остаточных образцов биоматериалов, а также остаточные образцы сыворотки крови пациентов, сдававших анализы на наличие антител в клинико-диагностической лаборатории ООО «Медлаб-экспресс», г. Перми и давшие письменное согласие на использование обезличенных остаточных образцов биоматериалов (разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН 04.04.2022). Количество IgG против SARS-CoV-2 было проанализировано методом иммуноферментного анализа (ИФА). В связи с широким распространением новой коронавирусной инфекции и мероприятиями по вакцинации населения получение образцов отрицательных сывороток являлось проблематичным. Поэтому в качестве отрицательных образцов были использованы сыворотки крови, полученные до 2019 года. Сыворотки крови были получены от здоровых доноров в возрасте от 23 до 43 лет, давших письменное согласие (получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН 09.06.2017). Отсутствие в них антител

к SARS-CoV-2 было подтверждено результатами ИФА.

#### **Имунофильтрационный анализ для определения IgG против COVID-19**

При разработке иммунофильтрационного анализа ориентировались на протоколы, описанные в работах [1, 2, 4]. Использовали нитроцеллюлозную (н/ц) мембрану с диаметром пор 0,3 мкм. Подготавливали н/ц мембрану нужного размера. На область мембраны с размерами 10 × 10 мм точками по 2 мкл наносили антиген Spike-protein, RBD (S-белок), разведенный до необходимой концентрации в ЗФР. Далее иммуносорбент высушивали 30 минут при комнатной температуре и 1 час 30 минут при 37 °С перемещали в планшет и промывали 35 мл ЗФРТ, процедуру повторяли 3 раза. После этого нитроцеллюлозную мембрану с иммобилизованными антигенами блокировали ЗФР + 0,2% твин-20 в течение 60 минут, 37 °С, вновь промывали и высушивали. После этого полученный иммуносорбент разрезали на куски меньшего размера (15 × 15 мм), собирали иммунофильтрационную ячейку и проводили анализ. В «окна» для внесения образца добавляли 150 мкл ЗФРТ. После полного впитывания вносили 100 мкл анализируемого образца в блокирующем буфере, через минуту иммунофильтрационную ячейку промывали 150 мкл ЗФРТ. Далее вносили 80 мкл конъюгата НР/Mab vs hum IgG в блокирующем буфере. После 1 минуты ячейки вновь промывали и вносили 80 мкл ТМБ в субстратном буфере (9 мл 5 мМ цитрат-фосфатный буфер, рН 5 + 1 мл 1 мг/мл ТМБ в ДМСО + 2 мкл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) с добавлением 50 мМ додецилсульфата натрия. После 10 минут оценивали результаты анализа: иммунофильтрационную ячейку разбирали, а нитроцеллюлозную мембрану с образовавшимися иммунными комплексами помещали на прозрачную пленку и сканировали. Полученное изображение обрабатывали в программе ImageJ, согласно методу, описанному в статье [5].

#### **Дот-иммуноанализ на нитроцеллюлозной мембране**

Подготавливали тест-полоски из нитроцеллюлозной мембраны (с диаметром пор 0,45 мкм), трехкратно промывали ЗФРТ. Далее тест-полоски обрабатывали блокирующим раствором в течение 60 минут при 37 °С, трехкратно промывали и инкубировали с сывороткой крови человека, разведенной в исследуемых блокирующих растворах в 10 раз, вновь промывали и проводили инкубацию с конъюгатом пероксидазы хрена, растворенной в исследуемых блокирующих растворах в 100 раз, в течение 60 минут при 37 °С. После процедуры

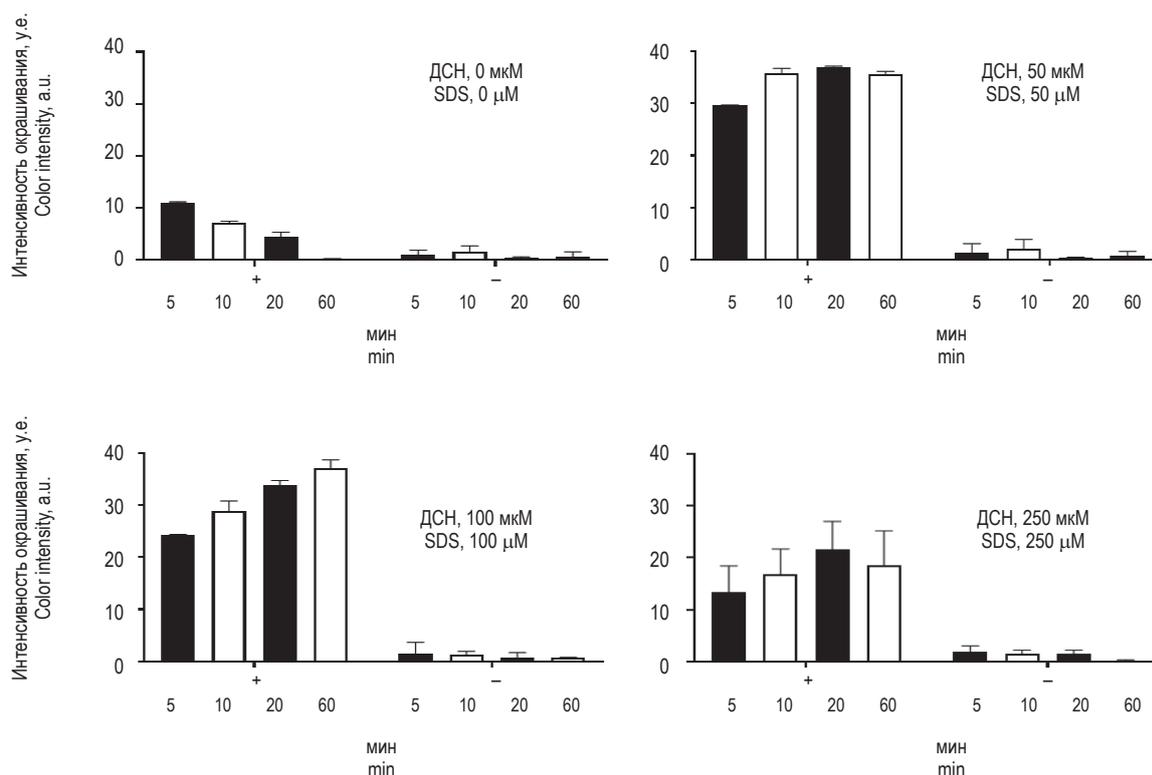
промывки тест-полоски высушивали, фиксировали на белом листе бумаги и сканировали. В качестве контрольного образца была использована тест-полоска, не подвергавшаяся процедуре анализа. Результат получали путем вычитания показателя интенсивности окрашивания фонового сигнала исследуемых образцов из показателя интенсивности окрашивания фонового сигнала контрольного образца.

Синтез конъюгата пероксидазы хрена с моноклональными антителами против IgG человека проводили согласно методике [14].

## **Результаты и обсуждение**

Применение ферментной метки в составе диагностического реагента предполагает добавление субстрата тетраметилбензидина-3,3',5,5' (ТМБ). Традиционно, в качестве буфера для разведения ТМБ используют цитрат-фосфатный буфер, рН 5 с добавлением 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В результате предварительных экспериментов было показано, что использование данного буфера в иммунофильтрационном анализе не позволяет получить стабильный аналитический сигнал. Реакция окисления субстрата пероксидазой хрена идет с высокой скоростью, что приводит к обесцвечиванию аналитической зоны. Это снижает качество оценки результатов анализа. В работе [7] продемонстрировано, что добавление додецилсульфата натрия (ДСН) позволяет достигать стабильного сигнала в анализах с использованием пероксидазы хрена и ТМБ. В связи с этим нами была протестирована эффективность использования ДСН в качестве стабилизатора сигнала в иммунофильтрационном анализе для определения антител против антигена SARS-CoV-2. В качестве анализируемых образцов использовали пул из трех положительных сывороток крови с высоким уровнем антител и пул из трех отрицательных сывороток крови в разведении 1/10 в блокирующем буфере. Было протестировано три различных концентрации ДСН: 50, 100 и 250 мкМ. Анализ проводили согласно протоколу, описанному в разделе «Материалы и методы». Регистрацию аналитического сигнала проводили через 5, 10, 20 минут. Было показано, что добавление ДСН до конечной концентрации 50 мкМ в субстратный буфер позволяет достичь более высокого аналитического сигнала и стабильного результата спустя 10 минут после окончания процедуры анализа (рис. 1).

На следующем этапе был проведен скрининг оптимального блокирующего раствора. Было протестировано 12 блокаторов в трех различных концентрациях. В данном случае было важным уменьшение фонового сигнала на ни-



**Рисунок 1. Оценка влияния концентрации додецила сульфата натрия на аналитический сигнал иммунофльтрационного анализа для определения антител к SARS-CoV-2**

Примечание. «+» – положительный образец, «—» – отрицательный образец; n = 2, среднее значение ± стандартное отклонение.

Figure 1. Evaluation of the effect of the concentration of sodium dodecyl sulfate on the analytical signal of the immunofiltration assay for the detection of antibodies to SARS-CoV-2

Note. “+”, positive sample; “—”, negative sample; n = 2, mean ± standard deviation.

троцеллюлозной мембране. Поэтому скрининг блокаторов проводили при помощи метода дот-иммуноанализа без стадии сорбции антигена коронавируса S-белка. В результате было показано, что при использовании в качестве блокатора детергента твина-20 в концентрации 0,2% наблюдается наименьший фоновый сигнал (рис. 2А).

Далее исследовали влияние блокирующего эффекта наиболее распространенных детергентов на фоновый сигнал в дот-иммуноанализе. Использовали твин-20, твин-80 и тритон X-100 в различных концентрациях. Анализ также проводили без стадии сорбции S-белка. После завершения процедуры анализа тест-полоски сканировали и оценивали интенсивность окрашивания фона. Определено, что для анализа, проводимого на нитроцеллюлозной мембране, с использованием детектирующего реагента на основе пероксидазы хрена оптимальный блокирующий эффект достигается путем добавления в блокирующий буфер детергента твина-20 до конечной концентрации 0,2% (рис. 2Б).

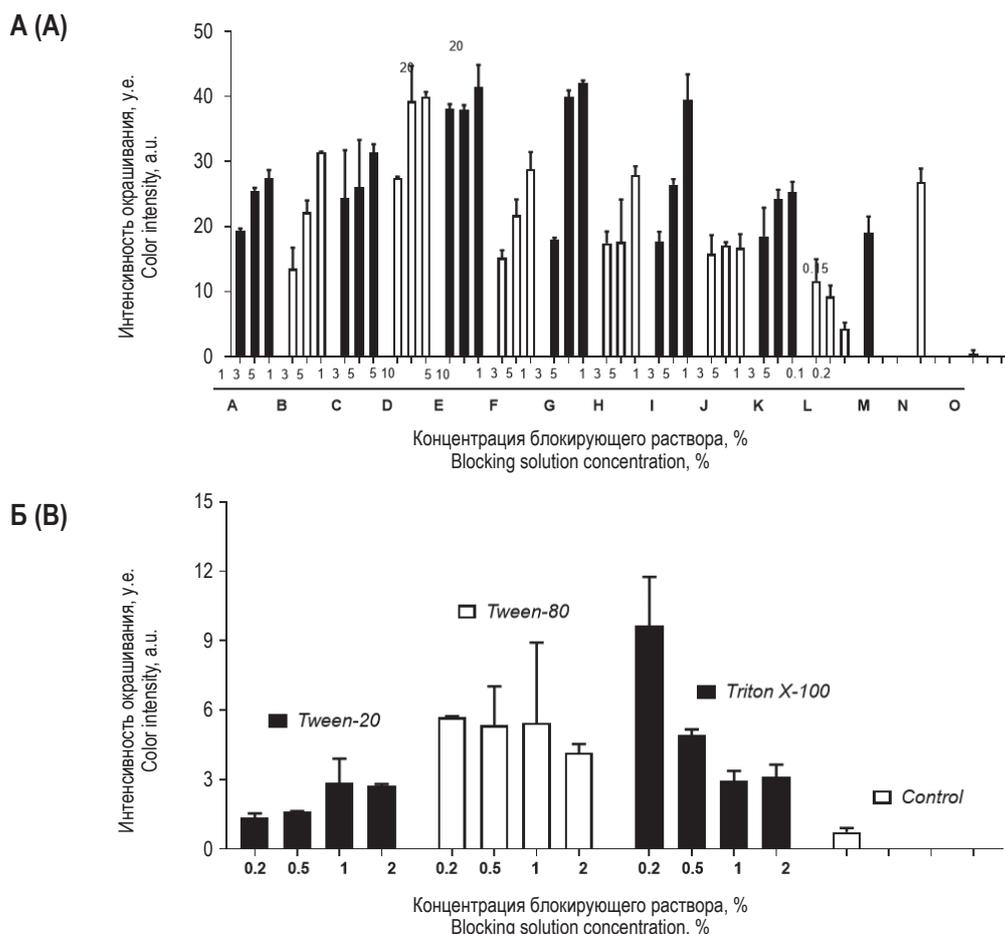
Дальнейшие исследования были направлены на оптимизацию процедуры иммунофльтрационного анализа. В качестве аналитических образцов использовали образцы пултированных отрицательных и положительных сывороток. Были оптимизированы следующие параметры:

1) Оптимальным разведением конъюгата пероксидазы хрена с моноклональными антителами против IgG человека является разведение 1/200 (рис. 3А);

2) Оптимальным количеством антигена S-белка коронавируса, сорбируемого на поверхности нитроцеллюлозной мембраны, является 0,25 мг/мл (рис. 3Б);

3) Оптимальный объем исследуемого образца сыворотки крови – 100 мкл (рис. 3В).

В оптимизированных условиях был проведен иммунофльтрационный анализ количества антител против S-белка коронавируса в сыворотке крови. Для построения калибровочной кривой использовали 10-кратные разведения пула положительных сывороток крови с высоким титром



**Рисунок 2. Оптимизация состава блокирующего буфера для иммунофилтративного анализа с использованием пероксидазы хрена**

**Примечание.** А – скрининг блокирующих растворов методом дот-иммуноанализа. Б – оптимизация состава блокирующего раствора на основе детергентов. Обозначение блокирующих растворов: А – бычий сывороточный альбумин (БСА); В – казеин (каз); С – желатин из кожи холодноводных рыб; D – сыворотка крови кролика; E – сыворотка крови лошади; F – поливинилпирролидон; G-полиэтиленгликоль 30000; H – Поли(2-этил-2-оксазолин); I – декстран70; J – трегалоза; K – фиколл 400; L – твин20; M – каз 1%+БСА 1%; N – каз 3% + БСА 1%; O – контроль; n = 2, среднее значение ± стандартное отклонение.

Figure 2. Optimization of the composition of the blocking buffer for immunofiltration assay using horseradish peroxidase

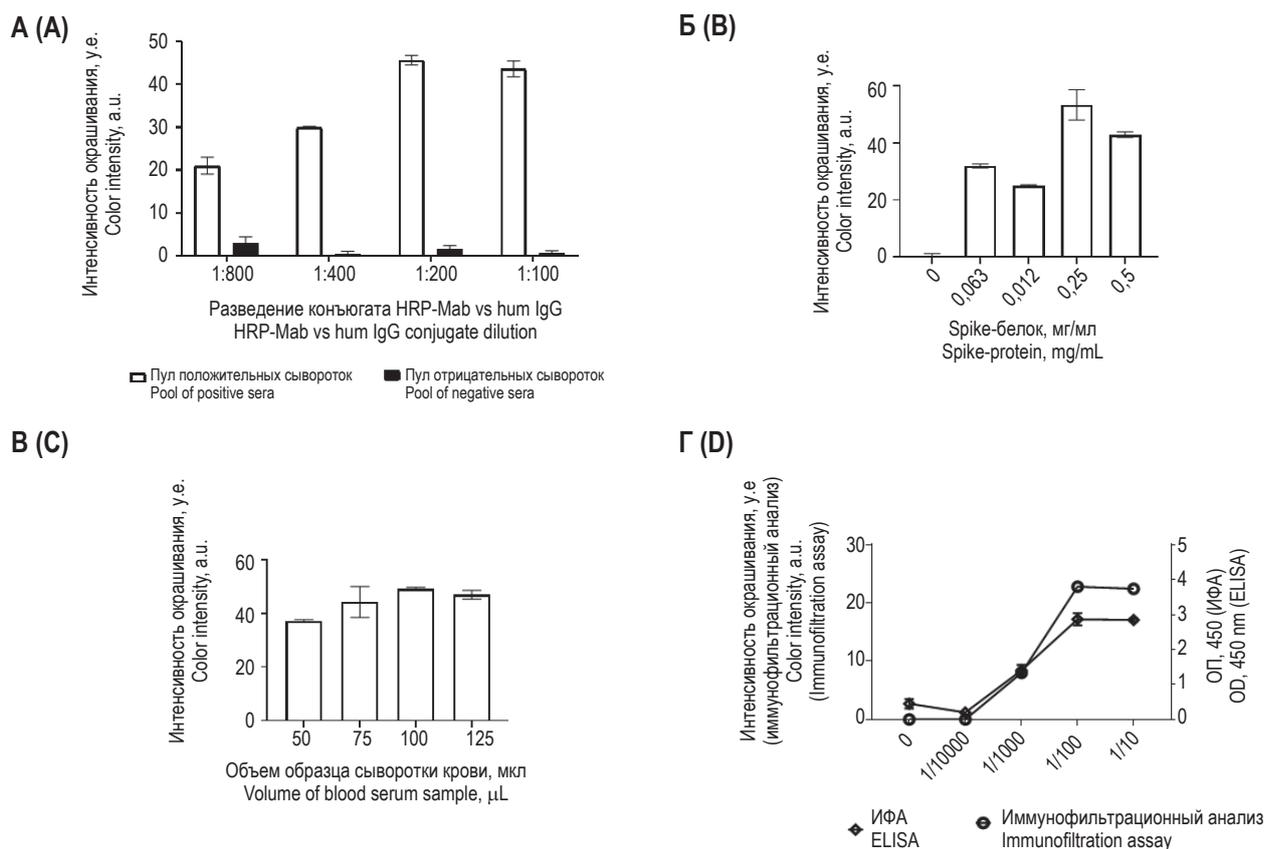
Note. (A) Screening of blocking solutions by dot-immunoassay. (B) Optimization of the composition of the blocking solution based on detergents.

Designation of blocking solutions: A, bovine serum albumin (BSA); B, casein (kaz); C, gelatin from the skin of cold water fish; D, rabbit blood serum; E, horse blood serum; F, polyvinylpyrrolidone; G, polyethylene glycol 30000; H, Poly(2-ethyl-2-oxazoline); I, dextran70; J, trehalose; K, ficoll 400; L, twin20; M, kaz 1%+BSA 1%; N, kaz 3% + BSA 1%; O, control; n = 2, mean ± standard deviation.

антител против S-белка коронавируса (от 1/10 до 1/10000) и пул отрицательных сывороток крови (разведение 1/10) (рис. 3Г). Определено, что с помощью иммунофилтративного анализа возможно определение антител против S-белка коронавируса в разведении образца сыворотки более чем 1/1000. Дополнительно была построена калибровочная кривая для определения антител против S-белка в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Из графика на рисунке 3Г видно, что результаты иммунофилтративного анализа соответствуют результатам ИФА.

## Заключение

Таким образом, была оптимизирована модель тест-системы в формате иммунофилтративного анализа для определения антител к SARS-CoV-2 с использованием ферментной метки – пероксидазы хрена. Альтернативой традиционным диагностическим реагентам на основе ферментной метки пероксидазы хрена могут стать биоконъюгаты на основе нанозимов берлинской лазури [6, 9]. Однако в таких исследованиях неизбежностью является сравнение



**Рисунок 3. Оптимизация иммунофильтрационного анализа для определения антител против S-белка коронавируса**

**Примечание.** А – влияние разведения конъюгата пероксидазы хрена на результат иммунофильтрационного анализа. Б – влияние количества сорбированного S-белка на нитроцеллюлозной мембране на результат иммунофильтрационного анализа. В – влияние вносимого объема образца сыворотки крови на результат иммунофильтрационного анализа. Г – сравнение калибровочных кривых антител против S-белка в сыворотке крови, полученных методами иммунофильтрационного и иммуноферментного анализов; n = 2, среднее значение ± стандартное отклонение

Figure 3. Optimization of the immunofiltration assay for the detection of antibodies against the coronavirus S-protein

Note. (A) Influence of horseradish peroxidase conjugate dilution on the result of immunofiltration assay. (B) Influence of the amount of adsorbed S-protein on the nitrocellulose membrane on the result of immunofiltration assay. (C) Influence of the introduced volume of the blood serum sample on the result of immunofiltration assay. (D) Comparison of calibration curves of anti-S-protein antibodies in blood serum obtained by immunofiltration and enzyme immunoassay methods; n = 2, mean ± standard deviation.

диагностикумов на основе экспериментальных меток с традиционными. Соответственно, полученные данные также можно использовать в исследованиях по конструированию иммунофильтрационных анализов с использованием синтетических аналогов пероксидазы хрена –

наноматериалов с пероксидазоподобной активностью. Результаты данной научной работы также могут служить основой для разработки колориметрических тест-систем в формате иммунофильтрации для оценки уровня антител к разнообразным мишеням.

## Список литературы / References

- Adil B., Shankar K.M., Naveen Kumar B.T., Patil R., Ballyaya A., Ramesh K.S., Poojary S.R., Byadgi O.V., Siriappagounder P. Development and standardization of a monoclonal antibody-based rapid flow-through immunoassay for the detection of *Aphanomyces invadans* in the field. *J. Vet. Sci.*, 2013, Vol. 14, no. 4. pp. 413-419.
- Castro A.R., Mody H.C., Parab S.Y., Patel M.T., Kikkert S.E., Park M.M., Ballard R.C. An immunofiltration device for the simultaneous detection of non-treponemal and treponemal antibodies in patients with syphilis. *STI*, 2010, Vol. 86, no. 7, pp. 532-536.
- Ernst E., Wolfe P., Stahura C., Edwards K.A. Technical considerations to development of serological tests for SARS-CoV-2. *Talanta*, 2021, Vol. 224, 121883. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121883.

4. Kalita P., Chaturvedula L.M., Sritharan V., Gupta S. *In vitro* flow-through assay for rapid detection of endotoxin in human sera: A proof-of-concept. *Nanomedicine*, 2017. Vol. 13, no. 4. pp. 1483-1490.
5. Khrantsov P., Bochkova M., Timganova V., Zamorina S., Rayev M. Dot immunoassay for the simultaneous determination of postvaccination immunity against pertussis, diphtheria, and tetanus. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, Vol. 409, pp. 3831-3842.
6. Komkova M.A., Vetoshev K.R., Andreev E.A., Karyakin A.A. Flow-electrochemical synthesis of Prussian Blue based nanozyme 'artificial peroxidase'. *Dalton Transact.*, 2021, Vol. 50, no. 133, pp. 11385-11389.
7. Li M., He Yif., Meng H., Dong Y., Shang Y., Liu H., Qu Z., Liu Y. Multiple effects of sodium dodecyl sulfate on chromogenic catalysis of tetramethyl benzidine with horseradish peroxidase. *J. Dispers. Sci.*, 2019, Vol. 45, no. 3. pp. 1409-1416.
8. Oishee M.J., Ali T., Jahan N., Khandker S.S., Haq M.A., Khondoker M.U., Sil B.K., Lugova H., Krishnapillai A., Abubakar A.R., Kumar S., Haque, M. Jamiruddin, M.R. Adnan, N. Covid-19 pandemic: Review of contemporary and forthcoming detection tools. *Infect. Drug Resist.*, 2021, Vol. 14, pp. 1049-1082.
9. Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. The steadfast Au@Pt soldier: Peroxide-tolerant nanozyme for signal enhancement in lateral flow immunoassay of peroxidase-containing samples. *Talanta*, 2021, Vol. 225, 121961. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121961.
10. Pérez-López B., Mir M. Commercialized diagnostic technologies to combat SARS-CoV2: Advantages and disadvantages. *Talanta*, 2021, Vol. 225, 121898. doi:10.1016/j.talanta.2020.121898.
11. Robertson L.J., Moore J.S., Blighe K., Ng K.Y., Quinn N., Jennings F., Warnock G., Sharpe P., Clark M., Maguire K., Rainey S., Price R.K., Burns W.P., Kowalczyk A.M., Awuah A., McNamee S.E., Wallace G.E., Hunter D., Sager S., Chao Shern C., Nesbit M.A., McLaughlin J.A.D., Moore T. Evaluation of the IgG antibody response to SARS CoV-2 infection and performance of a lateral flow immunoassay: cross-sectional and longitudinal analysis over 11 months. *BMJ Open*, 2021, Vol. 11, no. 6, 048142. doi: 10.1136/bmjopen-2020-048142.
12. Ross G.M.S., Filippini D., Nielen M.W.F., Salentijn G.I.J. Unraveling the Hook Effect: A Comprehensive Study of High Antigen Concentration Effects in Sandwich Lateral Flow Immunoassays. *Anal. Chem.*, 2020, Vol. 92, no. 23, pp. 15587-15595.
13. Ross G.M.S., Salentijn G.I., Nielen M.W.F. A critical comparison between flow-through and lateral flow immunoassay formats for visual and smartphone-based multiplex allergen detection. *Biosensors (Basel)*, 2019, Vol. 9, no. 4, 143. doi:10.3390/bios9040143.
14. Tsang V., Greene R.M., Pilcher J.B. Optimization of the covalent conjugating procedure (NaIO<sub>4</sub>) of horseradish peroxidase to antibodies for use in enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunoass.*, 1995, Vol. 16, no. 4. pp 395-418.
15. Vandenberg O., Martiny D., Rochas O., van Belkum A., Kozlakidis Z. Considerations for diagnostic COVID-19 tests. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2021, Vol. 19, no. 3, pp. 171-183.

**Авторы:**

**Кропанева М.Д.** — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и биотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

**Храмцов П.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и биотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

**Бочкова М.С.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и биотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

**Раев М.Б.** — д.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии и биотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

**Authors:**

**Kropaneva M.D.**, PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Cell Immunology and Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, a branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Khrantsov P.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cell Immunology and Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, a branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Bochkova M.S.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Immunology and Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, a branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Rayev M.B.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Cell Immunology and Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, a branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

# ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ТЕТРАПЕПТИДА ACETYL-(D-LYS)-LYS-ARG-ARG-AMIDE НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС WISTAR НА МОДЕЛИ ПАССИВНОГО ТАБАКОКУРЕНИЯ

Кузьмичева Н.А., Михайлова И.В., Смолягин А.И., Филиппова Ю.В.,  
Лившиц Н.М., Мирошниченко И.В.

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

**Резюме.** Особое место среди биорегуляторов иммунной системы занимают тетрапептиды – гомологи фрагмента АКТГ<sub>15-18</sub>, обладающие церебропротекторными, нейропротекторными и антиоксидантными свойствами. Вместе с тем исследования практически не коснулись оценки иммуотропных свойств тетрапептидов на моделях воздействия ксенобиотиков, что делает актуальным исследования в данном аспекте. В работе была проведена оценка влияния тетрапептида Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (лабораторный шифр КК1) на иммунологические и биохимические параметры 72 самок крыс Wistar при их пассивном табакокурении. Опытные крысы подвергались фумигации табачным дымом по 8 часов. Синтетический пептид КК1 вводили интраназально в дозе 40 мкг/кг/сут пятикратно через день в течение 10 дней. Установлено, что котинин детектировался только в сыворотке крови крыс опытных групп, что подтверждает воздействие табачного дыма на организм экспериментальных животных. Показано, что изучаемый тетрапептид способствует тенденции к нормализации ряда иммунологических параметров у экспериментальных животных, подвергнутых пассивному табакокурению, которая выражалась в увеличении массы тимуса и количества спленоцитов и снижении ЦИК по отношению к параметрам курящих крыс группы. Выявлено, что пассивное табакокурение крыс сопровождалось общей тенденцией к кумуляции железа, свинца и никеля в периферической крови. Отмечено более выраженное увеличение концентрации кадмия, свинца и кобальта у крыс опытной группы по сравнению с содержанием данных микроэлементов в печени куривших животных, которым вводили тетрапептид КК1. В основе выявленных сдвигов иммунологических показателей может лежать, с одной стороны, гематотоксическое действие экотоксикантов, при котором в наибольшей степени страдает лимфоидная линия клеток, вызывая гипоплазию центральных и периферических

## Адрес для переписки:

Кузьмичева Наталья Александровна  
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ  
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Советская, 6.  
Тел.: 8 (987) 847-52-55.  
E-mail: kuzmichevanatalia85@gmail.com

## Address for correspondence:

Natalia A. Kuzmicheva  
Orenburg State Medical University  
6 Sovetskaya St  
Orenburg  
460000, Russian Federation  
Phone: +7 (987) 847-52-55.  
E-mail: kuzmichevanatalia85@gmail.com

## Образец цитирования:

Н.А. Кузьмичева, И.В. Михайлова, А.И. Смолягин, Ю.В. Филиппова, Н.М. Лившиц, И.В. Мирошниченко «Оценка влияния тетрапептида Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide на иммунологические и биохимические показатели крыс Wistar на модели пассивного табакокурения» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 321-328.  
doi: 10.46235/1028-7221-10008-EOT

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

## For citation:

N.A. Kuzmicheva, I.V. Mikhailova, Yu.V. Filippova, A.I. Smolyagin, N.M. Livshits, I.V. Miroshnichenko "Effect of tetrapeptide Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide on immunological and biochemical parameters of Wistar rats using passive smoking models", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 321-328.  
doi: 10.46235/1028-7221-10008-EOT

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

DOI: 10.46235/1028-7221-10008-EOT

органов иммунитета. Видимый признак такого явления – уменьшение клеточности в органах кровотока и лимфоидных органах, что установлено в настоящей работе. С другой стороны, компоненты табачного дыма, действуя прооксидантно, могут нарушать клеточный окислительно-восстановительный гомеостаз, вызывая повреждение клеточных мембран, приводя в итоге к некрозу или апоптозу, что объясняет выявленное уменьшение количества тимоцитов, спленокариоцитов и снижение веса органов. Таким образом, полученные результаты позволяют использовать экспериментальную модель пассивного табакокурения для оценки эффективности тетрапептидов. Введение тетрапептида Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide пассивно курившим крысам способствует тенденции к нормализации массы тимуса и селезенки, числа тимоцитов и спленоцитов, снижению ЦИК. Целесообразным является дальнейшее изучение механизмов действия тетрапептидов на иммунную систему.

*Ключевые слова:* крысы, пассивное табакокурение, иммунологические показатели, биохимические показатели, синтетический тетрапептид КК1

## **EFFECT OF TETRAPEPTIDE ACETYL-(D-LYS)-LYS-ARG-ARG-AMIDE ON IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF WISTAR RATS USING PASSIVE SMOKING MODELS**

**Kuzmicheva N.A., Mikhailova I.V., Filippova Yu.V., Smolyagin A.I., Livshits N.M., Miroshnichenko I.V.**

*Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation*

**Abstract.** Tetrapeptides, the homologues of adrenocorticotropic hormone fragment (15–18), play a special role among the bioregulators of the immune system. These compounds have cerebroprotective, neuroprotective and antioxidant properties. However, no available studies concerned the immunotropic properties of tetrapeptides in the models with exposure to xenobiotics, thus making such research quite relevant. Our study concerned the effects of tetrapeptide Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (laboratory code KK1) on the immunological and biochemical parameters of 72 female Wistar rats exposed to passive smoking. The experimental animals were fumigated with tobacco smoke for 8 hours. Synthetic peptide KK1 was administered intranasally at a dose of 40 µg/kg/day five times a day for 10 days. Cotinine was detected only in blood serum of rats from experimental groups, thus confirming a contribution of this tetrapeptide to the trend for normalization of some immunological parameters in experimental animals subjected to passive tobacco smoking, expressed as an increase in thymus mass and the number of splenocytes, and a decrease in the circulating immune complexes compared to the parameters of smoking rats of the group. We revealed that passive tobacco smoking in rats was accompanied by a general tendency to accumulation of iron, lead and nickel in peripheral blood. There was a marked increase in the concentration of cadmium, lead and cobalt in rats of the experimental group compared with the content of these trace elements in the liver of smoking animals injected with tetrapeptide KK1. The revealed shifts in immunological indices may be based, firstly, on hepatotoxic effect of ecotoxicants, The lymphoid lineage is mostly affected thus causing hypoplasia of the central and peripheral immunity organs. An evident sign of such pathology is a decreased cellularity of hematopoietic and lymphoid organs found in the present study. Secondly, the tobacco smoke components with prooxidant action may disrupt cellular redox homeostasis, causing damage to cell membranes, resulting in necrosis or apoptosis, thus explaining the revealed decrease in the number of thymocytes, splenic karyocytes and a decrease in the weight of organs. Thus, our results suggest usage of experimental passive smoking in order to evaluate efficiency of the tetrapeptides. Administration of Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide peptide to the passively smoking rats is associated with tendency to normalize the mass of the thymus and spleen, the number of thymocytes and splenocytes, and a decrease in circulating immune complexes. Further studies are required to elucidate the effects of tetrapeptides upon the immune system.

*Keywords:* rats, second-hand smoke, immunological parameters, biochemical parameters, synthetic KK1 peptide

## Введение

В настоящее время гуморальные регуляторные факторы иммунной системы, действующие как местно, так и на системном уровне, находятся в центре внимания как потенциальные лекарственные препараты. Особое место среди биорегуляторов иммунной системы занимают низкомолекулярные медиаторы полипептидной природы – пептидные гомологи первичной аминокислотной последовательности фрагмента адренокортикотропного гормона (АКТГ)<sub>15-18</sub> (Lys-Lys-Arg-Arg), в которых одна или две природных аминокислоты заменены на соответствующий D-стереомер. Продемонстрированные в ряде работ их церебропротекторные и нейропротекторные свойства [3, 4] и антиоксидантный эффект [5, 6, 10] характеризуют данные пептидные соединения как перспективные стресспротекторные средства. В то же время исследования практически не коснулись оценки иммунотропных свойств данных тетрапептидов на моделях воздействия ксенобиотиков. Известно, что одним из наиболее часто встречающихся неблагоприятных воздействий окружающей среды на организм является табакокурение. Отрицательное действие пассивного курения на различные системы организма выявлено у экспериментальных животных [8]. В связи с этим, представляет интерес исследование влияния пептидных гомологов первичной аминокислотной последовательности фрагмента АКТГ<sub>15-18</sub>, в первую очередь на иммунную систему, используя модель пассивного табакокурения.

**Целью настоящего исследования** явилась оценка эффективности воздействия тетрапептида Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide на иммунологические и биохимические параметры самок крыс Wistar при пассивном табакокурении.

## Материалы и методы

Экспериментальные исследования были выполнены на 72 самках крыс линии Wistar половозрелого возраста массой 160-200 г. Животных содержали на стандартном пищевом рационе без ограничения доступа к воде. Пептидный гомолог фрагмента АКТГ<sub>15-18</sub> (Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide, лабораторный шифр КК1) синтезирован в ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России и любезно предоставлен членом-корреспондентом РАН, профессором А.С. Симбирцевым. Животные были разделены на 4 группы: 1-я группа – 26 контрольных самок, 2-я группа – 8 крыс, получавших пептид КК1, 3-я группа – 16 крыс, подвергавшихся пассивному табакокурению, 4-я группа – 10 куривших крыс, получавших пептид КК1. Животным 2-й и 4-й групп вводили тетрапептид КК1 интраназально в виде водного рас-

твора в дозе 40 мкг/кг, через день, 1 раз в сутки на протяжении 10 дней. Крысам 1-й и 3-й групп вводили интраназально физиологический раствор в равных объемах с остальными группами. Опытные крысы 3-й, 4-й группы подвергались фумигации табачным дымом по 8 часов ежедневно в течение 20 дней. Контрольные крысы в аналогичный период помещались в камеру, вентилируемую атмосферным воздухом без табачного дыма. Животные содержались в стандартных условиях, при двенадцатичасовом световом режиме и свободном доступе к воде и корму. Эвтаназию осуществляли дислокацией шейных позвонков под эфирным наркозом.

Для оценки степени воздействия табачного дыма определяли уровень котинина в сыворотке крови крыс методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором на хроматографе Agilent 5977GC/MSD. Идентификацию веществ проводили по библиотекам масс-спектров (NIST 20) MPW5e (DD2019) EKBDRUGS (MS LIBRARY EKBDRUGS) SUDMED MASS SPECTRA (SUDMED MS) Cann\_Metab Pub\_sav50. В исследуемых объектах идентифицировали пики с временами удерживания следующих веществ: дифениламин внутренний стандарт – 5,36 мин, котинин – 5,69 мин. Полуколичественный расчет концентрации котинина в пробах выполняли по фактору отклика внутреннего стандарта – дифениламина.

Массу крыс, тимуса и селезенки, количество лейкоцитов, тимоцитов, спленоцитов, миелокариоцитов, циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определяли в соответствии с лабораторными методами исследования экспериментальных животных [2]. Продукцию цитокинов IL-6 и IFN $\gamma$  исследовали в супернатантах культур спленоцитов после 48-часовой инкубации клеток при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в полной культуральной среде (RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамин и 80 мкг/мл гентамицина). Оценивали спонтанную и индуцированную конканавалином А (Кон А) в конечной концентрации 10 мкг/мл секрецию спленоцитами IL-6 и IFN $\gamma$ . Определение концентрации цитокинов в супернатантах проводили с использованием иммуноферментных тест-систем (IFN gamma Rat ELISA Kit, США, IL-6 Rat ELISA Kit, США). Активность ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) определяли в сыворотке крови на автоматическом биохимическом анализаторе BioSystems А-25 (Испания) с помощью наборов Bio Systems (Испания). Для изучения элементного статуса организма животных в качестве биосубстратов использовали периферическую кровь

и образцы печеночной ткани. В образцах определяли Cu, Zn, Fe, Mn, Cd, Pb, Ni, Co, Cr методом атомно-абсорбционный спектрометрии на приборе «Квант-2А» (ООО «КОРТЭК», Россия).

Эксперименты были проведены с учетом этических норм и рекомендаций по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей» (Страсбург, 1998); приказом МЗ РФ N267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). Группы сравнивали с помощью U-критерия Манна-Уитни с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows v. 6.0, StatSoft Inc. (США). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В качестве биомаркера пассивного табакокурения, отражающего уровень воздействия курения на организм, в сыворотке крови был определен уровень котинина, основного метаболита никотина *in vivo*. Так, у крыс опытных групп уровень котинина составил 17 (9-25) нг/мл, что подтверждает воздействие табачного дыма на организм экспериментальных животных. У животных 1-й и 2-й контрольных групп котинин не детектировался.

При одинаковом содержании и питании животных средняя масса крыс была достоверно снижена у животных 3-й группы (160 (157-165) г) и 4-й группы (177 (174-185) г) по сравнению с аналогичным параметром контрольной группы (200 (191-205) г). Анализ периферической крови крыс показал отсутствие выраженных изменений числа лейкоцитов и лейкоцитарной формулы у всех исследуемых групп животных.

В таблице 1 представлены иммунологические параметры пассивно куривших крыс Wistar, получавших тетрапептид КК1. Как видно из данных таблицы 1, пассивное курение крыс 3 опытной группы приводило к негативному эффекту, выражающемуся в снижении массы тимуса и селезенки, а также количества тимоцитов, спленоцитов и миелокариоцитов и напротив, увеличении ЦИК. Введение пептида КК1 некурившим крысам 2-й группы способствовало увеличению массы тимуса у крыс 2-й группы. Важно отметить, что аналогичное введение КК1 пассивно курившим крысам 4-й группы способствовало восстановлению иммунологических параметров, которое выражалось в увеличении массы тимуса и количества спленоцитов и, напротив, снижении ЦИК

по отношению к параметрам курящих крыс 3-й группы.

Оценивая фагоцитарные параметры, необходимо отметить снижение фагоцитарного показателя и фагоцитарного индекса у животных 3-й опытной группы по сравнению с параметрами контрольной группы. Введение иммуномодулятора КК1 некурившим крысам достоверно не изменяло данные параметры. При введении КК1 пассивно курившим крысам сохранялось значимое снижение фагоцитарного показателя, тогда как фагоцитарный индекс имел тенденцию к нормализации.

Анализ количества  $IFN\gamma$ , продуцируемого спленоцитами, выявил угнетение спонтанной и индуцированной продукции  $IFN\gamma$  у пассивно куривших крыс 3-й группы по сравнению с аналогичным показателем у контрольных крыс. Важно отметить, что интенсивность спонтанной и индуцированной продукции  $IFN\gamma$  у куривших крыс, получавших КК1, статистически значимо не отличалась от контрольной группы. Анализ индуцированной продукции IL-6 спленоцитами показал снижение данного показателя у опытных животных 3-й группы. Вместе с тем введение КК1 пассивно курившим крысам способствовало нормализации данного показателя до уровня контрольной группы. Введение пептида КК1 контрольным животным 2-й группы значимого влияния на спонтанную и индуцированную продукцию цитокинов  $IFN\gamma$  и IL-6 не оказывало. Полученные данные показывают, что спонтанная и индуцированная секреция клетками селезенки  $IFN\gamma$  при воздействии пассивного табакокурения снижается.

Биохимический анализ активности АЛТ и АСТ показал отсутствие значимых изменений данных показателей у животных всех исследуемых групп. Вместе с тем необходимо отметить тенденцию к повышению активности АЛТ в 1,4 раза (119,7 (111,3-136,7) ед/л) и АСТ в 1,1 раза (251,0 (223,7-265,3) ед/л) у животных опытной группы, по сравнению с аналогичными параметрами контрольной группы (81,2 (77,5-85,9) ед/л и 228,0 (218,0-246,6) ед/л соответственно), что может служить маркером развития патологии печени у животных, подвигавшихся воздействию пассивного табакокурения.

Учитывая данные литературы о том, что изменение уровня отдельных микроэлементов влияет на иммунологические параметры [1, 7], представляло интерес исследование уровня микроэлементов в крови и печени крыс для выяснения их участия в механизмах, лежащих в основе изменений иммунологических показателей. Установлено, что введение тетрапептида КК1 существенно не изменяло уровень исследуемых микроэлементов

**ТАБЛИЦА 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПАССИВНО КУРИВШИХ КРЫС WISTAR, ПОЛУЧАВШИХ ПЕПТИД КК1, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

TABLE 1. IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF PASSIVELY SMOKING WISTAR RATS GIVEN PEPTIDE KK1, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

	<b>1-я группа</b> Group 1 n = 26	<b>2-я группа</b> Group 2 n = 8	<b>3-я группа</b> Group 3 n = 16	<b>4-я группа</b> Group 4 n = 10
<b>Лейкоциты, × 10<sup>9</sup></b> White blood cells, × 10 <sup>9</sup>	5,4 (4,3-7,9)	5,8 (5,3-6,5)	5,8 (5,0-6,3)	5,2 (4,7-6,4)
<b>Масса тимуса, мг</b> Thymus, weight, mg	231 (212-283)	280* (255-297)	123* (120-147)	180** (156-191)
<b>Число тимоцитов, × 10<sup>6</sup>/орган</b> Number of thymocyte, × 10 <sup>6</sup> /organ	352 (320-386)	340 (320-376)	209* (161-219)	225* (161-219)
<b>Масса селезенки, мг</b> Spleen, weight, mg	444 (382-501)	486 (443-523)	317* (305-328)	352* (321-377)
<b>Число кариоцитов, × 10<sup>6</sup>/орган</b> Number of karyocytes, × 10 <sup>6</sup> /organ	496 (413-560)	426 (382-465)	251* (209-284)	320** (315-345)
<b>Число миелокариоцитов, × 10<sup>6</sup>/орган</b> Number of myelocaryocytes, × 10 <sup>6</sup> /organ	88 (78-101)	79 (67-90)	58* (48-70)	62* (58-69)
<b>ФП</b> Phagocytic parameter	38 (32-41)	32 (21-37)	27* (18-32)	30* (28-32)
<b>ФИ</b> Phagocytic index	5,8 (5,0-6,1)	5,4 (4,7-6,1)	4,1* (3,4-5,3)	4,9 (3,9-5,4)
<b>ЦИК, у. е.</b> CIC, c. u.	70 (66-71)	80 (78-84)	96* (90-103)	74** (68-79)
<b>IFN<math>\gamma</math> (спонтанная), пг/мл</b> IFN $\gamma$ , pg/mL	30 (29-31)	28 (28-29)	21* (21-22)	26 (23-28)
<b>IFN<math>\gamma</math> (КонА), пг/мл</b> IFN $\gamma$ -induced ConA, pg/mL	67 (66-68)	64 (64-66)	45* (43-48)	52 (52-54)
<b>IL-6 (спонтанная), пг/мл</b> IL-6, pg/mL	83 (76-94)	80 (75-83)	73 (69-75)	92 (87-96)
<b>IL-6 (КонА), пг/мл</b> IL-6-induced ConA, pg/mL	137 (118-141)	128 (115-136)	105* (93-117)	120 (115-129)

Примечание. \* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) с показателями 1-й контрольной группы, \*\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) показателей 3-й и 4-й групп, n – число животных в группе.

Note. \*, significant differences ( $p < 0.05$ ) with the control group 1; \*\*, significant differences ( $p < 0.05$ ) of groups 3 and 4; n, population number.

в периферической крови и печени экспериментальных животных 1-й и 2-й групп. Вместе с тем выявлено, что пассивное табакокурение крыс 3-й и 4-й групп сопровождалось общей тенденцией к кумуляции железа, свинца и никеля в периферической крови (табл. 2). Микроэлементный состав печени крыс 3-й и 4-й опытных групп характеризовался увеличением концентрации железа, кадмия, свинца, кобальта, и напротив, снижением уровня цинка. Важно отметить более выраженное увеличение концентрации кадмия, свинца и кобальта у крыс 3-й опытной группы по сравнению с содержанием данных микроэлементов в печени куривших животных, которым вводили тетрапептид КК1. Установленные изменения могут быть связаны с синергическими (железо и ни-

кель) и антагонистическими (цинк и медь, железо, хром) взаимодействиями микроэлементов [9].

Обсуждая полученные результаты, необходимо отметить, что в основе сдвигов параметров иммунной системы, выявленных в данной работе, может лежать ряд возможных причин. С одной стороны, известно, что один из компонентов табачного дыма – бензол оказывает выраженное гематотоксическое действие, при этом в наибольшей степени страдает лимфоидная линия клеток, так как полигидроокисленные метаболиты бензола аккумулируются в костном мозге и лимфоидных органах, вызывая гипоплазию центральных и периферических органов иммунитета. Видимый признак такого явления – это уменьшение клеточности в органах кроветворения и лимфоидных органах (селезенка, ти-

**ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В КРОВИ И ПЕЧЕНИ ПАССИВНО КУРИВШИХ КРЫС WISTAR, ПОЛУЧАВШИХ ПЕПТИД КК1, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

TABLE 2. LEVEL OF ELEMENTS IN THE BLOOD AND LIVER OF PASSIVELY SMOKING WISTAR RATS GIVEN PEPTIDE KK1, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

	Cu	Zn	Fe	Mn	Cd	Pb	Ni	Co	Cr
<b>Кровь</b> Blood									
<b>1-я гр.</b> gr. 1 n = 8	1,2 (1,1-1,4)	5,1 (4,4-5,4)	271,0 (247-286)	0,14 (0,13-0,16)	0,00 (0-0)	0,011 (0,002-0,020)	0,020 (0,02-0,03)	0,000 (0,000-0,006)	0,17 (0,12-0,18)
<b>2-я гр.</b> gr. 2 n = 8	1,0 (0,8-1,2)	5,6 (5,1-6,0)	294,5 (282-326)	0,12 (0,10-0,15)	0,00 (0,000-0,005)	0,010 (0,00-0,01)	0,022 (0,01-0,04)	0,000 (0,000-0,002)	0,17 (0,14-0,20)
<b>3-я гр.</b> gr. 3 n = 8	1,4 (1,4-1,5)	4,9 (4,5-5,6)	362,0* (319-414)	0,13 (0,09-0,18)	0,00 (0,000-0,008)	0,030* (0,02-0,04)	0,080* (0,06-0,10)	0,006 (0,000-0,008)	0,20 (0,16-0,25)
<b>4-я гр.</b> gr. 4 n = 8	1,35 (1,3-1,5)	5,6 (5,3-5,9)	403,0* (327-442)	0,18 (0,11-0,21)	0,000 (0,000-0,002)	0,025* (0,02-0,04)	0,120* (0,06-0,13)	0,003 (0,000-0,005)	0,25 (0,21-0,26)
<b>Печень</b> Liver									
<b>1-я гр.</b> gr. 1 n = 8	3,5 (3,5-3,6)	32,2 (29,4-35,6)	126,9 (123-130)	1,80 (1,70-1,85)	0,008 (0,006-0,008)	0,080 (0,07-0,10)	0,125 (0,085-0,283)	0,007 (0,006-0,007)	0,185 (0,16-0,21)
<b>2-я гр.</b> gr. 2 n = 8	3,6 (3,4-3,8)	35,8 (34,0-38,5)	134,1 (128-137)	1,65 (1,40-1,82)	0,007 (0,005-0,009)	0,095 (0,08-0,10)	0,130 (0,10-0,16)	0,0070 (0,006-0,008)	0,190 (0,16-0,20)
<b>3-я гр.</b> gr. 3 n = 8	3,8 (3,7-4,0)	27,5* (26,1-28,6)	153,5 (131-169)	2,00 (1,90-2,22)	0,013* (0,010-0,014)	0,150* (0,12-0,17)	0,195 (0,18-0,22)	0,0080* (0,008-0,009)	0,225 (0,19-0,24)
<b>4 гр.</b> gr. 4 n = 8	3,7 (3,5-3,9)	36,1 (30,7-37,5)	157,3* (146-163)	2,00 (1,88-2,10)	0,009 (0,010-0,013)	0,120* (0,090-0,145)	0,195 (0,17-0,23)	0,0070 (0,006-0,008)	0,265 (0,23-0,31)

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

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

мус) [13], что установлено в настоящей работе. Наряду с этим, снижение количества тимоцитов может быть обусловлено их миграцией из коркового вещества сначала в мозговое вещество, а затем в кровоток. С другой стороны, содержащиеся в табачном дыме кадмий, хром и железо, действуя проокислительно, могут нарушать клеточный окислительно-восстановительный гомеостаз, вызывая необратимые повреждения ДНК или РНК [11, 14] и перекисное окисление липидов полиненасыщенных жирных кислот, вызывая повреждение клеточных мембран [12], приводя в итоге к некрозу или апоптозу, что объясняет выявленное уменьшение количества тимоцитов, спленокариоцитов и снижение веса органов. В основе нормализующего действия олигопептидов-гомологов фрагмента (АКТГ)<sub>15-18</sub> может

лежать показанное в ряде работ выраженное антиоксидантное и стресспротекторное действие, приводящее к снижению токсического действия экотоксикантов [3, 5].

## Заключение

Таким образом, полученные результаты позволяют использовать экспериментальную модель пассивного табакокурения для оценки эффективности тетрапептидов. Введение тетрапептида Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide пассивно курившим крысам способствует тенденции к нормализации массы тимуса и селезенки, числа тимоцитов и спленоцитов, снижению ЦИК. Целесообразным является дальнейшее изучение механизмов действия тетрапептидов на иммунную систему.

## Список литературы / References

1. Агаджанян Н.А., Скальный А.В., Детков В.Ю. Элементный портрет человека: заболеваемость, демография и проблема управления здоровьем нации // Экология человека, 2013. Т. 20, № 11. С. 3-12. [Agadzhanyan N.A., Skalny A.V., Detkov V.Yu. Human elemental portrait: morbidity, demography and problem of nation health management. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2013, Vol. 20, no. 11, pp. 3-12. (In Russ.)]
2. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск, 2000. 167 с. [Volchegorsky I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L. Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions of the body]. Chelyabinsk, 2000. 167 p.
3. Дейко Р.Д., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А., Ходаковский А.А., Черешнюк И.Л. Влияние потенциального нейропротектора Acetyl-(D-Lys)-Lys-Arg-Arg-amide (КК-1) на нейродеструкцию и нейроапоптоз у крыс при остром нарушении мозгового кровообращения // Вестник фармации, 2016. № 1 (71). С. 96-102. [Deiko R.D., Shtrygol S.Yu., Kolobov A.A., Khodakovskiy O.A., Chereszniuk I.L. The influence of new neuroprotector acetyl-(d-lys)-lys-arg-arg-amide (KK-1) on neurodestruction and neuroapoptosis of rats in conditions of acute stroke. *Vestnik farmatsii = Bulletin of Pharmacy*, 2016, no. 1 (71), pp. 96-102. (In Russ.)]
4. Дейко Р.Д., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А., Симбирцев А.С. Церебропротекторные свойства и протеолитическая устойчивость пептидов, гомологичных первичной последовательности участка АКГТ15-18 (экспериментальное исследование) // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 2. С. 65-69. [Deiko R.D., Shtrygol S.Yu., Kolobov A.A., Simbirtsev A.S. Cerebroprotective properties of the original peptides homologous to АСТН15-18 primary sequence (experimental study). *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, no. 14, pp. 65-69. (In Russ.)]
5. Кудина О.В., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А. Влияние олигопептидов – гомологов фрагмента АКГТ [15-18] на показатели углеводного обмена в условиях острого холодового стресса // Вестник фармации, 2019. № 1 (83). С. 64-70. [Kudina O.V., Shtrygol S.Yu., Kolobov A.A. Influence of oligopeptides – homologues of the АСТН fragment [15-18] on the parameters of carbohydrate metabolism under conditions of acute cold stress. *Vestnik farmatsii = Bulletin of Pharmacy*, 2019, no. 1 (83), pp. 64-70. (In Russ.)]
6. Кудина О.В., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А., Ларьяновская Ю.Б. Влияние олигопептидов – гомологов фрагмента актг15-18 на состояние печени и надпочечников крыс на модели острого иммобилизационного стресса // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, 2017. Т. 15, № 4. С. 30-37. [Kudina O.V., Shtrygol S.Yu., Kolobov A.A., Laryanovskaya Yu.B. The influence of oligopeptides – the homologues of АСТН15-18 on the liver and adrenal glands in the rats on the model of acute immobilization stress. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii = Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2017, Vol. 15, no. 4, pp. 30-37. (In Russ.)]
7. Кудрин А.В., Скальный А.В. Микроэлементы в онкологии. Ч. 2. Микроэлементы и противоопухолевый иммунитет // Микроэлементы в медицине, 2001. № 2. С. 31-39. [Kudrin A.V., Skalny A.V. Microelement in oncology. Part 2. Microelements and antitumor immunity. *Mikroelementy v meditsine = Microelements in Medicine*, 2001, no. 2, pp. 31-39. (In Russ.)]
8. Михайлова И.В., Стадников А.А., Пушкарева Л.А., Исенгулова А.А., Кузьмичева Н.А., Ширшов О.В., Тихонов В.В., Мирошниченко И.В. Оценка физиологических и морфологических параметров у крысят, родившихся от пассивно куривших самок. Сообщение 2 // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 22, № 2-1. С. 411-413. [Mikhailova I.V., Stadnikov A.A., Pushkareva L.A., Isengulova A.A., Kuzmicheva N.A., Shirshov O.V., Tikhonov V.V., Miroshnichenko I.V. Estimation of physiological and morphological parameters in rats born from passively smoked females. Message2. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 22, no. 2-1, pp. 411-413. (In Russ.)]
9. Скальный А.В., Скальная М.Г., Киричук А.А., Тиньков А.А. Медицинская элементология. М.: Наука, 2021. 199 с. [Skalny A.V., Skalnaya M.G., Kirichuk A.A., Tinkov A.A. Medical Elementology]. Moscow: Nauka, 2021. 199 p.
10. Толкач П.Г., Башарин В.А., Соловьева Т.С., Слуцкая Д.Р. Сравнительная эффективность нейропептидов КК1 и семакса для терапии поражений центральной нервной системы после тяжелого отравления оксидом углерода // Вестник Российской военно-медицинской академии, 2016. № 2 (54). С. 131-137. [Tolkach P.G., Basharin V.A., Solovieva T.S., Slutskaaya D.R. Comparative efficacy of neuropeptides KK1 and Semax for the treatment of lesions of the central nervous system after severe carbon monoxide poisoning. *Vestnik Rossiyskoy VoЕННО-Meditsinskoy Akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 2016, no. 2 (54), pp. 131-137. (In Russ.)]
11. Hawkins C.L., Davies M.J. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J. Biol. Chem.*, 2019, Vol. 294, pp. 19683-19708.

12. Ito F, Sono Y, Ito T. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: Oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants*, 2019, Vol. 8, 72. doi: 10.3390/antiox8030072.

13. Karaulov A.V., Mikhaylova I.V., Smolyagin A.I., Boev V.M., Kalogeraki A., Tsatsakis A.M., Engin A.B. The immunotoxicological pattern of subchronic and chronic benzene exposure in rats. *Toxicol. Lett.*, 2017, Vol. 275, pp. 1-5.

14. Yan L.L., Zaher H.S. How do cells cope with RNA damage and its consequences? *J. Biol. Chem.*, 2019, Vol. 294, pp. 15158-15171.

---

**Авторы:**

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

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

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

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

**Лившиц Н.М.** — к.м.н., старший лаборант иммунологической лаборатории Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

**Мирошниченко И.В.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

**Authors:**

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

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

**Filippova Yu.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

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

**Livshits N.M.**, PhD (Medicine), Senior Laboratory Assistant, Immunological Laboratory, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

**Miroshnichenko I.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Normal Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

# РОЛЬ КЛЕТОК-СУПРЕССОРОВ МИЕЛОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПРОГНОЗЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ У ДЕТЕЙ С ПСОРИАЗОМ

Купцова Д.Г.<sup>1</sup>, Радыгина Т.В.<sup>1</sup>, Фрейдлин Е.В.<sup>1</sup>, Курбатова О.В.<sup>1</sup>,  
Мурашкин Н.Н.<sup>1,2,3</sup>, Петричук С.В.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента РФ, Москва, Россия

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

**Резюме.** Псориаз – хроническое воспалительное заболевание кожи характеризуется повышенной пролиферацией эпидермальных клеток, нарушением кератинизации и воспалительной реакцией в дерме, обусловленной активацией Т-лимфоцитов и синтезом провоспалительных цитокинов. Патопатология псориаза связана не только с активацией провоспалительных реакций, а также со снижением противовоспалительных функций иммуносупрессорных клеток. Известно, что Treg, Vreg и клетки-супрессоры миелоидного происхождения (MDSCs) не выполняют свои классические гомеостатические функции при псориазе. В последние годы все чаще встречаются случаи развития резистентности к проводимой терапии генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП) в детском возрасте, требующие замены или отмены препарата. Цель исследования состояла в оценке содержания субпопуляций MDSCs и их функциональной активности в периферической крови у детей с псориазом при разной эффективности ГИБП. Обследовано 110 детей с вульгарным псориазом до назначения биологической терапии, на 16-й и 52-й неделях терапии адалимумабом, этанерцептом и устикинумабом, в возрасте от 6 до 18 лет. Группу сравнения – 34 здоровых ребенка, сопоставимых по возрасту. Эффективность терапии оценивали по достижению PASI 75 к году терапии. Методом многоцветной проточной цитометрии проводили оценку содержания MDSCs и их субпопуляций, и активности аргиназы-1. Установлено увеличение содержания MDSCs у детей с псориазом относительно группы сравнения ( $p = 0,000$ ). Анализ эффективности биологической терапии у детей с псориазом,

## Адрес для переписки:

Купцова Дарья Геннадьевна  
ФГАУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр здоровья детей»  
Министерства здравоохранения РФ  
119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2, стр. 1.  
Тел: 8 (499) 134-13-98.  
Факс: 8 (499) 134-70-01.  
E-mail: dg.kuptsova@gmail.com

## Address for correspondence:

Darya G. Kuptsova  
National Medical Research Center for Children's Health  
2 Lomonosov Ave, Bldg 1  
Moscow  
119296 Russian Federation  
Phone: +7 (499) 134-13-98.  
Fax: +7 (499) 134-70-01.  
E-mail: dg.kuptsova@gmail.com

## Образец цитирования:

Д.Г. Купцова, Т.В. Радыгина, Е.В. Фрейдлин,  
О.В. Курбатова, Н.Н. Мурашкин, С.В. Петричук  
«Роль клеток-супрессоров миелоидного происхождения  
в прогнозе эффективности генно-инженерных  
биологических препаратов у детей с псориазом»  
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,  
№ 3. С. 329-336.  
doi: 10.46235/1028-7221-9633-ROM

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

## For citation:

D.G. Kuptsova, T.V. Radigina, E.V. Freidlin, O.V. Kurbatova,  
N.N. Murashkin, S.V. Petrichuk "Role of myeloid-derived  
suppressor cells in prediction of the effectiveness of biologics  
in children with psoriasis", Russian Journal of Immunology/  
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3,  
pp. 329-336.  
doi: 10.46235/1028-7221-9633-ROM

© Kuptsova D.G. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-9633-ROM

по индексу PASI, показал достоверное снижение тяжести заболевания в группе пациентов с хорошим эффектом, как на 16 неделе терапии ( $p = 0,000$ ), так и к году лечения ГИБП ( $p = 0,017$ ). У детей с псориазом при разной эффективности и длительности биологической терапии выявлена разная динамика содержания MDSCs. В группе пациентов с хорошим эффектом биологической терапии, как до начала лечения, так и к 52-й неделе терапии, выше процент общей популяции MDSCs ( $p < 0,01$ ). У детей с псориазом выявлено увеличение иммуносупрессивной функций MDSCs по активности аргиназы-1 относительно группы сравнения (Me 3,2 (3,0-3,4) MFI против Me 2,7 (2,6-2,9) MFI;  $p = 0,000$ ). Активность аргиназы-1 у пациентов с псориазом в стадии регресса заболевания (PASI < 10) достоверно увеличена относительно детей в прогрессирующей стадии псориаза (PASI  $\geq$  10;  $p = 0,001$ ). Таким образом, содержание MDSCs и их супрессорная активность MDSCs у детей с псориазом информативна в прогнозе эффективности терапии ГИБП. Ускользание эффекта биологической терапии после индукционного курса сопровождается снижением количества MDSCs и их функциональной активности.

*Ключевые слова:* MDSCs, аргиназа-1, дети, псориаз, биопрепараты, проточная цитометрия

## ROLE OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS IN PREDICTION OF THE EFFECTIVENESS OF BIOLOGICS IN CHILDREN WITH PSORIASIS

Kuptsova D.G.<sup>a</sup>, Radigina T.V.<sup>a</sup>, Freidlin E.V.<sup>a</sup>, Kurbatova O.V.<sup>a, b, c</sup>,  
Murashkin N.N.<sup>a</sup>, Petrichuk S.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease characterized by increased proliferation of epidermal cells, impaired keratinization, and an inflammatory reaction in the dermis due to activation of T-lymphocytes and synthesis of proinflammatory cytokines. Pathophysiology of psoriasis is associated not only with activation of proinflammatory reactions, but also with decreased anti-inflammatory functions of immunosuppressive cells. It is known that Treg, Breg and MDSCs do not perform their classical homeostatic functions in psoriasis. In recent years, there have been more and more cases of developing resistance to ongoing therapy with genetically engineered biological drugs (GEBD) in childhood, requiring replacement or discontinuation of the drug. The aim of our work was to estimate the content of MDSCs subpopulations and their functional activity in the peripheral blood of children with psoriasis at different effectiveness of biotherapeutic drugs. We examined 110 children with psoriasis vulgaris before the appointment of biologics, at 16 and 52 weeks of therapy with adalimumab, etanercept and ustikinumab, aged 6 to 18 years. Comparison group consisted of 34 healthy children. The effectiveness of therapy was assessed by the achievement of PASI 75 by one year of therapy. Contents of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and their subpopulations, and the activity of arginase-1 were assessed by multicolor flow cytometry. An increased content of MDSCs was found in children with psoriasis against the comparison group ( $p = 0.000$ ). Analysis of the effectiveness of biologics in children with psoriasis, according to PASI, showed a significant reduction in disease severity in the group of patients with good effect, both at week 16 of therapy ( $p = 0.000$ ) and by one year ( $p = 0.017$ ). In the group of patients with good effect of biological therapy, percentage of total MDSCs population was higher, both before start of treatment and by 52<sup>nd</sup> week of therapy ( $p < 0.01$ ). Children with psoriasis showed increased immunosuppressive function of MDSCs by arginase-1 activity versus the comparison group ( $p = 0.000$ ). The arginase-1 activity in patients with psoriasis at the stage of disease regression (PASI < 10) was significantly increased relative to children in progressive stage of psoriasis (PASI  $\geq$  10;  $p = 0.001$ ). Thus, the content of MDSCs and their suppressive activity in children with psoriasis is an informative efficiency predictor of the biological drugs. Fading of biotherapy effect after the induction course is accompanied by decreased number of MDSCs and their functional activity.

*Keywords:* myeloid-derived suppressor cells, arginase-1, children, psoriasis, biologics, flow cytometry

## Introduction

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease with hereditary predisposition and is characterized by increased proliferation of epidermal cells, impaired keratinization, and an inflammatory response in the dermis due to activation of T lymphocytes and synthesis of proinflammatory cytokines [1, 6]. The pathophysiology of psoriasis is related not only to the activation of proinflammatory reactions, but also to a decrease in the anti-inflammatory functions of immunosuppressor cells. In particular, it has been shown that regulatory T cells, regulatory B cells, and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) do not perform their classical homeostatic functions in psoriasis [9, 10].

MDSCs are a population of immature myeloid cells with an immune regulatory role [3, 11]. MDSCs originate from common myeloid precursors in the bone marrow and under normal conditions differentiate into endothelial cells, macrophages, dendritic cells, or neutrophils [8]. However, under inflammatory conditions, aberrant resistant myelopoiesis can lead to the accumulation of immature myeloid cells. Increased growth factors (GM-CSF and VEGF) and cytokines (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and TGF $\beta$ ) are known to accelerate the expansion of MDSCs in the bone marrow and lead to the accumulation of these cells in the periphery [2, 13]. MDSCs possess surface markers of myeloid cells and have no specific markers characteristic of lymphocytes, dendritic cells, natural killer cells, and macrophages [13, 14]. MDSCs express CD11b<sup>+</sup> and CD33<sup>+</sup> myeloid cell markers, but are negative for HLA-DR antigens and linear specific antigens (Lin) such as CD3, CD19, and CD56 [7]. Two main subpopulations of MDSCs are currently characterized: monocytic (M-MDSCs) and granulocytic (G-MDSCs) [4, 13].

MDSCs exhibit suppressor activity against innate and adaptive immune cells using different immunosuppression mechanisms [4, 13, 14]. One of the mechanisms by which MDSCs develop immunosuppression is the depletion of nutrients for T cells, in particular arginine stores. MDSCs produce the enzyme arginase-1, which degrades arginine and also causes damage to the  $\alpha$ -chain of the TCR, thus blocking activation and proliferation T cells [2, 4, 13]. MDSCs modulate the immune response in a variety of diseases, including numerous types of cancer, inflammatory bowel disease, trauma, burns, infections, and transplants [2, 3, 11, 13]. Previously, we showed that children with psoriasis have increased levels of MDSCs relative to healthy children [6]. Also, adult patients with psoriasis have been shown to have increased MDSCs in peripheral blood compared to

healthy controls, which is associated with the severity and duration of the disease [2, 3, 8, 15].

To treat psoriasis in children, algorithms for external and systemic therapy have been developed based on physical examination and clinical evaluation of characteristic signs and changes in the patient's skin. In cases of moderate or severe disease, as well as in the ineffectiveness of previously used therapy, the prescription of genetically engineered biological drugs (GEBD) is indicated [1, 10]. The targeting effect of biologics is based on the blockade of the main proinflammatory cytokines involved in the pathogenesis of psoriasis, such as TNF $\alpha$ , IL-17, IL-12 and IL-23 [1, 3, 10]. To achieve a sustained remission on biologics requires long-term treatment, which, unfortunately, does not guarantee the preservation of the effect in the case of drug withdrawal. One of the factors of loss of response to GEBD therapy is the production of antibodies to biological drugs, and monitoring their level is recognized as a necessary criterion for controlling the ongoing treatment [5]. In recent years, there have been more and more cases of development of resistance to the ongoing therapy of GEBD in children, requiring replacement or withdrawal of the drug [5, 12]. In this connection, the search for informative immunological criteria of effectiveness of biologics for psoriasis, as well as the identification of factors that lead to a decrease or absence of the effect of GEBD in patients with psoriasis, remains relevant.

**The aim of the study** was to evaluate the content of MDSCs subpopulations and their functional activity in peripheral blood in children with psoriasis at different efficacy of GEBD.

## Materials and methods

The study included 110 children with vulgar psoriasis who were treated with HIBP at the Department of Dermatology with the Laser Surgery Group of the Federal State Institution "Scientific and Research Center of Children's Health" of the Ministry of Health of Russia. The patients were examined before biological therapy, at weeks 16 and 52 of therapy with adalimumab, etanercept and ustekinumab. Inclusion criteria in the study: age of children 6-18 years old, established diagnosis of psoriasis vulgaris, compliance with the multiplicity and dose of GEBD administration. Exclusion criteria: other forms of psoriasis in children, age over 18 years, inability to obtain a blood sample. The severity of psoriasis was assessed by the PASI, which varied from 0 to 68 (Me 14.0 (9.0-19.9)).

The effectiveness of therapy was assessed by achieving PASI 75 by one year of therapy: group 1

included children with an insufficient effect of GEBD (“IE”, less than PASI 75, n = 52), group 2 included children with a good effect (“PASI 75” or more, n = 58). The children examined ranged in age from 6 to 18 years, children in groups 1 and 2 did not differ in age: 12.3 (7.8-16.4) years versus 12.5 (8.8-15.3) years, p = 0.821. The study complied with the ethical principles of the Declaration of Helsinki (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) and was approved by the local ethical committee National Medical Research Center for Children’s Health of the Russian Ministry of Health (protocol No 2 of 14.02.2020).

The content of MDSCs subpopulations was determined by stepwise gating according to a previously described algorithm [6], using multicolor flow cytometry: including the isolation of the “lymphoid-monocytic” region, the isolation of a population of cells that do not carry linear lymphocytic markers CD3, CD19, CD56 with PE fluorochrome and are negative for HLA-DR – FITC, the isolation of a double positive population for CD11b markers – APC-Cy7 and CD33 – PE-Cy7, division of the subpopulation of MDSCs by expression of CD14 – PerCP and CD15 – APC (Beckman Coulter, Sony Biotechnology, USA). The MDSCs were phenotyped as monocytic (M-MDSCs) with the phenotype CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-/low</sup>, granulocytic subpopulation (G-MDSCs) as CD11b<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-/low</sup> and population cells negative CD14 and CD15 (M<sup>-</sup>G<sup>-</sup>-MDSCs) with the phenotype CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-/low</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>-</sup>.

The immunosuppressive ability of the MDSCs population was assessed by the activity of the

intracellular enzyme arginase-1 in 40 children with psoriasis and 32 children in the comparison group. Sample preparation included isolation of peripheral blood mononuclear cells from patients. To the isolated cell suspension (100 µL), 10 µL of monoclonal antibodies were added according to the following panel: CD3, CD19, CD56, HLA-DR – FITC (cocktail), CD11b – APC-Cy7 and CD33 – PE-Cy7. Permeabilization cells was performed using the BD Cytotfix/Cytoperm kit (USA) according to the manufacturer’s instructions. After permeabilization of the cells, 10 µl of arginase-1 with fluorochrome PE was added and incubated for 20 min in a dark place. The sample was recorded on a Novocyte flow cytofluorimeter (ACEA Biosciences, USA). The activity of arginase-1 enzyme was determined by mean fluorescence intensity – MFI.

Statistical analysis was performed using Statistica 10.0 (StatSoft, USA) and ROC analysis using SPSS 16.0 (SPSS: An IBM Company, USA). Descriptive statistics of the number of cells are presented in the form of a median (lower – upper quartiles) – Me (Q<sub>0.25</sub>-Q<sub>0.75</sub>). The non-parametric Mann–Whitney test considered differences between independent groups; differences were considered significant at p < 0.05.

## Results and discussion

Assessment of the MDSCs population in children with psoriasis showed a significant increase in this population relative to the comparison group (Table 1). The increase in the relative amount of the MDSCs population is mainly due to the monocytic MDSCs subpopulation (M-MDSCs). A significant increase in both the absolute and relative numbers of M-MDSCs,

**TABLE 1. RELATIVE AND ABSOLUTE NUMBER OF MDSCS AND THEIR SUBPOPULATIONS IN CHILDREN WITH PSORIASIS AND IN THE COMPARISON GROUP**

Population cells		Psoriasis (n = 110)	Comparison group (n = 32)	p
MDSCs	cells/µL	75 (48-114)	41 (25-53)	0.000
	% PBMCs	2.7 (1.6-3.9)	1.4 (0.9-1.7)	0.000
M-MDSCs	cells/µL	10 (4-26)	3 (1-8)	0.000
	% MDSCs	14.5 (5.7-29.1)	9.7 (6.6-16.1)	0.006
G-MDSCs	cells/µL	15 (6-32)	8 (4-16)	0.001
	% MDSCs	21.0 (10.9-36)	25.2 (12.6-43.8)	0.339
M <sup>-</sup> G <sup>-</sup> -MDSCs	cells/µL	39 (25-58)	21 (9-35)	0.000
	% MDSCs	54.7 (38.9-70.1)	66.3 (43.2-77.2)	0.032

Note. p, differences between independent groups by Mann–Whitney test, p < 0.05.

as well as in the absolute numbers of G-MDSCs and M-G-MDSCs, with a decrease in the relative number of nondifferentiated MDSCs (M-G-MDSCs), relative to those in the comparison group, was found for children with psoriasis (Table 1).

Analysis of the effectiveness of biologics in children with psoriasis, according to the PASI index, showed a significant and significant reduction in the severity of the disease in the patient group when PASI 75, both at 16 weeks of therapy (from 20.1 (14.0-31.0) to 11.3 (7.0-15.0),  $p = 0.000$ ), and by one year of GEBD treatment – 6.1 (1.5-9.9),  $p = 0.017$ . In the group of children with insufficient effect of biologics the decrease of PASI index was less pronounced and by one year of therapy PASI was higher than 10 points (16 weeks – 16.2 (15.0-21.0), 52 weeks of GEBD – 10.9 (4.9-22.0)). Before prescription of biological therapy, groups 1 and 2 did not differ in terms of PASI index ( $p = 0.631$ ), but starting from week 16 of therapy, PASI index in the group of patients with good effect was significantly lower than in the group with poor effect.

Analysis of the content of MDSCs subpopulations at different efficacy of GIBP in children with psoriasis showed that the percentage of total MDSCs population was significantly reduced in the group of patients with insufficient effect of biologics, both before treatment started and by 52 weeks of therapy relative to group 2 (Figure 1).

In children with psoriasis, different dynamics in the content of MDSCs subpopulations were revealed with

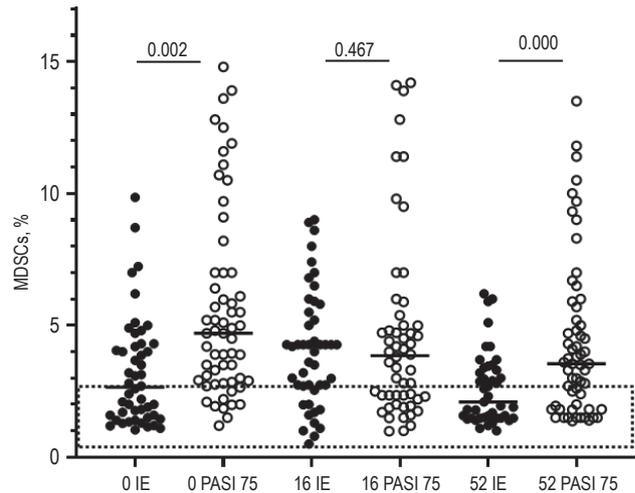


Figure 1. Relative number of MDSCs at insufficient effect (IE) and reaching PASI 75 (PASI 75) in children with psoriasis at 0, 16, 52 weeks of biological therapy

Note. The dotted line indicates the range of the comparison group.

different efficacy and duration of biologics: at the time of incubation course of GEBD therapy, a significantly lower percentage of M-MDSCs was obtained in group 1 compared to group 2 ( $p = 0.041$ ). By one year of GEBD therapy, a significant increase in the granulocyte subpopulation of G-MDSCs ( $p = 0.003$ ) with a decrease in the number of undifferentiated M-G-MDSCs was obtained in the group with a good effect ( $p = 0.000$ ; Table 2).

TABLE 2. CONTENT OF SUBPOPULATIONS OF MDSCs IN CHILDREN WITH PSORIASIS IN PERIPHERAL BLOOD WITH DIFFERENT EFFECTIVENESS OF BIOLOGICS

Population	Duration of therapy, week	Group 1 Insufficient effect (IE, n = 52)	Group 2 Achievement of PASI 75 (n = 58)	p
MDSCs, % PBMCs	0	2.0 (1.5-3.8)	3.2 (2.8-5.8)	0.002
	16	4.1 (2.5-5.1)	2.9 (2.1-4.7)	0.467
	52	1.4 (1.0-2.3)	3.6 (1.8-6.1)	0.000
M-MDSCs, % MDSCs	0	21 (7.4-40.6)	18.7 (16.3-33.9)	0.682
	16	12.9 (6.7-30.4)	24.8 (11.7-35.3)	0.041
	52	17.2 (3.1-36.2)	19.3 (1.3-32.1)	0.915
G-MDSCs, % MDSCs	0	24.2 (14.4-37.1)	29.3 (15.1-43.2)	0.347
	16	28.2 (11.6-42.8)	21.1 (15.0-36.8)	0.613
	52	10.4 (4.0-16.1)	19.8 (8.7-59.3)	0.003
M-G-MDSCs, % MD-SCs	0	42.1 (30.2-53.0)	43 (20.6-48.9)	0.400
	16	50.1 (31.4-58.8)	48.3 (25.7-65.6)	0.231
	52	59.7 (59.7-87.0)	48.7 (26.1-60.8)	0.000

ROC analysis for MDSCs and their subpopulations before and at week 16 of therapy revealed only an average (AUC < 0.7) and poor quality (AUC < 0.6) divisor model for the PASI 75 states and insufficient effect: AUC MDSCs 0 week – 0.677; AUC MDSCs 16 week – 0.543. Thus, children with psoriasis showed higher levels of MDSCs prior to therapy than those in the insufficient-effect group when the biologics had a good effect ( $p = 0.002$ ). However, because of the wide variation in the indices, it is impossible to calculate a reliable cut-off level for predicting efficacy.

Assessment of the immunosuppressive function of MDSCs by intracellular arginase-1 enzyme activity showed a significant increase in enzyme activity in children with psoriasis relative to the comparison group (Me 3.2 (3.0-3.4) MFI versus Me 2.7 (2.6-2.9) MFI;  $p = 0.000$ ).

A direct correlation between arginase-1 activity and the relative number of G-MDSCs ( $r = 0.30$ ;  $p = 0.022$ ), M-MDSCs ( $r = 0.40$ ;  $p = 0.002$ ) and inverse with M-G-MDSCs ( $r = -0.54$ ;  $p = 0.000$ ) was detected. No direct correlation of the enzyme activity with the age of children and the duration of psoriasis disease was detected. Analysis of arginase-1 activity in patients with psoriasis in the disease regression stage

(PASI < 10) and in the progressive stage of the disease (PASI  $\geq 10$ ) showed a significant increase in arginase-1 activity in the regression stage (Me 3.2 (3.16-3.57) MFI versus 2.98 (2.88-3.01) MFI;  $p = 0.001$ ).

## Conclusion

Children with psoriasis with a good effect of biologics showed higher levels of MDSCs before the start of therapy and during the year of therapy than those in the group of children with ineffectiveness. The activity of arginase-1 in MDSCs in children with psoriasis was significantly increased in comparison with the comparison group. A direct correlation between arginase-1 activity and the relative number of G-MDSCs, M-MDSCs, and an inverse correlation with M-G-MDSCs was detected. In children in the progressive stage of psoriasis (PASI > 10), arginase-1 enzyme activity is significantly lower than in the regressive stage of the disease. Thus, the content of MDSCs and their suppressor activity of MDSCs in children with psoriasis is informative in predicting the effectiveness of HDI therapy. The slippage of the effect of biological therapy after the induction course is accompanied by a decrease in the number of MDSCs and their functional activity.

## References

1. Armstrong A.W., Read C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: A review. *JAMA*, 2020, Vol. 323, no. 19, pp. 1945-1960.
2. Cao L.Y., Chung J.S., Teshima T., Feigenbaum L., Cruz P.D., Jr Jacobe H.T., Chong B.F., Ariizumi K. Myeloid-derived suppressor cells in psoriasis are an expanded population exhibiting diverse T-cell-suppressor mechanisms. *J. Invest. Dermatol.*, 2016, Vol. 136, no. 9, pp. 1801-1810.
3. Consonni F.M., Porta C., Marino A., Pandolfo C., Mola S., Bleve A., Sica A. Myeloid-derived suppressor cells: ductile targets in disease. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 949. doi: 10.3389/fimmu.2019.00949.
4. Grover A., Sanseviero E., Timosenko E., Gabrilovich D.I. Myeloid-derived suppressor cells: A propitious road to clinic. *Cancer Discov.*, 2021, Vol. 11, no. 11, pp. 2693-2706.
5. Hong D., Liu X., Qiu X., Lu S., Jiang Y., Tan G., Shi Z., Wang L. Profiling serum cytokines and anticytokine antibodies in psoriasis patients. *J. Immunol. Res.*, 2022, Vol. 2022, 2787954. doi: 10.1155/2022/2787954.
6. Kuptsova D.G., Radygina T.V., Murashkin N.N., Petrichuk S.V. Indicators of cellular immunity and myeloid-derived suppressor cells of myeloid origin in children with psoriasis. *Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2020, no. 3, pp. 55-65. (In Russ.)
7. Li Y., He H., Jihu R., Zhou J., Zeng R., Yan H. Novel characterization of myeloid-derived suppressor cells in tumor microenvironment. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, Vol. 9, 698532. doi: 10.3389/fcell.2021.698532.
8. Liu P., Peng C., Chen X., Wu L., Yin M., Li J., Qin Q., Kuang Y., Zhu W. Acitretin promotes the differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the treatment of psoriasis. *Front. Med. (Lausanne)*, 2021, Vol. 8, 625130. doi: 10.3389/fmed.2021.625130.
9. Mizumaki K., Horii M., Kano M., Komuro A., Matsushita T. Suppression of IL-23-mediated psoriasis-like inflammation by regulatory B cells. *Sci. Rep.*, 2021, Vol. 11, no. 1, 2106. doi: 10.1038/s41598-021-81588-8.
10. Nussbaum L., Chen Y.L., Ogg G.S. Role of regulatory T cells in psoriasis pathogenesis and treatment. *Br. J. Dermatol.*, 2021, Vol. 184, no. 1, pp. 14-24.
11. Pawelec G., Verschoor C.P., Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: not only in tumor immunity. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1099. doi: 10.3389/fimmu.2019.01099.
12. Petrichuk S.V., Radygina T.V., Kuptsova D.G., Kurbatova O.V., Semikina E.L., Murashkin N.N., Potapov A.S., Fisenko A.P. Evaluation of anti-TNF treatment efficiency in children with immune-dependent diseases by means

of testing the NF- $\kappa$ B activity in lymphocyte populations. *Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 491-498. (In Russ.). doi: 10.46235/1028-7221-1191-EOA.

13. Reuven O., Mikula I., Jr Ashkenazi-Preiser H., Twaik N., Ben-Meir K., Meirou Y., Daniel L., Kariv G., Kurd M., Baniyash M. Phenotypic characterization and isolation of myeloid-derived suppressor cells. *Curr. Protoc.*, 2022, Vol. 2, no. 10, e561. doi: 10.1002/cpz1.561.

14. Veglia F., Sanseviero E., Gabrilovich D.I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021, Vol. 21, no. 8, pp. 485-498.

15. Zamorina S.A., Timganova V.P., Bochkova M.S., Shardina K.Yu., Uzhviyuk S.V., Khramtsov P.V., Kropaneva M.D., Rayev M.B. Role of glycodefin in regulation of myeloid-derived suppressor cell differentiation. *Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 4, pp. 641-646. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-ROG-2209.

---

**Авторы:**

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

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

**Фрейдлин Е.К.** — лаборант-исследователь лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

---

**Authors:**

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

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

**Freidlin E.K.**, Research Laboratory Assistant, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

**Kurbatova O.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

**Мурашкин Н.Н.** — д.м.н., профессор, руководитель НИИ детской дерматологии, заведующий отделением дерматологии с группой лазерной хирургии и заведующий лабораторией патологии кожи у детей отдела научных исследований в педиатрии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

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

**Murashkin N.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Research Institute of Pediatrics Dermatology, Dermatology Department with Laser Surgery Unit and Children's Skin Pathology Laboratory, National Medical Research Center for Children's Health; Professor, Department of Dermatovenereology and Cosmetology, Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

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

---

Поступила 11.05.2023  
Принята к печати 29.06.2023

---

Received 11.05.2023  
Accepted 29.06.2023

## **РОЛЬ МАЛЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ С ГЛИКОГЕНОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ**

**Курбатова О.В.<sup>1</sup>, Петричук С.В.<sup>1</sup>, Мовсисян Г.Б.<sup>1</sup>, Купцова Д.Г.<sup>1</sup>,  
Радыгина Т.В.<sup>1</sup>, Анушенко А.О.<sup>1</sup>, Семикина Е.Л.<sup>1, 2</sup>, Потапов А.С.<sup>1, 2</sup>**

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

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»  
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Резюме.** Гликогеновая болезнь (ГБ) – орфанное заболевание из группы наследственных болезней обмена веществ, приводящее к накоплению гликогена в печени и мышцах. Нарушение регуляции метаболизма гликогена в печени приводит к развитию фибротических изменений печени. В процессах фиброза печени при различных болезнях накопления ключевая роль отводится иммунной системе. Цель работы – оценить содержание малых популяций лимфоцитов и их соотношения у детей с печеночными формами гликогеновой болезни в зависимости от стадии фиброза печени. Обследовано 148 детей с печеночными формами ГБ в возрасте  $Me = 7,7$  (3,9-11,8). Группу сравнения составили 54 здоровых ребенка, сопоставимых по возрасту. Оценка стадии фиброза печени проводили на аппарате FibroScan F502 (EchoSens, Франция). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили на цитофлуориметре CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter, США). Показатели популяций лимфоцитов были проанализированы в процентах отклонения от возрастной нормы. У детей с ГБ выявлено увеличение степени фиброза печени от возраста ( $R = 0,57$ ). Содержание Treg у детей с ГБ было на нижней границе возрастной нормы и не зависело от стадии фиброза печени. Содержание Th17 и Thact лимфоцитов было значимо выше показателей группы сравнения при всех стадиях фиброза печени, начиная со стадии F1. С увеличением стадии фиброза печени отмечено повышение доли пациентов с содержанием Thact и Th17, превышающих верхнюю границу нормативных значений ( $P_{F0-F4} = 0,021$  и  $P_{F0-F4} = 0,012$

### **Адрес для переписки:**

Курбатова Ольга Владимировна  
ФГАУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр здоровья детей»  
Министерства здравоохранения РФ  
119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр. 2, стр. 1.  
Тел.: 8 (499) 134-13-98.  
Факс: 8 (499) 134-70-01.  
E-mail: putintseva@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Olga V. Kurbatova  
National Medical Research Center for Children's Health  
2 Lomonosovsky Ave, Bldg 1  
Moscow  
119991 Russian Federation  
Phone: +7 (499) 134-13-98.  
Fax: +7 (499) 134-70-01.  
E-mail: putintseva@mail.ru

### **Образец цитирования:**

О.В. Курбатова, С.В. Петричук, Г.Б. Мовсисян,  
Д.Г. Купцова, Т.В. Радыгина, А.О. Анушенко,  
Е.Л. Семикина, А.С. Потапов «Роль малых популяций  
лимфоцитов при формировании фиброза печени  
у детей с гликогеновой болезнью» // Российский  
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3.  
С. 337-344.  
doi: 10.46235/1028-7221-10013-ROM

© Курбатова О.В. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

O.V. Kurbatova, S.V. Petrichuk, G.B. Movsisyan,  
D.G. Kuptsova, T.V. Radygina, A.O. Anushenko,  
E.L. Semikina, A.S. Potapov "Role of minor lymphocyte  
populations in development of liver fibrosis in children with  
glycogen storage disease", Russian Journal of Immunology/  
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3,  
pp. 337-344.  
doi: 10.46235/1028-7221-10013-ROM

© Kurbatova O.V. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-10013-ROM

соответственно). Выявлено увеличение соотношений Th17/Treg и Thact/Treg у пациентов с ГБ относительно группы сравнения во всех возрастных группах, динамика соотношений Th17/Treg и Thact/Treg характеризовалась их увеличением с возрастом. Анализ показателей в зависимости от стадии фиброза печени у детей с ГБ выявил значимое увеличение соотношения Thact/Treg от стадии F0 к стадиям F1, F2, F3 и F4 ( $P_{F0-F4} = 0,000$ ). Индекс Th17/Treg также увеличивался от стадии F0 к стадиям F1, F2, F3 ( $P_{F0-F3} = 0,000$ ).

Повышение содержания Thact и Th17-лимфоцитов, а также индексов Th17/Treg и Thact/Treg с увеличением стадии фиброза печени можно использовать как дополнительный инструмент в оценке фибротических изменений печени. Иммунологические показатели объективно отражают степень тяжести состояния пациента с печеночными формами ГБ.

*Ключевые слова:* дети, гликогеновая болезнь, фиброз печени, лимфоциты, проточная цитометрия, Thact/Treg, Th17/Treg

## ROLE OF MINOR LYMPHOCYTE POPULATIONS IN DEVELOPMENT OF LIVER FIBROSIS IN CHILDREN WITH GLYCOGEN STORAGE DISEASE

Kurbatova O.V.<sup>a</sup>, Petrichuk S.V.<sup>a</sup>, Movsisyan G.B.<sup>a</sup>, Kuptsova D.G.<sup>a</sup>, Radygina T.V.<sup>a</sup>, Anushenko A.O.<sup>a</sup>, Semikina E.L.<sup>a, b</sup>, Potapov A.S.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Glycogen storage disease (GSD) is a rare condition that alters the ways of glycogen use and storage in the patient. Our objective was to evaluate the content of small populations of lymphocytes and their ratios in children with hepatic forms of glycogen disease depending on the stage of liver fibrosis. 148 children with GSD at the median age of 7.7 years old (3.9 to 11.8) were examined. The comparison group consisted of 54 healthy children. The stage of liver fibrosis was carried out with a FibroScan F502 device (EchoSens, France). Immunophenotyping of lymphocytes was performed on CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter, USA). Indices of lymphocyte subpopulations were analyzed as a percentage of deviation from the age-matched reference values. In children with GSD, an age-dependent increase in liver fibrosis was revealed ( $R = 0.57$ ). Treg content in children with GSD was at the lower limit of the age reference values and did not depend on the stage of liver fibrosis. The contents of Th17 and Thact lymphocytes were significantly higher than those of the comparison group at all stages of liver fibrosis, starting from stage F1. With increasing stage of liver fibrosis, we revealed higher proportion of patients with Thact and Th17 contents exceeding the upper limit of the normal values ( $P_{F0-F4} = 0.021$  and  $P_{F0-F4} = 0.012$ , respectively). An increase in Th17/Treg and Thact/Treg ratios was registered in patients with GSD against the comparison group in all age categories. The dynamics of Th17/Treg and Thact/Treg ratios was characterized by their age-dependent increase. Analysis of indices depending on the stage of liver fibrosis in children with GSD has shown a significant increase in the Thact/Treg ratio from stage F0 to stages F1, F2, F3 and F4 ( $P_{F0-F4} = 0.000$ ). The Th17/Treg index increased from stage F0 to stages F1, F2, F3 ( $P_{F0-F3} = 0.000$ ).

An increased content of Thact and Th17 lymphocytes, as well as Th17/Treg and Thact/Treg ratios associated with increased stage of liver fibrosis may be used as an additional tool in assessing fibrotic changes in the liver. Immunological indices objectively reflect clinical severity in patients with hepatic forms of GSD.

*Keywords:* children, glycogen storage disease, liver fibrosis, lymphocytes, flow cytometry, Thact/Treg, Th17/Treg

## Введение

Врожденные нарушения обмена веществ могут проявляться в любом возрасте, и постановка диагноза при редких болезнях затруднена, поскольку они могут имитировать более распространенные состояния [13].

Болезни накопления гликогена (ГБ) с поражением печени классифицируют на типы 0, I, III, IV, VI, IX и XI в зависимости от пораженного фермента. Гипогликемия и гепатомегалия являются отличительными признаками заболевания, реже выявляются поражения мышц, почечных канальцев, дислипидемия и остеопения [9]. Распространенность ГБ составляет 1:20 000 [14].

Диагноз «ГБ» ставится на основании клинических проявлений и результатов лабораторных исследований, но часто необходим молекулярно-генетический анализ [9]. Биопсия печени – золотой стандарт оценки фибротических изменений печени, является также и методом диагностики ГБ, однако данная процедура носит высоко инвазивный характер [8].

Гликоген – основная форма запаса глюкозы и основной источник неокисленной глюкозы для скелетных мышц и печени, необходим для поддержания нормального уровня глюкозы в крови. Основными ферментами, участвующими в расщеплении гликогена, являются гликогенфосфорилаза и фермент деветвления. Дефицит любого из этих ферментов проявляется в виде болезней накопления гликогена, включая болезнь фон Гирке (тип I), болезнь Кори (тип III) и болезнь Герса (тип VI, IX) [10].

Печень является основным хранилищем гликогена и играет важную роль в поддержании системного гомеостаза глюкозы. Молекулярный механизм заболеваний печени, связанных с аномальным накоплением гликогена, активно изучается [12]. Нарушение регуляции метаболизма гликогена в печени часто приводит к компенсаторному увеличению липолиза из внепеченочных источников и митохондриальному окислению жирных кислот при типах 0, III, VI, IX и XI ГБ, что способствует развитию фибротических изменений печени, вплоть до цирроза [6].

Описаны иммунные нарушения у пациентов с ГБ, включая нейтропении, врожденные и адаптивные компартменты, в том числе неспособность популяций активированных иммунных клеток и регуляторных Т-клеток подвергаться соответствующему переключению на гликолитический метаболизм при гипогликемических состояниях и выполнять свои функции [7].

Показана вовлеченность иммунной системы в процесс фиброза печени при различных болезнях накопления, аутоиммунных и вирусных гепатитах, неалкогольной жировой дистрофии печени [3, 11].

Подробно изучена возрастная динамика показателей иммунного статуса у детей с печеночными формами ГБ: показано увеличение относительного количества Т-хелперов и снижение цитотоксических Т-лимфоцитов. В составе Т-хелперов выявлено увеличение доли активированных клеток и существенное нарастание доли популяции Th17-лимфоцитов, которые сопровождалось увеличением степени биохимических нарушений [4]. Однако неясным остается вопрос о роли малых популяций лимфоцитов в развитии фибротических изменений в печени у детей с ГБ.

**Цель работы** – оценить содержание малых популяций лимфоцитов и их соотношения у детей с печеночными формами гликогеновой болезни в зависимости от стадии фиброза печени.

## Материалы и методы

Обследовано 148 детей с печеночными формами ГБ (I/III/VI/IX типы) в возрасте от 1 до 17,8 лет, Me = 7,7 (3,9-11,8). Группу сравнения составили 54 здоровых ребенка, сопоставимых по возрасту.

Оценку стадии фиброза печени проводили методом транзитной эластографии печени на аппарате FibroScan F502 (EchoSens, Франция). Для диагностики степени фиброза печени использовали шкалу METAVIR: стадия F1 – плотность в интервале 5,9-7,2 кПа; стадия F2 – 7,3-9,5 кПа; стадия F3 – 9,6-12,5 кПа, стадия F4 (цирроз печени) – плотность 12,6 кПа и более [2].

Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител, меченных флуорохромами: CD3-PC-5, CD4-FITC, CD127-PE, CD161-PE, CD25 PE-Cy7, CD45-PerCP, CD45-PC7 (Beckman Coulter, США). В регионе CD45<sup>+</sup> исследовали следующие популяции клеток: CD3<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Th17-лимфоциты); CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup> (активированные Т-хелперы – Thact); CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> (регуляторные Т-лимфоциты – Treg).

Учитывая известную возрастную динамику показателей клеточного иммунитета, обследованные дети были разделены на группы согласно возрасту: 1-2 года (n = 12), 2-5 лет (n = 47), 6-8 лет (n = 24), 9-11 лет (n = 31) и старше 12 лет (n = 34) [1, 5]. Показатели субпопуляций лимфоцитов были проанализированы в процентах от-

клонения от возрастной нормы для исключения влияния возрастных особенностей. Формула расчета отклонений:

$$X_n = (X_{\min} - X) / 0,01 * (X_{\max} - X_{\min}), \text{ где}$$

$X_n$  — значение индивидуального показателя, нормированное на возрастную норму;  $X$  — значение изучаемого показателя;  $X_{\max}$  — верхняя граница возрастной нормы;  $X_{\min}$  — нижняя граница возрастной нормы. Диапазон возрастной нормы принимали за 100%.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета Statistica 10.0. (StatSoft, США). Описательная статистика представлена в виде  $Me (Q_{0,25} - Q_{0,75})$ . Для оценки значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Манна—Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

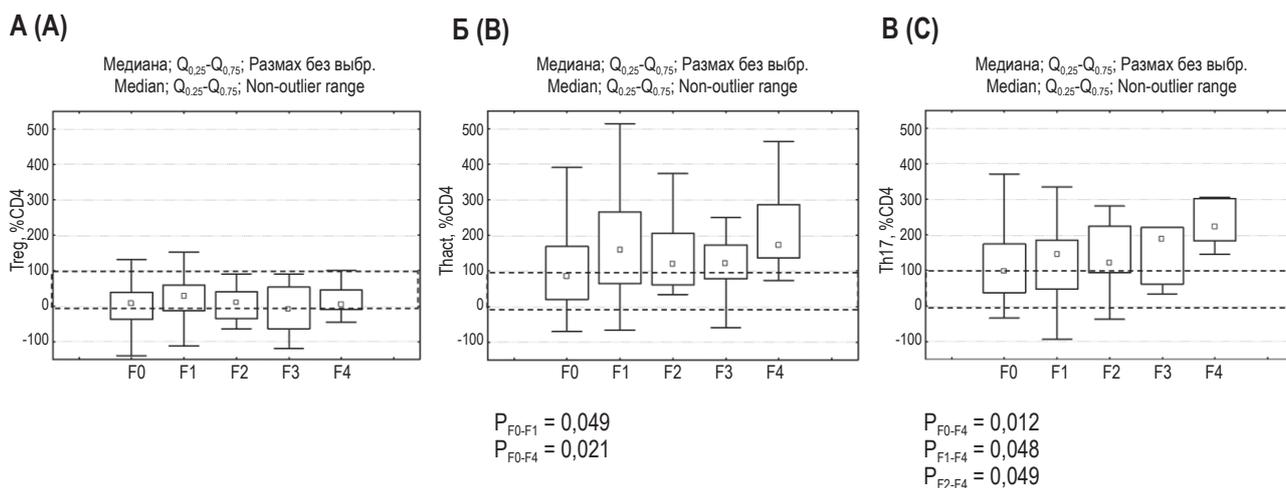
## Результаты и обсуждение

При анализе степени фиброза печени (по шкале METAVIR) дети с ГБ были разделены на группы: группа 1 — отсутствие фиброза печени F0 ( $n = 66, 45\%$ ); группа 2 — минимальный фиброз F1 ( $n = 31, 21\%$ ); группа 3 — умеренный фиброз F2 ( $n = 24, 16\%$ ), группа 4 — выраженный фиброз печени F3 ( $n = 16, 11\%$ ) и группа 5 — цирроз печени F4 ( $n = 11, 7\%$ ). Корреляционный анализ степени фиброза печени и возраста пациентов

показал, что с увеличением возраста пациентов возрастает вероятность развития фиброза печени ( $R = 0,57$ ). Однако необходимо отметить, что у части пациентов с ГБ цирроз (F4) был выявлен уже к возрасту 4-5 лет, наряду с выявлением пациентов, у которых было зарегистрировано отсутствие фибротических изменений печени в возрасте старше 12 лет.

Анализ содержания Treg-клеток (% от CD4) у детей с ГБ показал, что в 50% случаев их количество соответствовало возрастной норме, в 42% случаев было снижено и только у 8% процентов пациентов было повышено относительно группы сравнения. Повышение Treg было выявлено только на стадиях фиброза F0-F1. Несмотря на то, что содержание Treg у детей с ГБ находилось на уровне нижней границы нормативных показателей или ниже, в целом по группе достоверных отличий от группы сравнения выявлено не было, вне зависимости от стадии фиброза печени (рис. 1А).

В отличие от Treg, содержание Th17-лимфоцитов и Thact было достоверно выше показателей группы сравнения при всех стадиях фиброза печени, начиная со стадии F1 (рис. 1Б, В). Данный факт свидетельствует о преобладании эффекторных и аутоагрессивных клеток над регуляторными, что согласуется с общепризнанной концепцией о нарушении баланса субпопуляций лимфоцитов и их ключевой роли в поддержа-

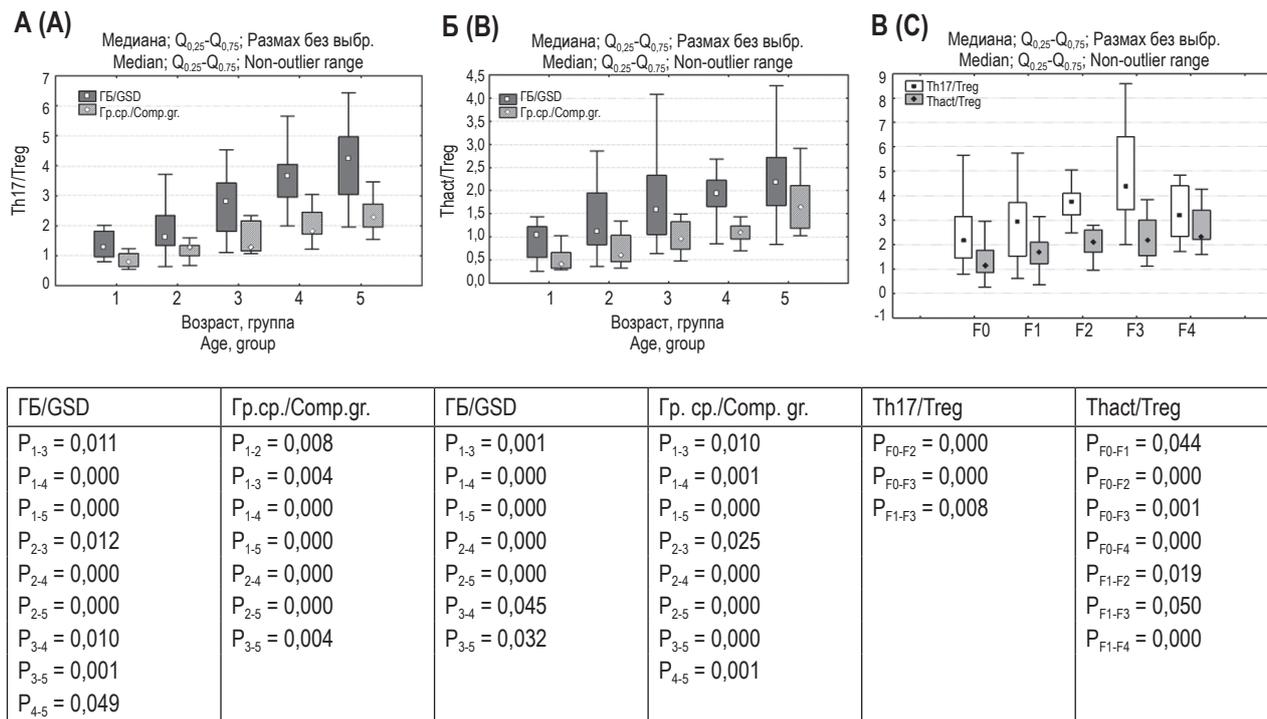


**Рисунок 1. Содержание Treg (А), Thact (Б), Treg (В) клеток (% от CD4) у детей с гликогеновой болезнью в зависимости от стадии фиброза печени в процентах от возрастных нормативных значений**

**Примечание.** Диапазон нормативных значений нанесен пунктирной линией, под рисунками приведены достоверные отличия между группами.

Figure 1. The content of Treg (A), Thact (B), Treg (C) cells (% of CD4) in children with glycogen disease, depending on the stage of liver fibrosis, as a percentage of age normative values

Note. The range of normative values is marked with a dotted line, reliable differences between groups are shown below the figures.



**Рисунок 2.** Динамика изменений соотношения Th17/Treg (А) и Thact/Treg (Б) с возрастом у детей с ГБ и в группе сравнения, изменение индексов Th17/Treg и Thact/Treg в зависимости от стадии фиброза печени (В)

Figure 2. Dynamics of changes in the ratio of Th17/Treg (A) and Thact/Treg (B) with age in children with GSD and in the comparison group, changes in the indices of Th17/Treg and Thact/Treg depending on the stage of liver fibrosis (C)

нии воспалительного процесса в тканях и органах [11].

У 54% детей с ГБ содержание Thact было выше показателей возрастных референсных значений. С увеличением стадии фиброза печени было выявлено повышение доли пациентов с содержанием Thact, превышающих верхнюю границу нормативных значений ( $P_{F0-F1} = 0,049$ ,  $P_{F0-F4} = 0,021$ , рис. 1Б).

Содержание Th17-лимфоциты у детей с ГБ было выше относительно группы сравнения в 70% случаев. С увеличением стадии фиброза печени содержание Th17-лимфоцитов достоверно росло ( $P_{F0-F4} = 0,012$ , рис. 1В). На стадии F0 содержание клеток этой популяции относительно группы сравнения было выше только у половины пациентов, а к стадии F4 – у всех детей превышало нормативные показатели в 2 раза и более (рис. 1В).

Таким образом, динамическое наблюдение за показателями малых популяций лимфоцитов можно использовать в качестве маркера степени тяжести фибротических изменений печени у детей с ГБ.

Анализ возрастной динамики соотношений Th17/Treg и Thact/Treg показал увеличение дан-

ных индексов с возрастом как у детей с ГБ, так и в группе сравнения (рис. 2А, В).

Выявлено увеличение соотношений Th17/Treg и Thact/Treg у пациентов с ГБ относительно группы сравнения у детей всех возрастных групп (рис. 2 А, Б).

У здоровых детей индекс Th17/Treg достоверно увеличивался с возрастом ( $P_{0-5} = 0,000$ ) и у детей старше 12 лет не превышал  $Me = 2,5$  (1,99–2,69). У детей с ГБ данное значение было выше уже в возрасте 6–8 лет,  $Me = 2,72$  (1,81–3,15) (3-я возрастная группа), а к возрасту 12 лет значение данного показателя составило  $Me = 4,24$  (3,04–4,97), что в 2 раза превышало показатель группы сравнения (рис. 2А).

Соотношение Thact/Treg в группе сравнения достоверно увеличивалось с возрастом ( $P_{0-5} = 0,000$ ), в возрастной группе старше 12 лет соотношение составило  $Me = 1,6$  (1,31–2,12). У детей с ГБ данный показатель характеризовался большим разбросом данных, и в возрастной группе старше 12 лет составил  $Me = 2,22$  (1,68–2,78) (рис. 2Б).

Анализ показателей в зависимости от стадии фиброза печени у детей с ГБ выявил значимое увеличение соотношения Thact/Treg от стадии F0

к стадиям F1, F2, F3 и F4 ( $P_{F0-F4} = 0,000$ ) (рис. 2В). Индекс Th17/Treg также увеличивался от стадии F0 к стадиям F1, F2, F3 ( $P_{F0-F3} = 0,000$ ). Из-за большого разброса показателей на стадии F3 отмечена лишь тенденция к снижению данного показателя к стадии F4, что требует дальнейшего изучения. По всей видимости, на изменение данного соотношения больше влияет наличие фиброза в печени, чем возраст пациента. В связи с выявленной линейной зависимостью соотношение Thact/Treg от стадии фиброза печени, можно рекомендовать использование этого индекса для

мониторинга фибротических изменений у детей с ГБ.

## Заключение

Таким образом, повышение содержания Thact и Th17-лимфоцитов, а также индексов Th17/Treg и Thact/Treg с увеличением стадии фиброза печени можно использовать как дополнительный инструмент в оценке стадии фиброза печени. Иммунологические показатели объективно отражают степень тяжести состояния пациента с печеночными формами гликогеновой болезни.

## Список литературы / References

1. Коколина В.Ф., Щербина А.Ю., Пашанов Е.Д. Иммунология детского возраста. Практическое руководство по детским болезням. М.: Медпрактика, 2006. Т. 8. 432 с. [Kokolina V.F., Shcherbina A.Yu., Pashanov E.D. Immunology of childhood. A practical guide to childhood diseases]. Moscow: Medpraktika, 2006. Vol. 8. 432 p.
2. Кулебина Е.А., Сурков А.Н., Куликов К.А., Потапов А.С., Бессонов Е.Е. Валидация показателей транзентной эластографии для оценки стадии фиброза печени у детей // Лечащий врач, 2020. № 8. С. 57-60. [Kulebina E.A., Surkov A.N., Kulikov K.A., Potapov A.S., Bessonov E.E. Validation of transient elastography cut-points for assessing the stage of liver fibrosis in children. *Lechashchiy vrach = Attending Physician*, 2020, no. 8, pp. 57-60. (In Russ.)]
3. Курбатова О.В., Купцова Д.Г., Безрукавникова Л.М., Радыгина Т.В., Мовсисян Г.Б., Анушенко А.О., Комарова А.Д., Потапов А.С., Петричук С.В., Фисенко А.П. Особенности иммунного статуса у детей с болезнью Вильсона–Коновалова при разных стадиях фиброза печени // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 453-460. [Kurbatova O.V., Kupctova D.G., Bezrukavnikova L.M., Radygina T.V., Movsisyan G.B., Anushenko A.O., Komarova A.D., Potapov A.S., Petrichuk S.V., Fisenko A.P. "Features of immune status in children with Wilson–Konovalov disease at different stages of liver fibrosis", *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology* 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 453-460. (In Russ.)]. doi: 10.46235/1028-7221-1193-FOI.
4. Курбатова О.В., Сурков А.Н., Самохина И.В., Закиров Р.Ш., Никитин А.В., Фрейдлин Е.В., Потапов А.С., Петричук С.В. Возрастная динамика показателей иммунного статуса и активности сукцинатдегидрогеназы в популяциях лимфоцитов у детей с печеночными формами гликогеновой болезни // Медицинский алфавит, 2017. Т. 1, № 6. С. 42-49. [Kurbatova O.V., Surkov A.N., Samokhina I.V., Zakirov R.S., Nikitin A.V., Freidlin E.V., Potapov P.S., Petrichuk S.V. Age dynamics of immune status indicators and activity of succinate dehydrogenase in populations of lymphocytes in children with hepatic forms of glycogen storage disease. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet*, 2017, Vol. 1, no. 6, pp. 42-49. (In Russ.)]
5. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Петричук С.В., Закиров Р.Ш., Курбатова О.В., Копыльцова Е.А., Комах Ю.А., Изменение уровня субпопуляций т-регуляторных клеток и Т-хелперов 17 в периферической крови здоровых людей в зависимости от возраста // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 409-421. [Topytygina A.P., Semikina E.L., Petrichuk S.V., Zakirov R.S., Kurbatova O.V., Kopyltsova E.A., Komakh Yu.A. Age-dependent changes of T-regulatory and Th17 subset levels in peripheral blood from healthy humans. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 409-421. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-409-421.
6. Derks T.G.J., van Rijn M. Lipids in hepatic glycogen storage diseases: pathophysiology, monitoring of dietary management and future directions. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2015, Vol. 38, pp. 537-543.
7. Gehlhaar A., Shouval D., Santiago E.G., Ling G., McCourt B., Werner L., Yerushalmi B., Konnikova L. Immune dysregulation in Glycogen Storage Disease 1b – a CyTOF approach. *Res. Sq. [Preprint]*, 2023, rs.3.rs-2598829. doi: 10.21203/rs.3.rs-2598829/v1.
8. Kakiuchi T., Zhang Y. Choice of diagnostic method for liver-type glycogen storage disease. *Clin. Case Rep.*, 2022, Vol. 10, no. 10, e06480. doi: 10.1002/ccr3.6480.
9. Massese M., Tagliaferri F., Dionisi-Vici C., Maiorana A. Glycogen storage diseases with liver involvement: a literature review of GSD type 0, IV, VI, IX and XI. *Orphanet J. Rare Dis.*, 2022, Vol. 17, no. 1, 241. doi: 10.1186/s13023-022-02387-6.
10. Patino S.C., Orrick J.A. Biochemistry, Glycogenesis. 2023 Jan 23. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

11. Roehlen N., Crouchet E., Baumert T.F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 4, 875. doi: 10.3390/cells9040875.
12. Soon G.S.T., Torbenson M. The liver and glycogen: in sickness and in health. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 7, 6133. doi: 10.3390/ijms24076133.
13. Vergano S.A.S. Inborn errors of metabolism: becoming ready for rare. *Pediatr. Rev.*, 2022, Vol. 43, no. 7, pp. 371-383.
14. Wright T.L.F., Umaña L.A., Ramirez C.M. Update on glycogen storage disease: primary hepatic involvement. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2022, Vol. 34, no. 5, pp. 496-502.

---

**Авторы:**

**Курбатова О.В.** — к.м.н., старший научный сотрудник, заведующая лабораторией экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

**Мовсисян Г.Б.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории редких наследственных болезней, врач-гастроэнтеролог гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

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

---

**Authors:**

**Kurbatova O.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

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

**Movsisyan G.B.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Rare Hereditary Diseases, Gastroenterologist, Gastroenterology Department with Hepatological Group, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

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

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

**Анушенко А.О.** — врач-гастроэнтеролог гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

**Потапов А.С.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории научных основ детской гастроэнтерологии и гепатологии, заведующий гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Anushenko A.O.**, Gastroenterologist, Gastroenterology Department with Hepatological Group, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

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

**Potapov A.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Research in Pediatric Gastroenterology and Hepatology, Head of Gastroenterology Department with Hepatology Group, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

---

Поступила 15.05.2023  
Принята к печати 29.06.2023

Received 15.05.2023  
Accepted 29.06.2023

## ОСОБЕННОСТИ ЭФФЕКТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФАГОЦИТОВ И ВЛИЯНИЕ НА НИХ ТОПИЧЕСКОЙ ЦИТОКИНОТЕРАПИИ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ

Латюшина Л.С., Малышева Л.Ю., Пиотрович А.В., Бережная Е.С.,  
Лаптева А.В.

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

**Резюме.** Ведущее место в структуре хирургической стоматологической патологии занимают одонтогенные воспалительные заболевания (хронический периодонтит, одонтогенные флегмоны) и травмы, зачастую протекающие с воспалительными осложнениями. Цель работы – провести анализ эффекторных показателей фагоцитов локального очага воспаления (отделяемого гнойной раны, содержимого лунки зуба и смешанной слюны) и оценить влияние топической цитокинотерапии на изучаемые параметры у пациентов с воспалительными стоматологическими заболеваниями – хроническим периодонтитом, одонтогенными флегмонами, осложненным переломом нижней челюсти. В рамках двухэтапного исследования комплексно обследованы 236 человек, разделенные на группы в зависимости от заболевания и метода лечения, в их числе: 74 пациента (К 04.5 – К 04.9), разделенные на группы в соответствии с формой периодонтита (хронический фиброзный, гранулирующий и гранулематозный); 102 пациента с одонтогенными флегмонами (L03.2, K12.2), которым на фоне базовой терапии на втором этапе проводили топическую цитокинотерапию беталейкином (рекомбинантный IL-1β) и ронколейкином (рекомбинантный IL-2); больные с переломом нижней челюсти, осложненным воспалительным процессом (S 02.6, n = 50), которым на втором этапе проводили топическую иммунотерапию беталейкином. Обследование пациентов с воспалительными стоматологическими заболеваниями на первом этапе работы и проведенный анализ эффекторных параметров нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов локального воспалительного очага выявил иммунологические предикторы недостаточной эффективности воспалительного ответа, проявляющиеся в абберантной функциональной активности фагоцитов: угнетение всех изучаемых показателей с выраженным снижением функционального резерва клеток у пациентов с одонтогенными флегмонами глубоких клетчаточных пространств; высокую способность к продукции активных форм кислорода со снижением

### Адрес для переписки:

Латюшина Лариса Сергеевна  
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.  
Тел.: 8 (904) 816-67-73.  
E-mail: Latyushinal@mail.ru

### Address for correspondence:

Larisa S. Latyushina  
South Ural State Medical University  
64 Vorovsky St  
Chelyabinsk  
454092 Russian Federation  
Phone: +7 (904) 816-67-73.  
E-mail: Latyushinal@mail.ru

### Образец цитирования:

Л.С. Латюшина, Л.Ю. Малышева, А.В. Пиотрович,  
Е.С. Бережная, А.В. Лаптева «Особенности  
эффекторных показателей фагоцитов и влияние на  
них топической цитокинотерапии при воспалительных  
заболеваниях челюстно-лицевой области»  
// Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26,  
№ 3. С. 345-354.  
doi: 10.46235/1028-7221-8690-COT

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

### For citation:

L.S. Latyushina, L. Yu. Malysheva, A.V. Piotrovich,  
E.S. Berezhnaya, A.V. Lapteva "Characteristics of the  
phagocyte effector indexes and effect of local cytokine  
therapy on their parameters in inflammatory diseases of the  
maxillofacial region", Russian Journal of Immunology/  
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3,  
pp. 345-354.  
doi: 10.46235/1028-7221-8690-COT

© Latyushina L.S. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-8690-COT

функционального резерва нейтрофилов у больных с осложненными нагноением костной ткани переломами; у пациентов с поражением периапикальной зоны зубов – признаки существенной активности хронического воспаления. Вторым этапом исследования, связанным с оценкой влияния топической терапией рекомбинантными цитокинами на функциональные показатели фагоцитов и анализом полученных данных, позволил обнаружить различное влияние препаратов на изучаемые параметры и при этом зарегистрировать интегральный эффект иммунотерапии, заключающийся в нормализации измененных показателей. Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать, что у пациентов с воспалительными процессами челюстно-лицевой области, которым применялась топическая цитокинотерапия, формировался более высокий эффекторный адаптивный потенциал фагоцитов локального очага.

*Ключевые слова:* топическая цитокинотерапия, флегмоны, периодонтит, перелом челюсти, нейтрофилы, макрофаги

## **CHARACTERISTICS OF THE PHAGOCYTE EFFECTOR INDEXES AND EFFECT OF LOCAL CYTOKINE THERAPY ON THEIR PARAMETERS IN INFLAMMATORY DISEASES OF THE MAXILLOFACIAL REGION**

**Latyushina L.S., Malysheva L.Yu., Piotrovich A.V., Berezhnaya E.S., Lapteva A.V.**

*South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation*

**Abstract.** Odontogenic inflammatory diseases and injuries take a leading place in the structure of surgical dental pathology. They often proceed with inflammatory complications. The aim of the present work was to analyze the effector indexes of phagocytic cells at the local area of inflammation (secretions from purulent wounds, tooth socket and mixed saliva), and to evaluate the effect of topical cytokine therapy on the studied parameters in patients with inflammatory dental diseases (chronic periodontitis, odontogenic phlegmon) complicated by mandibular fractures. As a part of a two-stage research, 236 people were comprehensively examined, divided into groups depending on their clinical disease and method of treatment. This group included 74 patients (classified as K 04.5 – K 04.9), divided into subgroups by the types of periodontitis (chronic fibrous, granulating and granulomatous form); 102 patients with phlegmon (classified as L03.2, K12.2), who, at the second stage of basic therapy, received topical cytokine treatment with betaleukin (recombinant IL-1 $\beta$ ) and roncoleukin (recombinant IL-2). Fifty patients with fractures of the lower jaw (classified as S 02.6) underwent immunotherapy with betaleukin at the second stage of treatment. Examination of patients with inflammatory dental diseases at the first stage of study and analysis of the effector indexes of neutrophilic granulocytes and macrophages from the local inflammatory foci revealed some immunological predictive signs of lacking efficiency of the inflammatory response, manifesting as aberrant functional activity of phagocytes, e.g., inhibition of all studied parameters along with sufficiently reduced functional reserve of phagocytic cells in the patients with phlegmon; high ability to produce reactive oxygen species with a decreased functional reserve of neutrophils in the patients with fractures, and signs of activated chronic inflammation in the patients with periapical lesions. The second stage of our research associated with topical therapy with recombinant cytokines and analysis of the obtained data, enabled us to detect different effects of drugs on the studied parameters and register the integral effect of immunotherapy, which represents normalization of altered functional indexes. Hence, the data obtained may indicate that, in patients with inflammatory processes in the maxillofacial region, a higher adaptive effector potential of phagocytes was formed at the affected focus following the topical cytokine therapy.

*Keywords:* local cytokine therapy, phlegmon, periodontitis, jaw fracture, neutrophils, macrophages

## Введение

Ведущее место в структуре хирургической стоматологической патологии занимают одонтогенные воспалительные заболевания – периодонтиты, остеомиелиты челюстей, абсцессы и флегмоны [1, 8]. Проблема хронического периодонтита (К 04.5 – К 04.9) сохраняет свою актуальность, поскольку ее решение сопровождается достаточно большим процентом осложнений. В настоящий период времени интерес к изучению различных аспектов периапикального воспаления возрос, в связи с активным внедрением в клиническую практику метода одномоментной (немедленной) внутрикостной дентальной имплантации, при которой существенная часть имплантатов устанавливается в инфицированную зону [7, 11, 12]. Исходя из этого, продолжается поиск патогенетически обоснованных методов профилактики осложнений и ускорения процессов остеоинтеграции в периимплантной зоне, в том числе путем оценки функциональных показателей фагоцитов воспалительного локального периапикального очага.

Статистические данные по структуре стоматологической заболеваемости свидетельствуют, что пациенты с одонтогенными воспалительными процессами составляют до 54% от общей когорты стационарных больных челюстно-лицевых стационаров, с преобладанием пациентов с флегмонами лица (L03.2, K12.2) [1, 8]. Несмотря на внедрение современных методов профилактики и лечения, отмечается устойчивая тенденция к увеличению числа пациентов с тяжелым течением, со склонностью либо к агрессивному течению, либо к хронизации гнойного процесса. Данный феномен связывают в том числе с повышением роли условно-патогенных микроорганизмов, проявляющих патогенные действия в ситуации супрессии иммунной защиты организма. В этой связи изучение эффекторных характеристик фагоцитов пораженных воспалением тканей позволит проводить полноценное патогенетическое лечение данной категории пациентов [3, 4].

Среди травматических поражений лица наиболее распространен перелом нижней челюсти (S 02.6), при этом подавляющая часть пациентов госпитализируются с воспалительными осложнениями, в том числе с травматическим остеомиелитом. Известно, что развитие внутрикостных деструктивных процессов и их распространение тесно связаны с состоянием иммунитета, прежде всего с параметрами мукозального иммунитета полости рта [6].

Т.е. заболевания, удельный вес которых в структуре стоматологической патологии весьма существенен, отмечены изменениями иммунологических показателей, которые оказывают

влияние на их течение и исход. Одним из ведущих составляющих местной иммунологической реактивности являются функциональные показатели нейтрофилов и макрофагов локального очага воспаления: отделяемого гнойной раны, содержимого лунки удаленного зуба и смешанной слюны [5] – отражающих состояние иммунитета на локальном уровне. На сегодняшний день, комплексная терапия воспалительных стоматологических заболеваний все чаще дополняется иммунотерапией, в том числе топической цитокиноterapiей, направленной на нивелирование нарушений иммунитета [3, 6].

**Цель работы** – провести анализ эффекторных показателей фагоцитов локального очага воспаления (отделяемого гнойной раны, содержимого лунки зуба и смешанной слюны) и оценить влияние топической цитокиноterapiи на изучаемые параметры у пациентов с воспалительными стоматологическими заболеваниями – хроническим периодонтитом, одонтогенными флегмонами, осложненным переломом нижней челюсти.

## Материалы и методы

Работа была проведена на кафедре хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии и в научно-исследовательском институте иммунологии ФГБОУ ВО «ЮУГМУ» Минздрава России. В двухэтапное исследование были включены 236 человек, которым провели комплексное обследование: первый этап – проспективное обследование пациентов; второй этап – рандомизированное, краткосрочное, проспективное, простое, «слепое», плацебо-контролируемое исследование по оценке эффективности топической цитокиноterapiи. В их числе 74 пациента с диагнозами К 04.5 – К 04.9 в сопоставление с классификацией И.Г. Лукомского (1955) (хронический фиброзный, гранулирующий и гранулематозный периодонтит), которые были включены только в первый этап исследования с разделением на группы в зависимости от формы заболевания: ХФП группа (n = 27), с фиброзным поражением периапикальной зоны; ХГщП группа (n = 14) – больные с хроническим гранулирующим периодонтитом; ХГП группа (n = 24) – обследуемые с хроническим гранулематозным периодонтитом; контрольная группа (1КГ), пациенты с интактными зубами, удаленными по ортодонтическим показаниям (n = 9). Забор биологического материала (раневого отделяемого лунки) проводился непосредственно после удаления зуба. Вторая когорта обследованных – 102 пациента с установленным диагнозом L03.2, K12.2, с локализацией одонтогенного гнойного процесса в глубоких клетчаточных пространствах, у кото-

рых проводилось изучение отделяемого ран, и на втором этапе были сформированы: группа сравнения (2ГС,  $n = 29$ ), с традиционными комплексными лечебными мероприятиями [1]; две основные группы – 2рОГ,  $n = 28$  – пациентам которой в послеоперационном периоде проводилась цитокиноterapia ронколейкином (рекомбинантный IL-2 человека, регистрационный номер № ПВР-1-2.3/01285 от 15.05.09, ООО «Биотех», Россия) по разработанной схеме (Пат. № 2361607 Рос. Федерация); 2бОГ,  $n = 18$  – пациенты которой в послеоперационном периоде получали топическое лечение беталейкином (рекомбинантный IL-1 $\beta$ , регистрационный номер № N000222/01 от 20.12.07, Гос. НИИ ОЧБ ФМБА ФГУП, Россия); контрольная группа (2КГ) – 27 пациентов с ранами, заживших первичным натяжением. Также изучение функциональных показателей фагоцитов в нестимулированной смешанной слюне провели у 50 больных с осложненными переломами нижней челюсти, на втором этапе представленные двумя группами: группой сравнения (3ГС,  $n = 25$ ) – с общепринятым комплексом лечения [1] и основной группой (3ОГ), 25 пациентам которой базовый комплекс усилили топической цитокиноterapiей гелем «Колетекс-Бета» с рекомбинантным IL-1 $\beta$  (Патент № 2599509 Рос. Федерация); контрольную группу (3КГ) представили 10 клинически здоровых добровольцев. Больные в группах соответствовали критериям включения и исключения, были сопоставимы по гендерно-возрастным признакам, локализации и степени тяжести патологического процесса.

Определяли функциональные параметры нейтрофилов и макрофагов: оценку фагоцитарной функции; способность к спонтанной и индуцированной продукции активных форм кислорода (АФК); лизосомальную активность [2]. Биологический материал забирался во время операции удаления зуба (К 04.5 – К 04.9), в первые сутки после операции вскрытия флегмоны, при поступлении в стационар (S 02.6) и в динамике (на 8-10-е сутки стационарного лечения). Статистическую обработку показателей проводили, используя критерии Манна–Уитни, Вилкоксона и Краскела–Уоллиса, при  $p \leq 0,05$ , с использованием пакета прикладных компьютерных программ SPSS Statistics 17,0.

## Результаты и обсуждение

Сравнение эффекторных характеристик нейтрофилов отделяемого лунки пациентов с хроническим периапикальным воспалением с данными контроля позволило определить статистически значимые различия по всем изучаемым параметрам (табл. 1). У пациентов с различными

формами хронического периодонтита в сравнении с контрольными показателями выявилось существенное увеличение фагоцитарной активности и интенсивности, фагоцитарного числа, спонтанной и индуцированной активности и интенсивности в продукции АФК, т. е. обнаружена одноплановая абберантная функциональная активность фагоцитов. При этом выявлены статистические различия между группами пациентов с периодонтитом: определены различия между в группах ХФП и ХГП в показателе интенсивности индуцированной НСТ-реакции и между данными групп ХГП и ХГщП по фагоцитарному числу.

Исследование параметров функций фагоцитов гнойной раны у пациентов с одонтогенным воспалением мягких тканей позволило выявить исходное ослабление фагоцитарной и НСТ-редуцирующей активности и интенсивности, функционального резерва раневых поли- и мононуклеаров при высоких значениях индекса суммарной люминесценции лизосом (табл. 2, 3). К концу первой недели комплексного традиционного лечения изменений в исходных данных пациентов 2ГС выявлено не было, за исключением снижения индуцированного кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов (2-е сутки – 1,3 (0,7-1,7) у. е.,  $p = 0,01$  с 2КГ; 8-е сутки – 1,25 (0,9-1,5) у. е.,  $p = 0,002$  с 2КГ (1,75 (1,3-2,05) у. е.), что, вероятно, приводило к еще более выраженному падению продукции кислородзависимых биоцидных эффекторов и создавало условия для сохранения в ране патогенной флоры. В те же сроки у пациентов, пролеченных рекомбинантными цитокинами, был выявлен ряд изменений в эффекторных показателях фагоцитов раны: повышалась лизосомальная активность у пациентов обеих основных групп; отмечен рост поглотительной активности и интенсивности нейтрофилов и макрофагов (последних при лечении ронколейкином); определен рост числа фагоцитов на фоне терапии рекомбинантным IL-2; усилились все изучаемые параметры НСТ-редуцирующей функции фагоцитов при топической терапии беталейкином и интенсивность индуцированной НСТ-реакции фагоцитов при терапии ронколейкином; существенно вырос функциональный резерв фагоцитов в обеих основных группах на фоне продолжающегося угнетения резервного эффекторного потенциала у пациентов, получавших традиционных комплексных лечебных мероприятий.

Изучение результатов показателей мукозального иммунитета слюны у пациентов с переломами нижней челюсти с воспалительными осложнениями позволило исходно определить: высокое содержание жизнеспособных лейкоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) (3ГС 18,95 (11,8-32,8),  $p = 0,001$  с контролем; 3ОГ

**ТАБЛИЦА 1. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ СОДЕРЖИМОГО ЛУНКИ ЗУБА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПЕРИОДОНТИТОМ**

TABLE 1. FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN THE CONTENTS OF THE TOOTH SOCKET OF PATIENTS WITH CHRONIC PERIODONTITIS

Наименование показателя Name of the indicator	Пациенты с хроническим фиброзным периодонтитом Patients with chronic fibrous periodontitis n = 27	Пациенты с хроническим гранулирующим периодонтитом Patients with chronic granulating periodontitis n = 14	Пациенты с хроническим гранулематозным периодонтитом Patients with chronic granulomatous periodontitis n = 24	1-я контрольная группа 1 <sup>st</sup> control group n = 9
Активность фагоцитоза, % Phagocytosis activity, %	54,5 (40,0-65,5)*	49 (37-59)*	50 (40-60)*	20 (10-34)
Интенсивность фагоцитоза, у. е. Intensity of phagocytosis, c. u.	1,23 (0,69-1,75)*	1,06 (0,76-1,47)*	0,8 (0,6-1,2)*	0,25 (0,10-0,62)
Фагоцитарное число, у. е. Phagocytic number, c. u.	2,22 (1,65-2,75)*	2,15 (1,95-2,67)**	1,70 (1,33-2,67)	1,24 (1,04-2,35)
НСТ-спонт., у. е. NBT-spontaneous, c. u.	1,13 (1,00-1,35)*	1,14 (0,93-1,47)*	1,3 (1,15-1,54)*	0,28 (0,10-0,71)
НСТ-спонт., % NBT-spontaneous, %	87,5 (80-93)*	85 (77,0-91,5)*	90 (85-100)*	27,5 (10-50)
НСТ-индуц., у. е. NBT-induced, c. u.	1,14 (0,85-1,40)* ***	1,3 (1,24-1,55)*	1,4 (1,24-1,55)*	0,43 (0,19-0,71)
НСТ-индуц., % NBT-induced, %	89 (79-100)*	91 (81-99)*	96 (90-100)*	37,5 (18,75-55,00)

Примечание. \* – статистически значимые различия между группами пациентов с группой контроля ( $p \leq 0,05$ ); \*\* – статистически значимые различия между группами ХГщП и ХГП ( $p \leq 0,05$ ); \*\*\* – статистически значимые различия между группами ХФП и ХГП ( $p \leq 0,05$ ).

Note. \*, statistically significant differences between groups of patients with the control group ( $p \leq 0.05$ ); \*\*, statistically significant differences between groups of chronic granulating periodontitis and chronic granulomatous periodontitis ( $p \leq 0.05$ ); \*\*\*, statistically significant differences between the groups of chronic fibrous periodontitis and chronic granulomatous periodontitis ( $p \leq 0.05$ ).

20,25 (13,1-32,8),  $p = 0,002$  с контролем; ЗКГ 13,6 (4,7-15,6)); отсутствие статистически значимых с контрольными значениями различий в изучаемых показателях фагоцитоза нейтрофилов; превышающие контрольные данные активности и интенсивности НСТ-спонтанного теста (ЗГС: 22 (16-35)%,  $p = 0,0006$  с контролем; 0,23 (0,16-0,4) у. е.,  $p = 0,03$  с контролем; ЗОГ: 22 (16-34) %,  $p = 0,004$  с контролем; 0,23 (0,18-0,4) у. е.,  $p = 0,03$  с контролем; ЗКГ: 12 (10-18) %, 0,12 (0,10-0,22) у. е.); сниженный показатель функционального резерва нейтрофилов, свидетельствующий об исходной низкой реактивности бактерицидных параметров (ЗГС: 1,2 (1,03-1,60) у. е.,  $p = 0,0025$

с контролем; ЗОГ: 1,1 (1-1,57) у. е.,  $p = 0,0004$  с контролем; ЗКГ: 1,6 (1,5-1,8) у. е.). В процессе традиционной комплексной терапии было выявлено: снижение до данных контроля сливаторного содержания жизнеспособных лейкоцитов; показателей продукции АФК и функционального резерва нейтрофилов; стойкое отсутствие колебаний в значениях, отражающих активность и интенсивность поглотительной функции нейтрофилов. Топическое применение беталейкина в комплексной терапии пациентов с осложненными переломами позволило зарегистрировать следующие изменения в эффекторных показателях нейтрофильных гранулоцитов: сохранение вы-

**ТАБЛИЦА 2. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ГНОЙНОЙ РАНЫ ПАЦИЕНТОВ С ОДОНТОГЕННЫМИ ФЛЕГМОНАМИ**

TABLE 2. FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN A PURULENT WOUND IN PATIENTS WITH ODONTOGENIC PHLEGMON

Показатель Name of the indicator	2-я группа сравнения 2 <sup>nd</sup> comparison group n = 29	2 рОГ (группа с применением ронколейкина) 2 rOG (roncoleukin group) n = 28	2 БОГ (группа с применением беталейкина) 2 bOG (betaleukin group) n = 18	2-я контрольная группа 2 <sup>nd</sup> control group n = 27
<b>2-е сутки / 8-е сутки</b> 2 <sup>nd</sup> day / 8 <sup>th</sup> day				
<b>Активность фагоцитоза, %</b> Phagocytosis activity, %	50 (36-60)	50 (40-65)	40 (30-55)	50 (40-50)
	50 (40-60)	60 (42-70)*	62 (40-72)*	
<b>Интенсивность фагоцитоза, у. е.</b> Intensity of phagocytosis, c. u.	1,9 (1,7-3,3)	1,9 (1,4-3,7)	1,51 (1,9-3,2)	1,36 (1,20-1,97)
	1,8 (1,5-2,2)	3,2 (2,3-4,6)*	1,96 (1,6-2,5)*	
<b>Фагоцитарное число, у. е.</b> Phagocytic number, c. u.	4,5 (4-6)	4 (3,6-5,5)	2,7 (1,20-3,55)	3,2 (2,7-5,0)
	4,6 (4,3-5,0)	4,8 (4,6-6,7)*	3,085 (2,35-4,70)	
<b>Функциональный резерв, у. е.</b> Functional reserve, c. u.	1,2 (1,04-1,40)	1,2 (1,1-1,4)*	1,07 (0,80-1,27)*	1,45 (1,30-1,61)
	1,23 (1,1-1,5)	1,55 (1,4-1,8)**	1,48 (1,09-1,73)** ***	
<b>Индекс суммарной люминесценции лизосом, у. е.</b> Total luminescence index of lysosomes, c. u.	160 (94-446)	212 (175-512)	190 (157-315)	172 (140-220)
	295,5 (152-526)	505 (297-635)* ** ***	342 (197-622)*	

Примечание. \* – статистически значимые различия между группами пациентов с группой контроля ( $p \leq 0,05$ ); \*\* – статистически значимые различия между основными группами и группой сравнения ( $p \leq 0,05$ ); \*\*\* – статистически значимые различия по срокам внутри группы ( $p \leq 0,05$ ).

Note. \*, statistically significant differences between groups of patients with the control group ( $p \leq 0.05$ ); \*\*, statistically significant differences between the main groups and the comparison group ( $p \leq 0.05$ ); \*\*\*, statistically significant differences within the group in terms of timing ( $p \leq 0.05$ ).

сокого числа жизнеспособных лейкоцитов ( $17,75 (10,4-35,9) \times 10^9/\text{л}$ ), вероятно, связанное с проявлениями кратковременного обострения воспалительного процесса на фоне цитокинотерапии; нормализацию показателей НСТ-редуцирующей реакции и функционального резерва нейтрофильных гранулоцитов (ЗОК –  $1,8 (1,2-2,3)$  у. е.,  $p = 0,001$  с исходными показателями).

Анализ данных первого этапа исследования выявил у пациентов со воспалительной стоматологической патологией абберантную функциональную активность фагоцитов с признаками сниженной эффективности воспалительной реакции [3, 4, 13]. Ранее доказано, что в базисе подобного феномена фиксируются измененные функции фагоцитов, поскольку именно от них во многом зависят элиминация микробных агентов

и урон, связанный с гиперреактивностью бактерицидного действия [4, 10]. Наиболее выраженные отклонения были определены у пациентов с одонтогенными флегмонами – анализ полученных результатов проводился с учетом повышенной чувствительности фагоцитов гнойного очага (праймирования) [10] и было выявлено, что у раневых поли- и мононуклеаров определялись либо более низкие, либо не отличающиеся от контроля данные, что, в связи с вышеизложенным, резюмировалось как угнетение эффекторных характеристик. У данной категории больных и у пациентов с осложненными переломами был выявлен сниженный функциональный резерв нейтрофильных гранулоцитов, свидетельствующий о недостаточном бактерицидном потенциале системы и нарушенной способности этих

**ТАБЛИЦА 3. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ ГНОЙНОЙ РАНЫ ПАЦИЕНТОВ С ОДОНТОГЕННЫМИ ФЛЕГМОНАМИ**

TABLE 3. FUNCTIONAL ACTIVITY OF MACROPHAGES IN PURULENT WOUNDS IN PATIENTS WITH ODONTOGENIC PHLEGMON

Показатель Name of the indicator	2-я группа сравнения 2 <sup>nd</sup> comparison group n = 29	2 рОГ (группа с применением ронколейкина) 2 rOG (roncoleukin group) n = 28	2 БОГ (группа с применением беталейкина) 2 bOG (betaleukin group) n = 18	2-я контрольная группа 2 <sup>nd</sup> control group n = 27
2-е сутки / 8-е сутки 2 <sup>nd</sup> day / 8 <sup>th</sup> day				
Активность фагоцитоза, % Phagocytosis activity, %	40 (33-54)	40 (40-52)	44 (41-50)	40 (40-50)
	50 (40-70)	65 (60-80)* ** ****	53 (31,50-60,00)	
Интенсивность фагоцитоза, у. е. Intensity of phagocytosis, c. u.	1,65 (1,0-1,8)	1,8 (1,5-3,5)	0,9 (0,85-0,90)	1,3 (1,14-1,90)
	1,96 (1,2-2,2)	3,4 (2,3-4,1)* *** ****	1,25 (0,97-2,10)	
Фагоцитарное число, у. е. Phagocytic number, c. u.	4,2 (3,1-4,8)	4,2 (3,2-4,9)	2,8 (1,75-3,30)	3,21 (2,57-4,50)
	4,1 (3,5-5,2)	4,5 (4,1-5,6)*	3,7 (2,9-4,2)	
Функциональный резерв, у. е. Functional reserve, c. u.	1,2 (1,09-1,60)*	1,16 (1,00-1,33)*	1,09 (0,90-1,35)*	1,6 (1,30-1,74)
	1,2 (0,8-1,5)*	1,5 (1,33-1,60)**	1,47 (1,00-1,67)	
Индекс суммарной люминесценции лизосом, у. е. Total luminescence index of lysosomes, c. u.	180 (80-338)*	140 (72-180)	125 (110-165)*	87 (69-108)
	140 (128-272)*	200 (180-290)* **	264 (112-350)*	

Примечание. \* – статистически значимые различия между группами пациентов с группой контроля ( $p \leq 0,05$ ); \*\* – статистически значимые различия между основными группами и группой сравнения ( $p \leq 0,05$ ); \*\*\* – статистически значимые различия внутри группы по срокам ( $p \leq 0,05$ ); \*\*\*\* – статистически значимые различия между основными группами ( $p \leq 0,05$ ).

Note. \*, statistically significant differences between groups of patients with the control group ( $p \leq 0.05$ ); \*\*, statistically significant differences between the main groups and the comparison group ( $p \leq 0.05$ ); \*\*\*, statistically significant differences within the group in terms of timing ( $p \leq 0.05$ ); \*\*\*\*, statistically significant differences between the main groups ( $p \leq 0.05$ ).

клеток отвечать на стимуляцию усилением дыхательных процессов с образованием ферментов, в том числе бактерицидных, что, в свою очередь, создает благоприятные условия для сохранения патогенных микроорганизмов в зоне первичного воспалительного очага и присоединения нозокомиальной инфекции [4, 9, 10]. Т. е. определены предпосылки перехода гнойного раневого процесса у пациентов с флегмонами в вялотекущую, длительно незаживающую форму, а у пациентов с воспалительными осложнениями переломов – в травматический остеомиелит. Известно, что деструктивные формы хронического периодонтита характеризуется дисбалансом локальных адаптивных и врожденных иммунологических реакций [11]. Изучение эффекторных показате-

лей нейтрофильных гранулоцитов содержимого лунки удаленных зубов пациентов с различными формами хронического периодонтита выявило однонаправленные функциональные характеристики, связанные с активностью хронического воспаления, что, вероятно, связано с длительной контаминацией периапикальной зоны, которая в постэкстракционном периоде может приводить к угнетению эффекторных показателей.

На втором этапе исследования был обнаружен интегральный эффект топической цитокинотерапии при вышеуказанных воспалительных заболеваниях, заключающийся в нормализации выявленной исходно абберантной функции фагоцитов, несмотря на различный механизм действия применяемых рекомбинантных цито-

кинов [3, 6]. Иммуноterapia гнойных ран при флегмонах и осложненных переломах нижней челюсти беталейкином приоритетно восстанавливала: индекс люминесценции лизосом; фагоцитарные показатели нейтрофильных гранулоцитов; продукцию клетками АФК; функциональный резерв, указывающий на адекватность резервного потенциала лейкоцитов местного воспалительного очага после проведенной цитокинотерапии. Ронколейкин, введенный в гнойные раны, способствовал повышению: лизосомальной и фагоцитарной активности; функциональному резерву; интенсивности индуцированного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов раны, что может свидетельствовать о достаточном биоцидном потенциале раневых фагоцитов, а значит возможности к существо-

вой генерации АФК и перекисей, что усиливает деконтаминацию гнойной раны [13].

## Заключение

Таким образом, подводя итоги работы, можно заключить, что по результатам исследования у пациентов с воспалительными стоматологическими заболеваниями были выявлены иммунологические предикторы низкой эффективности воспалительного ответа. Обнаружен интегральный эффект топической цитокинотерапии при вышеуказанных воспалительных стоматологических заболеваниях, заключающийся в нормализации измененных функциональных показателей и формировании более высокого эффекторного адаптивного потенциала фагоцитов локального очага.

## Список литературы / References

1. Абрамян С.В., Андреев С.Н., Аржанцев А.П., Арутюнов А.С., Афанасьев В.В., Грудянов А.И., Гурин А.Н., Дробышев А.Ю., Дурново Е.А., Панин А.М., Рабинович С.А., Семин В.А.; под редакцией академика РАН А.А. Кулакова. Челюстно-лицевая хирургия: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 691 с. [Abramyan S.V., Andreev S.N., Arzhantsev A.P., Arutyunov A.S., Afanasiev V.V., Grudyanov A.I., Gurin A.N., Drobishev A.Yu., Durnovo E.A., Panin A.M., Rabinovich S.A., Semin V.A.; ed. Academician A.A. Kulakov. Oral and Maxillofacial Surgery: National Guide]. Moscow: GEOTAR-Media, 2019. 691 p.
2. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: Издательство РАМН, 2009. 208 с. [Dolgushin I.I., Andreeva Yu.S., Savochkina A.Yu. Neutrophil traps and methods for assessing the functional status of neutrophils]. Moscow: Publishing House of the Russian Academy of Medical Sciences, 2009. 208 p.
3. Долгушин И.И., Латюшина Л.С. Влияние местного лечения ронколейкином на течение гнойного раневого процесса и функциональную активность раневых фагоцитов у пациентов с одонтогенными флегмонами // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 1. С. 95-100. [Dolgushin I.I., Latyushina L.S. Influence of local treatment with roncoleukin on the course of purulent wound process and the functional activity of wound phagocytes in patients with odontogenic phlegmon. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 1, pp. 95-100. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2009-1-95-100.
4. Дурново Е.А. Сравнительный анализ функциональной активности нейтрофилов крови и ротовой полости у больных с гнойно-воспалительным процессом в полости рта // Стоматология, 2005. № 3. С. 29-32. [Durnovo E.A. Comparative analysis of the functional activity of blood and oral cavity neutrophils in patients with suppurative inflammatory process in the oral cavity. *Stomatologiya = Stomatology*, 2005, no. 3, pp. 29-32. (In Russ.)]
5. Козлов И.Г. Микробиота, мукозальный иммунитет и антибиотики: тонкости взаимодействия // Российский медицинский журнал, 2018. Т. 26, № 8-1. С. 19-27. [Kozlov I.G. Microbiota, mucosal immunity and antibiotics: subtleties of interaction. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation*, 2018, Vol. 26, no. 8-1, pp. 19-27. (In Russ.)]
6. Латюшина Л.С., Бережная Е.С., Долгушин И.И. Влияние иммунотерапии рекомбинантным IL-1 $\beta$  на клинико-иммунологические показатели пациентов с осложненными переломами нижней челюсти // Проблемы стоматологии, 2017. Т. 13, № 2. С. 49-53. [Latyushina L.S., Berezhnaya E.S., Dolgushin I.I. The effect of immunotherapy with recombinant IL-1 $\beta$  on the clinical and immunological parameters of patients with complicated mandibular fractures. *Problemy stomatologii = Dentistry Problems*, 2017, Vol. 13, no 2, pp. 49-53. (In Russ.)]
7. Латюшина Л.С., Долгушин И.И., Лаптева А.В., Колбина Е.В., Финадеев А.П., Павлиенко Ю.В. Особенности эффекторных показателей фагоцитов и микробиологических параметров локального очага периапикального воспаления при различных формах хронического периодонтита // Проблемы стоматологии, 2021. № 17 (2). С. 96-102. [Latyushina L.S., Dolgushin I.I., Lapteva A.V., Kolbina E.V., Finadeev A.P., Pavlienko Yu.V. Features of the effector parameters of phagocytes and microbiological parameters of the local focus of periapical inflammation in various forms of chronic periodontitis. *Problemy stomatologii = Problems of Dentistry*, 2021, no. 17 (2), pp. 96-102. (In Russ.)]
8. Латюшина Л.С., Алабугин А.В., Насонов А.А., Миндели Н.В., Бобрышева А.Д. Анализ структуры хирургических заболеваний ЧЛО в условиях госпитализации детского и взрослого населения Южного

Урала // Проблемы стоматологии. – 2021 № 17 (2). – С. 89-95. [Latyushina L.S., Alabugin A.V., Nasonov A.A., Mindeli N.V., Bobrysheva A.D. Analysis of the structure of surgical diseases of the maxillofacial region in the conditions of hospitalization of children and adults in the Southern Urals. *Problemy stomatologii = Problems of Dentistry*, 2021, no. 17 (2), pp. 89-95. (In Russ.)]

9. Маянский, Д.Н. Хроническое воспаление. М.: Медицина, 1991. 272 с. [Mayansky D.N. Chronic inflammation]. Moscow: Meditsina, 1991. 272 p.

10. Маянский А.Н., Маянский Н.А., Заславская М.А. Апоптоз нейтрофилов // Иммунология, 1999. Т. 20, № 6. С. 12-19. [Mayansky A.N., Mayansky N.A., Zaslavskaya M.A. Neutrophil apoptosis *Immunologiya = Immunology*, 1999, Vol. 20, no. 6, pp. 12-19. (In Russ.)]

11. Митронин А.В., Робустова Т.Г., Максимовский Ю.М., Лебедев К.А., Понякина И.Д. Клинико-иммунологическая характеристика деструктивных форм хронического периодонтита // Российский стоматологический журнал, 2005. № 1. С. 29-34. [Mitronin A.V., Robustova T.G., Maksimovsky Yu.M., Lebedev K.A., Ponyakina I.D. Clinical and immunological characteristics of destructive forms of chronic periodontitis. *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal = Russian Dental Journal*, 2005, no. 1, pp. 29-34. (In Russ.)]

12. Раад З. Результаты непосредственной дентальной имплантации после удаления зубов по поводу хронического периодонтита и тяжелой формы генерализованного пародонтита // Естественные и технические науки, 2009. № 2 (40). С. 164-169. [Raad Z. Results of direct dental implantation after tooth extraction for chronic periodontitis and severe generalized periodontitis. *Estestvennye i tekhnicheskie nauki = Natural and Technical Sciences*, 2009, no. 2 (40), pp. 164-169. (In Russ.)]

13. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999. 602 с. [Yarilin A.A. Fundamentals of immunology]. Moscow: Meditsina, 1999. 602 p.

---

**Авторы:**

**Латюшина Л.С.** – д.м.н., доцент, заведующая кафедрой хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Малышева Л.Ю.** – к.м.н., доцент кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Authors:**

**Latyushina L.S.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Malysheva L. Yu.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Пиотрович А.В.** — к.м.н., доцент кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Бережная Е.С.** — ассистент кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Лаптева А.В.** — ассистент кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Piotrovich A.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Berezhnaya E.S.**, Assistant Professor, Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Lapteva A.V.**, Assistant Professor, Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

---

Поступила 03.05.2023  
Принята к печати 29.06.2023

Received 03.05.2023  
Accepted 29.06.2023

## **ДИНАМИКА МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ИХ ТКАНЕВЫХ ИНГИБИТОРОВ У ПАЦИЕНТОК С ГЕРПЕСВИРУСНОЙ И ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ**

**Невежкина Т.А.<sup>1</sup>, Черникова М.А.<sup>1</sup>, Маркелова Е.В.<sup>1</sup>, Тулупова М.С.<sup>2</sup>,  
Костюшко А.В.<sup>1</sup>, Федянина Л.Н.<sup>3</sup>, Маркова Н.Ю.<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup> ООО «Парацельс», г. Владивосток, Россия

<sup>3</sup> ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

**Резюме.** Инфекции, передаваемые половым путем, имеют большое значение в реализации репродуктивной функции женщин. Хронический воспалительный процесс приводит к репродуктивным нарушениям. Особая роль в хроническом воспалительном процессе отведена папилломавирусной (ПВИ) и герпетической инфекции. MMP-2 и MMP-9 гидролизуют коллаген 4-го типа, являющегося основой базальных мембран, и способствуют отделению эндотелиальных клеток от мембран с дальнейшей их миграцией и непосредственном участии в ангиогенезе, что влияет на рост опухолей, в частности рака шейки матки. Известно, что тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ ограничивают расщепление коллагена, но нарушение равновесия MMP и TIMP сопровождается накоплением внеклеточного матрикса и риск репродуктивных нарушений возрастает. Цель исследования: проанализировать динамику острофазных белков, влияющих на состояние межклеточного матрикса (металлопротеиназ-2, металлопротеиназ-9 и их тканевых ингибиторов 1-го, 2-го типа), в сыворотке крови пациенток с ПВИ или коинфекции ПВИ и ВПГ до и после терапии препаратами с противовирусным и иммуномодулирующим действием: синтетического (Inosine pranobex) и растительного (*Solanum tuberosum*) происхождения. Проведено обследование 141 пациентки с папилломавирусной и герпетической инфекциями, получавших терапию препаратами с действующим веществом Inosine pranobex и *Solanum tuberosum*. Определение уровней MMP-2, MMP-9 и TIMP-1, TIMP-2 в сыворотке

### **Адрес для переписки:**

Невежкина Татьяна Андреевна  
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
690033, Россия, г. Владивосток, пр. 100 лет  
Владивостоку, 62, кв. 20.  
Тел.: 8 (914) 672-89-45.  
E-mail: [www.tanya.ru9292@mail.ru](mailto:www.tanya.ru9292@mail.ru)

### **Address for correspondence:**

Tatiana A. Nevezhkina  
Pacific State Medical University  
62 100 let Vladivostoku Ave, Apt 20  
Vladivostok  
690033 Russian Federation  
Phone: +7 (914) 672-89-45.  
E-mail: [www.tanya.ru9292@mail.ru](mailto:www.tanya.ru9292@mail.ru)

### **Образец цитирования:**

Т.А. Невежкина, М.А. Черникова, Е.В. Маркелова,  
М.С. Тулупова, А.В. Костюшко, Л.Н. Федянина,  
Н.Ю. Маркова «Динамика матриксных  
металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов  
у пациенток с герпесвирусной и папилломавирусной  
инфекцией» // Российский иммунологический журнал,  
2023. Т. 26, № 3. С. 355-362.  
doi: 10.46235/1028-7221-9409-DOM

© Невежкина Т.А. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

T.A. Nevezhkina, M.A. Chernikova, E.V. Markelova,  
M.S. Tulupova, A.V. Kostyushko, L.N. Fedyanina,  
N.I. Markova "Dynamics of matrix metalloproteinases  
and their tissue inhibitors in patients with herpesvirus and  
papillomavirus infection", Russian Journal of Immunology/  
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3,  
pp. 355-362.  
doi: 10.46235/1028-7221-9409-DOM

© Nevezhkina T.A. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-9409-DOM

крови проводили с помощью специфических реактивов фирмы R&D Diagnostics Inc. (США). Применение терапии препаратами с действующим веществом Inosine pranobex и *Solanum tuberosum* показали положительную динамику по уровню MMP-2, MMP-9 и тканевых ингибиторов 1-го и 2-го типов во всех исследуемых группах. Однако Inosine Pranobex способствует более выраженным изменениям, особенно в группах с ассоциациями инфекций.

*Ключевые слова:* вирус папилломы человека, герпетическая инфекция, межклеточный матрикс, тканевые ингибиторы, матриксные металлопротеиназы, противовирусная терапия

## DYNAMICS OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR TISSUE INHIBITORS IN PATIENTS WITH HERPESVIRUS AND PAPILOMAVIRUS INFECTION

Nevezhkina T.A.<sup>a</sup>, Chernikova M.A.<sup>a</sup>, Markelova E.V.<sup>a</sup>, Tulupova M.S.<sup>b</sup>, Kostyushko A.V.<sup>a</sup>, Fedyanina L.N.<sup>c</sup>, Markova N.I.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

<sup>b</sup> Paracelsus LLC, Vladivostok, Russian Federation

<sup>c</sup> Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

**Abstract.** Sexually transmitted infections are of great importance for the proper reproductive function in women. Chronic inflammatory process leads to reproductive disorders. A special role in the chronic inflammatory process is attributed to papillomavirus (PVI) and herpetic infection. MMP-2 and MMP-9 enzymes cleave type 4 collagen which makes the scaffold of basement membranes and contributes to the separation of endothelial cells from the membranes, followed by their further migration and direct participation in angiogenesis thus affecting the growth of tumors, in particular cervical cancer. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases are known to limit the collagen breakdown. However, the imbalance of MMP and TIMP is accompanied by accumulation of extracellular matrix and increased risk for reproductive disorders. The aim of our study was to evaluate the dynamics of acute-phase proteins affecting the state of intercellular matrix (MMP-2, MMP-9 and MMP tissue inhibitors (type 1, 2) in blood serum of patients with PVI or coinfection of PVI and HSV before and after therapy with drugs exhibiting antiviral and immunomodulatory effects, i.e., a synthetic compound (Inosine pranobex) and vegetable substance (*Solanum tuberosum*). We have examined 141 patients with papillomavirus and herpetic infections treated with Inosine pranobex and *Solanum tuberosum*. Determination of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1, TIMP-2 levels of in blood serum was carried out using specific reagents from R&D Diagnostics Inc. (USA). The drug therapy with active substances of Inosine pranobex and *Solanum tuberosum* was associated with positive dynamics of the level of MMP-2, MMP-9 and tissue inhibitors of types 1 and 2 in all groups under studies. However, Inosine Pranobex exerts more pronounced changes, especially in subgroups with viral coinfections.

*Keywords:* human papillomavirus, herpetic infection, intercellular matrix, tissue inhibitors, matrix metalloproteinases, antiviral therapy

### Введение

Инфекции, передаваемые половым путем, имеют большое значение в реализации репродуктивной функции женщин. Хронический воспалительный процесс приводит к репродуктивным нарушениям, а именно бесплодию 1-го и 2-го типов, невынашиванию беременности, самопро-

извольным абортam, преждевременным родам и ряду других осложнений, связанных с зачатием и пролонгацией беременности. Особая роль в хроническом воспалительном процессе отведена папилломавирусной (ПВИ) и герпетической инфекции.

По статистике, уже через первые 2 года начала половой жизни женщина считается инфици-

рованной вирусом папилломы человека (ВПЧ) в 82–84% случаев. Риск инфицирования женщины, с возрастом снижается, но риск персистенции инфекции в организме увеличивается. Показано, что при латентной форме папилломавирусной инфекции, если вирус пребывает в неактивном состоянии в базальной мембране, он может активироваться при снижении иммунитета, но также вирус может и самостоятельно элиминироваться из организма полностью.

ПВИ проявляется различными формами: клинической, субклинической, латентной, цервикальной интраэпителиальной неоплазией и инвазивной карциномой. Клиническая форма инфекции представлена экзофитными кондиломами различной локализацией на наружных половых органах; субклиническая форма выявляется дополнительными методами исследования, такими как кольпоскопия, цитологический и гистологический методы; латентная форма определяется лабораторной диагностикой с обнаружением ДНК вируса; цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN) слабой, умеренной или тяжелой степени и инвазивная карцинома – плоскоклеточная или железистая, в зависимости от локализации [2, 4, 6, 10].

Наряду с ПВИ наиболее часто выявляют коинфекцию с вирусами простого герпеса (ВПГ) [11], инфекцию рассматривают как системное заболевание организма (герпетическую болезнь) с преимущественным поражением того или иного органа [8, 9]. Герпетическая инфекция способна поражать эндометрий, особенно если носительство вируса притекает бессимптомно [5]. Существует неразрывная связь патогенеза ГВИ с нарушением иммунитета, причем эта связь формируется по типу «порочного круга». Эта особенность вируса позволяет говорить о герпесе, как о болезни иммунной системы [13].

Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой строго регулируемое семейство белков, которые участвуют в разрушении внеклеточного матрикса в нормальных физиологических процессах и, как известно, играют основную роль при воспалении и иммунном ответе, репарации тканей, миграции клеток и эмбриональном развитии [3, 12]. Нарушение равновесия матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов способствуют развитию хронического воспалительного процесса. Так, ММП-2, ММП-8 и ММП-9 в нормальном состоянии могут расщеплять природные белки, такие как фибронектин, участвующий в фиброгенезе, но изменение их концентрации может приводить к спаечному процессу в репродуктивных органах, что способ-

ствует снижению репродуктивного потенциала женщины [12]. ММП-2 и ММП-9 гидролизуют коллаген 4-го типа, являющегося основой базальных мембран, и способствуют отделению эндотелиальных клеток от мембран с дальнейшей их миграцией и непосредственном участии в ангиогенезе, что влияет на рост опухолей, в частности рака шейки матки [14, 15]. Известно, что тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ ограничивают расщепление коллагена, но нарушение равновесия ММП и TIMP сопровождается накоплением внеклеточного матрикса и риск репродуктивных нарушений возрастает [3, 12]. В связи с изложенным, были исследованы уровни матриксных металлопротеиназ-2, металлопротеиназ-9 и их тканевые ингибиторы 1-го и 2-го типов.

**Цель исследования** – проанализировать динамику острофазных белков, влияющих на состояние межклеточного матрикса (металлопротеиназ-2, металлопротеиназ-9 и их тканевых ингибиторов 1-го, 2-го типа), в сыворотке крови пациенток с ПВИ или коинфекции ПВИ и ВПГ до и после терапии препаратами с противовирусным и иммуномодулирующим действием: синтетического Inosine pranobex и растительного *Solanum tuberosum* происхождения.

## Материалы и методы

В исследование была включена 141 пациентка. Средний возраст пациенток составил  $31 \pm 2,5$  года. Исследование состояло из 2 этапов: 1-й этап – анализ системы матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов у женщин основной группы, распределенных с учетом этиологического фактора (Г-I – с папилломавирусной инфекцией (ПВИ); Г-II – с папилломавирусной и герпетической инфекцией (ПВИ + ГВИ 1/2-й тип); 2-й этап – анализ влияния схем терапии при ПВИ (Г-IA – с папилломавирусной инфекцией (ПВИ) – Inosine pranobex (n = 15), IB – *Solanum tuberosum* (n = 10); Г-IIА – с папилломавирусной и герпетической инфекцией (ПВИ + ГВИ 1/2-й тип) – Валацикловир + Inosine pranobex (n = 24), Г-IIВ – Валацикловир + *Solanum tuberosum* (n = 23). Комплексное клинико-лабораторное исследование проводили дважды, исходно – до терапии и через один месяц после терапии, в амбулаторных условиях по единой программе, включающей клинико-функциональное, биохимическое и иммунологическое обследование с целью детализации иммунологических механизмов хронического воспаления, ассоциирован-

ного с вирусным поражением урогенитального тракта женщин в прегравидарный период.

Определение в сыворотке крови уровня матриксных металлопротеиназ (ММР-2, ММР-9) и их тканевых ингибиторов (ТИМР-1, ТИМР-2) проведено методом твердофазного ИФА с использованием специфических реактивов фирмы R&D Diagnostic Inc. (США).

Статистическая обработка данных проведена с использованием программ IBM SPSS® v. 22. Внутри и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Для проверки взаимосвязи или независимости между величинами определяли коэффициент корреляции Спирмена. Ассоциативная связь показателей с признаками оценивалась с помощью отношения шансов и их 95% доверительных интервалов. Статистически достоверным считали уровень значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

При исследовании системы матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов до терапии были установлены изменения, которые наглядно представлены в таблице 1.

Уровни ММР-2 и ММР-9 до терапии повышались во всех основных группах в сравнении с группой контроля. Не установлено различий уровня ММР-2 между исследуемыми группами женщин.

Концентрация ММР-9 в сыворотке крови была повышена по сравнению с контролем в 1,3 раза ( $p < 0,01$ ). Т. е. было зарегистрировано повышение ММР-9 в основных группах вне зависимости от природы возбудителя, однако содержание ММР-9 в группе с ПВИ ( $p_{1-2} = 0,03$ ) было повышено в сравнении с группой с ГВИ + ПВИ.

Содержание ТИМР-1 в сыворотке крови пациенток анализируемых групп было высоким в сравнении с группой контроля ( $p < 0,01$ ). При этом содержание ТИМР-1 во II группе пациенток было выше в сравнении с I ( $p_{1-2} = 0,02$ ) группой женщин.

Показатели ТИМР-2, напротив, были снижены во всех группах по отношению к референсным значениям ( $p < 0,05$ ). Установлено, что содержание ТИМР-2 в сыворотке крови в группе с ПВИ + ГВИ было ниже в 1,5 раза в сравнении с группой ПВИ ( $p_{1-2} = 0,05$ ).

При исследовании коэффициента ММР-2 к ТИМР-2, до проведения лечения, установлено его повышение во всех основных группах в сравнении с группой контроля ( $p < 0,05$ ). Наиболее выраженное повышение установлено во 2-й группе

пациенток с ассоциацией вирусных инфекций в сравнении с группой I ( $p_{1-2} < 0,002$ ).

Повышение ММР-2, ММР-9 и тканевого ингибитора ТИМР 1-го типа у женщин основных групп в сыворотке крови до применения терапии может свидетельствовать о роли процессов повреждения межклеточного матрикса при вирусном процессе с нарушением процессов репарации в тканях репродуктивного тракта, приводящих к апоптозу и амплификации иммунных дефектов [1]. Дефицит ТИМР-2 в сыворотке крови у женщин в группе с ассоциацией инфекцией вирусной природы может свидетельствовать об истощении механизмов регуляции в системе протеолиз-антипротеолиз, что усугубляет повреждение межклеточного матрикса, в основном за счет абсолютной или относительной гиперпродукции ММР-2, регулирующей расщепление моноцитарного хемотаксического белка-3, который способствует уменьшению воспалительного процесса и обеспечению вазоконстрикции [3, 12].

Увеличение коэффициента ММР-2 к ТИМР-2 во всех группах отражает усиление повреждения межклеточного матрикса, что связано с деградацией белков и приводит к формированию нестабильного соединительнотканного каркаса органов и тканей, в том числе и репродуктивного тракта, способствуя развитию, в последующем, пренатальных осложнений. Также повышенный показатель коэффициента, возможно, может свидетельствовать о развитии иммунного воспаления с увеличением проницаемости сосудов тканей, активацией ангиогенеза и может способствовать прогрессированию онкогенеза, а также матриксные металлопротеиназы-2 (ММР-2) и тканевой ингибитор металлопротеиназы-2 (ТИМР-2) могут играть важную роль в инвазии и метастатическом распространении злокачественных новообразований, связанных с неконтролируемой деградацией внеклеточного матрикса [7].

После применения терапии была установлена положительная динамика с тенденцией к нормализации по большинству показателей.

У пациенток подгруппы IA динамика показателей показала снижение в сыворотке крови уровня ММР-2 в среднем в 1,6 раз, ММР-9 – в 1,3 раза, ТИМР-1 – в 1,2 раза с одновременным повышением ТИМР-2 в 1,2 раза относительно показателей до терапии. В подгруппе IB при терапии *Solanum tuberosum* были установлены схожие по направлению, но отличающиеся по выраженности изменения, характеризующиеся понижением показателей ММР-2 в среднем на 1,4 раза, ММР-9 – 1,2 раза, ТИМР-1 – 1,1 раза и повышением уровня ТИМР-2 в среднем в 1,3 раза.

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИАЗ И ИХ ТКАНЕВЫХ ИНГИБИТОРОВ У ПАЦИЕНТОК В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

TABLE 1. LEVEL OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR TISSUE INHIBITORS IN PATIENTS IN BLOOD SERUM

Показатели Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ), нг/мл Indicators Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ), ng/mL	Группа контроля Control group (n = 30)	Г-I G-I (n = 21) 1	Г-II G-II (n = 47) 2	Уровни достоверности Confidence levels (p)
<b>MMP-2</b>	167,0 (145-182)	237,39*** (213,88-243,29) $p_{до-IA} = 0,007$ $p_{до-IB} = 0,006$	206,89*** (198,63-275,63) $p_{до-IIA} = 0,007$ $p_{до-IIB} = 0,084$	$p_{1-2} > 0,05$
<b>Inosine pranobex (A)</b>		144,28** (129,41-168,16) $p_{IA-IB} = 0,021$	159,39 (144,62-184,12) $p_{IIA-IIB} = 0,007$	$p_{1-2} < 0,05$
<b>Solanum tuberosum (B)</b>		166,61 (148,72-180,40)	200,71* (198,33-201,62)	$p_{1-2} < 0,01$
<b>MMP-9</b>	291,28 (168,44-305,10)	394,20** (308,81-425,72) $p_{до-IA} = 0,004$ $p_{до-IB} = 0,027$	299,91* (255,92-401,39) $p_{до-IIA} = 0,05$ $p_{до-IIB} = 0,06$	$p_{1-2} = 0,03$
<b>Inosine pranobex (A)</b>		298,98* (208,83-349,64) $p_{IA-IB} = 0,004$	232,75* (227,83-241,25) $p_{IIA-IIB} < 0,01$	$p_{1-2} < 0,01$
<b>Solanum tuberosum (B)</b>		304,12* (270,41-316,42)	347,60** (251,12-359,25)	$p_{1-2} < 0,05$
<b>TIMP-1</b>	205,08 (180,21-222,10)	270,09** (260,66-285,54) $p_{до-IA} = 0,004$ $p_{до-IB} = 0,021$	306,32** (288,84-311,65) $p_{до-IIA} = 0,09$ $p_{до-IIB} = 0,027$	$p_{1-2} = 0,02$
<b>Inosine pranobex (A)</b>		222,14* (201,62-223,81) $p_{IA-IB} = 0,004$	303,61** (243,12-337,10) $p_{IIA-IIB} = 0,042$	$p_{1-2} < 0,05$
<b>Solanum tuberosum (B)</b>		243,10** (209,12-250,44)	325,20** (168,22-339,71)	$p_{1-2} < 0,05$
<b>TIMP-2</b>	169,04 (73,06-227,66)	135,62* (124,34-136,97) $p_{до-IA} = 0,040$ $p_{до-IB} = 0,007$	98,81* (91,21-125,06) $p_{до-IIA} = 0,001$ $p_{до-IIB} = 0,041$	$p_{1-2} = 0,05$
<b>Inosine pranobex (A)</b>		160,42 (156,40-164,44) $p_{IA-IB} = 0,002$	143,58** (123,07-164,62) $p_{IIA-IIB} = 0,002$	$p_{1-2} < 0,05$
<b>Solanum tuberosum (B)</b>		188,16** (185,12-194,13)	126,30** (88,92-131,71)	$p_{1-2} < 0,01$

Примечание. 1. Статистическая достоверность различий с группой контроля: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .  
2. Статистическая достоверность между группами:  $p_{1-2}$  – I и II группы – с ПВИ и ПВИ + ГВИ.

Note. 1. Statistical significance of differences with the control group: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . 2. Statistical reliability between groups:  $p_{1-2}$ , groups I and II – with PVI and PVI + GVI.

**ТАБЛИЦА 2. КОЭФФИЦИЕНТ СООТНОШЕНИЯ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 И ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА-2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОК ОСНОВНЫХ ГРУПП И В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ**

TABLE 2. RATIO OF MATRIX METALLOPROTEINASE 2 AND TISSUE INHIBITOR 2 IN BLOOD SERUM IN PATIENTS OF THE MAIN GROUPS AND IN THE CONTROL GROUP BEFORE AND AFTER THERAPY

Показатели Indicators	Группа контроля Control group (n = 30)	Г-I G-I (n = 21) 1	Г-II G-II (n = 47) 2	Статистическая достоверность Confidence levels (p)
<b>ММР-2:ТІМР-2</b> <b>До терапии</b> ММР-2:ТІМР-2 Before therapy	0,98±0,05	1,75±0,06* p <sub>до-ІА</sub> < 0,001 p <sub>до-ІВ</sub> < 0,001	2,09±0,07** p <sub>до-ІІА</sub> = 0,01 p <sub>до-ІІВ</sub> = 0,034	p <sub>1-2</sub> < 0,002
<b>Inosine pranobex (A)</b>		0,91±0,09 p <sub>ІА-ІВ</sub> = 0,07	1,13±0,02* p <sub>ІІА-ІІВ</sub> = 0,01	p <sub>1-2</sub> < 0,01
<b>Solanum tuberosum (B)</b>		0,87±0,07	1,73±0,03**	p <sub>1-2</sub> < 0,01

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Сравнивая изменения в подгруппах, было установлено наличие достоверных различий между содержанием металлопротеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови пациентов из разных подгрупп, большая степень изменений была характерна для подгруппы ІА. При анализе этих показателей, относительно группы контроля, выявлено достижение референсных значений ТІМР-2 в подгруппе ІА и ММР-2 – в подгруппе ІВ. Также было установлено значимое снижение ММР-2 по сравнению с референсными величинами у пациенток подгруппы ІА.

У пациенток группы ІІ динамика изменений металлопротеиназ и их ингибиторов была более разнообразная в сравнении с группой І. Подгруппа ІІА, получавшая Inosine pranobex, продемонстрировала снижение показателей ММР-2 в среднем в 1,2 раза и ММР-9 – в 1,2 раза, отсутствие изменений в содержании ТІМР-1, но повышение сывороточного содержания ТІМР-2 в среднем в 1,4 раза. В подгруппе ІІВ было отмечено отсутствие достоверных изменений в динамике показателей ММР-2 и ММР-9, повышение ТІМР-2 в сыворотке крови в среднем в 1,2 раза. Между подгруппами по всем исследуемым показателям были выявлены достоверные различия. Выявлено достижение контрольных значений ММР-2 в подгруппе ІІА. Содержание других показателей отличалось от контрольных, в разной степени и направленности, что отражено в таблице 1.

При расчете коэффициента ММР-2 к ТІМР-2 после проведения терапии четко про-

слеживалось снижение показателя в обеих подгруппах (табл. 2). При этом в подгруппах ІА и В не выявлено различий этого коэффициента в зависимости от препарата. Во ІІ группе женщин статистически значимо снизился данный коэффициент в подгруппах ІІА, что свидетельствует об эффективности в пользу терапии препаратом ІР в группе с вирусными ассоциациями.

## Выводы

Установлено, что Inosine pranobex и *Solanum tuberosum* показали положительную динамику по уровню ММР-2, ММР-9 и тканевых ингибиторов 1-го и 2-го типов во всех исследуемых группах. Однако Inosine Pranobex способствует более выраженным изменениям, особенно в группах с ассоциациями инфекций. Это свидетельствует о более выраженном влиянии применения ІР по снижению активности матриксных металлопротеиназ и уменьшению дисбаланса в системе ММР-ТІМР у женщин с микст-инфекциями.

## Благодарности

Авторы выражают признательность ректору ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России Шуматову Валентину Борисовичу, проректору по научно-исследовательской деятельности ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России Елисеевой Екатерине Валерьевне за помощь в выполнении исследований.

## Список литературы / References

1. Бениова С.Н., Фиголь С.Ю., Корнилова О.А. Плазменные маркеры деградации экстрацеллюлярного матрикса при внутриутробной герпетической инфекции // *Детские инфекции*, 2016. № 4. С. 27-30. [Beniova S.N., Figol S.Yu., Kornilova O.A. Plasma markers of extracellular matrix degradation in intrauterine herpetic infection. *Detskie infektsii = Children Infections*, 2016, no. 4, pp. 27-30. (In Russ.)]
2. Гаджиева К.А. Частота встречаемости генотипов вируса папилломы человека онкогенного риска по результатам ретроспективного и проспективного анализов по г. Баку // *Международный научно-исследовательский журнал*, 2019. № 4(82). С. 78-81. [Gadzhieva K.A. Frequency of occurrence of human papillomavirus genotypes oncogenic risk based on the results of retrospective and prospective analyses in Baku. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal = International Research Journal*, 2019, no. 4 (82), pp. 78-81. (In Russ.)].
3. Григоркевич О.С., Мокров Г.В., Косова Л.Ю. Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы // *Фармакокинетика и Фармакодинамика*, 2019. № 2. С. 3-16. [Grigorovich O.S., Makarov G.V., Kosova L.Yu. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Farmakokinetika i Farmakodinamika = Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 2019, no. 2, pp. 3-16. (In Russ.)]
4. Доброхотова Ю.Э. Имеют ли значение бактериальные инфекции, передающиеся половым путем, в генезе неопластического процесса шейки матки? // *РМЖ. Мать и дитя*, 2018. Т. 1, № 1. С. 62-66. [Dobrokhotova Yu.E. Do sexually transmitted bacterial infections matter in the genesis of the neoplastic process of the cervix? *RMZh. Mat i ditya = RMJ. Mother and Child*, 2018, Vol. 1, no. 1, pp. 62-66. (In Russ.)]
5. Дюдюн А.Д., Полион Н.Н., Нагорный А.Е. Герпесвирусная инфекция. Клинико-иммунологические особенности: клиническая лекция // *Дерматовенерология. Косметология. Сексопатология*, 2015. № 3-4. С. 119-142. [Dyudyun A.D., Polion N.N., Nagorny A.E. Herpesvirus infection. Clinical and immunological features: clinical lecture. *Dermatovenerologiya. Kosmetologiya. Seksopatologiya = Dermatovenerology. Cosmetology. Sexopathology*, 2015, no. 3-4, pp. 119-142. (In Russ.)]
6. Ковчур П.И., Бахидзе Е.В., Ястребова А.В. Изменения параметров клеточного иммунитета у пациентов с преинвазивным и микроинвазивным раком шейки матки до и после лечения // *Инфекция и иммунитет*, 2014. Т. 4, № 2. С. 173-180. [Kovchur P.I., Bakhidze E.V., Yastrebova A.V. Changes in cellular immunity parameters in patients with preinvasive and microinvasive cervical cancer before and after treatment. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, Vol. 4, no. 2, pp. 173-180. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2014-2-173-180.
7. Малинина Е.И., Чернышева Т.В., Рычкова О.А., Мазалова М.В., Южакова Н.Ю. Концентрация матриксных металлопротеиназ-2,9 у новорожденных с перинатальной гипоксией // *Современные проблемы науки и образования*, 2019. № 2. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28636> (Дата обращения: 09.05.2023). [Malinina E.I., Chernysheva T.V., Rychkova O.A., Mazalova M.V., Yuzhakova N.Yu. The concentration of matrix metalloproteinases-2.9 in newborns with perinatal hypoxia. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2019, no. 2. [Electronic resource]. Access mode: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28636>. (Date of the application: May 9, 2023). (In Russ.)]
8. Маркелова Е.В., Здор В.В., Романчук А.Л., Бирко О.Н. Матриксные металлопротеиназы: их взаимосвязь с системой цитокинов, диагностический и прогностический потенциал // *Имунопатология, аллергология, инфектология*, 2016. № 2. С. 11-22. [Markelova E.V., Zdorov V.V., Romanchuk A.L., Birko O.N. Matrix metalloproteinases: their relationship with the cytokine system, diagnostic and prognostic potential. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2016, no. 2, pp. 11-22. (In Russ.)]
9. Маркелова Е.В., Кныш С.В., Небезкина Т.А., Байбарина Е.В. Альфа-герпесвирусы: современный взгляд на структуру // *Тихоокеанский медицинский журнал*, 2018. № 4(74). С. 5-9. [Markelova E.V., Knysh S.V., Nefedkina T.A., Vaibarina E.V. Alpha-herpesviruses: a modern view of the structure. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2018, no. 4 (74), pp. 5-9. (In Russ.)]
10. Роик Е.Е., Баранов А.Н., Трещева Н.Д. Эпидемиологические особенности папилломавирусной инфекции // *Экология человека*, 2015. № 5. С. 21-26. [Roik E.E., Baranov A.N., Treshcheva N.D. Epidemiological features of human papillomavirus infection. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2015, no. 5, pp. 21-26. (In Russ.)]
11. Руженцова Т.А., Хавкина Д.А., Шушакова Е.К. Результаты применения интерферона α-2В в сочетании с витаминами Е и С в терапии урогенитальных инфекций у беременных женщин // *Лечащий врач*, 2021. № 1. С. 31-36. [Ruzhentsova T.A., Khavkina D.A., Shushakova E.K. Results of the use of interferon α-2B in combination with vitamins E and C in the therapy of urogenital infections in pregnant women. *Lechashchiy vrach = Attending Physician*, 2021, no. 1, pp. 31-36. (In Russ.)]
12. Хохлова А.С., Маркелова Е.В., Филина Н.В., Овчинникова О.В. Роль системы матриксных металлопротеиназ в прогрессировании первичной открытоугольной глаукомы // *Тихоокеанский медицинский журнал*, 2017. № 2. С. 32-34. [Khokhlova A.S., Markelova E.V., Filina N.V., Ovchinnikova O.V. The role of the

matrix metalloproteinase system in the progression of primary open-angle glaucoma. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2017, no. 2, pp. 32-34. (In Russ.)]

13. Шульженко А.Е., Шубелко Р.В., Зуйкова И.Н. Противовирусный иммунитет репродуктивного тракта: от изучения системы до коррекции работы // Русский медицинский журнал, 2019. № 12. С. 14-19. [Shulzhenko A.E., Shchubelko R.V., Zuikova I.N. Antiviral immunity of the reproductive tract: from studying the system to correcting work. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2019, no. 12, pp. 14-19. (In Russ.)]

14. Chen J., Tsai V., Parker W.E., Aronica E. Detection of Human Papillomavirus in human focal cortical dysplasia Type IIb. *Ann. Neurol.*, 2012, Vol. 72, no 6, pp. 881-892.

15. Wang C., Li D., Qian Y. Increased matrix metalloproteinase-9 activity and mRNA expression in lung injury following cardiopulmonary bypass. *Lab. Invest.*, 2012, Vol. 92, pp. 910-916.

---

**Авторы:**

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

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

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

**Тулупова М.С.** — к.м.н., главный врач ООО «Парацельс», г. Владивосток, Россия

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

**Федянина Л.Н.** — д.м.н., профессор ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

**Маркова Н.Ю.** — обучающаяся пятого курса по специальности «лечебное дело» ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Authors:**

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

**Chernikova M.A.**, Assistant Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

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

**Tulupova M.S.**, PhD (Medicine), Chief Physician, Paracelsus LLC, Vladivostok, Russian Federation

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

**Fedyanina L.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

**Markova N.I.**, the 5<sup>th</sup> Year Student, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

# КОЛИЧЕСТВЕННАЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup> И CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup> НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ

Нестерова И.В.<sup>1, 2</sup>, Чудилова Г.А.<sup>1</sup>, Атажахова М.Г.<sup>1</sup>,  
Матушкина В.А.<sup>1</sup>, Ковалева С.В.<sup>1</sup>, Чапурина В.Н.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», Москва, Россия

**Резюме.** У пациентов, перенесших COVID-19, отмечают разнообразные проявления постковидного синдрома (ПКС), вызывающие развитие осложнений, сопровождающих течение тяжелых вирусных инфекций с развитием синдрома хронической усталости (СХУ) и выраженных когнитивных расстройств (КР). Изучение молекулярных механизмов нарушений в системе НГ у пациентов с ПКС, связанных с продукцией IFN, рецепторной функцией НГ, в частности субпопуляций, экспрессирующих IFN $\alpha$ / $\beta$ R, IFN $\gamma$ R(CD119) на мембране НГ, является актуальным и представляет несомненный интерес, для поиска терапевтических стратегий, восстановления и усиления врожденного иммунного ответа после перенесенного COVID-19. Цель – уточнить количественные и фенотипические характеристики субпопуляций CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup> нейтрофильных гранулоцитов периферической крови пациентов с постковидным синдромом.

Обследованы 39 пациентов (24-60 лет) с ПКС, через 3 месяца после COVID-19 – группа исследования 1 (ГИ1). Группа сравнения (ГС) сформирована из 30 добровольцев обследованных в доковидный период. Проведена детекция ГВИ (ВПГ1, ВЭБ, ВЧГ6, ЦМВ) в соскобе с миндалин и задней стенки глотки. Для определения выраженности клинических симптомов ПКС использована анкета

## Адрес для переписки:

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

## Address for correspondence:

Irina V. Nesterova  
P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian  
Federation  
123 Leninsky Ave, Apt 1  
Moscow  
117513 Russian Federation  
Phone: +7 (916) 187-73-41.  
E-mail: inesterova1@yandex.ru

## Образец цитирования:

И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова, М.Г. Атажахова,  
В.А. Матушкина, С.В. Ковалева, В.Н. Чапурина  
«Количественная и фенотипическая трансформация  
субпопуляций CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>,  
CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>  
нейтрофильных гранулоцитов у пациентов  
с постковидным синдромом» // Российский  
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 363-372.  
doi: 10.46235/1028-7221-9994-QAP

© Нестерова И.В. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

I.V. Nesterova, G.A. Chudilova, M.G. Atazhakhova,  
V.A. Matushkina, S.V. Kovaleva, V.N. Chapurina  
“Quantitative and phenotypic transformation of  
CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>-</sup>CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup> and  
CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup> neutrophil granulocytes subsets  
in patients with post-COVID syndrome”, Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,  
Vol. 26, no. 3, pp. 363-372.  
doi: 10.46235/1028-7221-9994-QAP

© Nesterova I.V. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.46235/1028-7221-9994-QAP

с оценкой тяжести их проявления в баллах. Исследовано содержание и фенотип НГ субпопуляций  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$  (FC 500, Beckman Coulter, США).

У всех пациентов ГИИ выявлены клинические проявления СХУ и КР, выраженность которых в баллах составила 16,0 (14,75-20,25). При детекция ГВИ у 37,2% определена моно – ВПГ1 инфекция; у 62,8% микст-ГВИ (ВПГ1, ВЭБ, ВЧГ6), при которых отмечались более выраженные клинические симптомы. Установлено отсутствие субпопуляции  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+НГ$  и трансформация фенотипа субпопуляций  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+НГ$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-НГ$ . Определено повышение плотности экспрессии  $CD16$ ,  $IFN\alpha/\beta R1$ ,  $CD119$ -рецепторов ( $p_{1-3} < 0,05$ ), демонстрирующих готовность к восприятию интерфероновых сигналов и ответа на них.

Снижение инфекционной нагрузки в постковидном периоде и адекватная работа иммунной системы с реализацией механизмов нейроиммуноэндокринной регуляции будут приводить к восстановлению функционирования различных органов, систем и нивелировать проявления ПКС. С этих позиций рек $IFN\alpha 2b$  в комбинации с высокоактивными антиоксидантами, может способствовать формированию протективного иммунитета для профилактики ОРВИ, обострения хронических инфекций, реставрации фенотипа субпопуляций НГ с последующим устранением дисбаланса в противоионфекционном иммунитете.

*Ключевые слова: постковидный синдром, субпопуляции, нейтрофильные гранулоциты, фенотип, интерферон, синдром хронической усталости, герпесвирусные инфекции*

## QUANTITATIVE AND PHENOTYPIC TRANSFORMATION OF $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ , $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ AND $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$ NEUTROPHIL GRANULOCYTES SUBSETS IN PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME

Nesterova I.V.<sup>a, b</sup>, Chudilova G.A.<sup>a</sup>, Atazhakhova M.G.<sup>a</sup>,  
Matushkina V.A.<sup>a</sup>, Kovaleva S.V.<sup>a</sup>, Chapurina V.N.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

<sup>b</sup> P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** In patients who underwent COVID-19, various manifestations of post-COVID syndrome (PCS) are noted, causing the development of disorders accompanying severe viral infections, complicated by chronic fatigue syndrome (CFS) and severe cognitive disorders (CD). Studying the molecular mechanisms of these disorders in the system of neutrophilic granulocytes (NG) in patients with PCS associated with  $IFN$  production, receptor function of NG, in particular, their subsets expressing  $IFN\alpha/\beta R$ ,  $IFN\gamma R(CD119)$ , is relevant for the search for therapeutic strategies, restoration and enhancement of the innate immune response after COVID-19. Our objective was to clarify the quantitative and phenotypic characteristics of certain subsets of neutrophil granulocytes, i.e.,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$ , in peripheral blood of patients with post-COVID syndrome.

We have examined 39 patients (24-60 years old) with PCS 3 months after COVID-19 (study group 1, SG1). The comparison group (CG) included 30 volunteers examined over the pre-COVID period. Detection of herpesvirus infections (HSV1, EBV, HHV6, CMV) was carried out in scrapings from the tonsils and the posterior wall of the pharynx. To determine the severity of the clinical PCS symptoms, a questionnaire was used to assess its severity using a point scale. The content and phenotype of NG subsets  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^-CD119^+$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^-$ ,  $CD16^+IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+$  were assessed by means of FC 500 (Beckman Coulter, USA).

In all patients of SG1, clinical manifestations of CFS and CD were revealed, at the average severity rates of 16.0 points (14.75-20.25). When detecting herpesvirus infections, 37.2% had only HSV1 infection;

62.8% of patients showed mixed infection (HSV1, EBV, HHV6), which exhibited more pronounced clinical symptoms. We have noted absence of CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ RI<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>NG subset and phenotype transformation of CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ RI<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>NG, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ RI<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>NG subsets. Increased density expression of CD16, IFN $\alpha$ / $\beta$ RI, CD119 receptors was also found ( $p_{1-3} < 0.05$ ) thus suggesting ability to accept the interferon signaling and response.

Reduced infectious burden in the post-COVID period and adequate functioning of the immune system, including the neuroimmunoendocrine regulation mechanisms, should contribute to the functional recovery of various organs, systems, thus neutralizing the PCS manifestations. Therefore, usage of recIFN $\alpha$ 2b in combination with highly active antioxidants may contribute to development of protective immunity, prevention of acute respiratory viral infections, exacerbation of chronic infections, and restoration of the NG phenotypes followed by restoration of anti-infectious immune balance.

*Keywords: post-COVID syndrome, neutrophil granulocytes, subsets, phenotype, interferon, chronic fatigue syndrome, herpesvirus infections*

## Введение

По мнению зарубежных и российских ученых, остаточные и вновь приобретенные клинические проявления после перенесенной новой коронавирусной инфекции значительно распространены не только у пациентов с коморбидной патологией, но и среди молодых и ранее не предъявлявших жалобы здоровых людей [2]. Часть пациентов, перенесших COVID-19 разной степени тяжести после периода реконвалесценции, отмечают различные проявления постковидного синдрома (ПКС).

ПКС представляет собой клиническое состояние, возникающее примерно через 3 месяца, после перенесенного COVID-19, с сохраняющимися не менее 2 месяцев симптомами, отражающими дисфункцию многих систем и органов, которые не могут быть объяснены альтернативным диагнозом [10]. Проявления ПКС разнообразны, непредсказуемы, и крайне важно оценить у таких пациентов развитие возможных осложнений, часто сопровождающих течение тяжелых вирусных инфекций с развитием синдрома хронической усталости (СХУ) и выраженных когнитивных расстройств (КР) [8].

Стойкое ощущение СХУ характеризуется астенией различной степени тяжести, затяжным или волнообразным течением и является одной из самых частых жалоб пациентов [1].

Особого внимания заслуживают выраженные КР: снижение процессов запоминания, усвоения новой информации, понимания, воспроизведения увиденного, услышанного, прочитанного, выполнения повседневной деятельности, общения с окружающими, трудности с концентрацией внимания, снижение умственной работоспособности, забывчивость, ощущение «тумана в голове», нарушение сна и засыпания, а также многочисленные и разнообразные вегетатив-

ные нарушения (головная боль, головокружение, перепады артериального давления и пульса, аритмии, тахикардии), мигрирующие боли в суставах и мышцах. При оценке нейропсихологического тестирования и двигательной активности выявляются дефекты коммуникативности, внимания, узнавания, понимания, мышления, моторики, запоминания, воспроизведения ряда слов, цифр, фигур, страдают приспособительное поведение, работоспособность, познавательная деятельность, осмысливание, оперативная, фиксационная, кратковременная и долговременная память [14].

Реже больных беспокоят: повышенная потливость, длительный субфебрилитет, непостоянные боли в спине, поясничной области, горле, грудной клетке, одышка, кашель, регионарная лимфоаденопатия, потеря или изменение вкуса, запаха или слуха, плохая переносимость света и шума, боли в животе, диарея, кожные проявления васкулитов и/или аллергических реакций, выпадение волос и другие проявления [3]. Сохраняющиеся негативные сдвиги в физическом и эмоциональном состоянии приводят к социальной дезадаптации пациентов и отрицательно отражаются на качестве их жизни. Наблюдаются панические атаки, расстройства настроения: эмоциональная лабильность и психогенная депрессия, повышенная тревожность и различные фобии, асоциальное поведение, конфликтность. Попытки родственников и врачей повлиять на самооценку больного провоцируют психотические реакции, взрывное поведение, конверсионные нарушения, суицид [1]. Эти перечисленные осложнения встречаются у 30–50% реконвалесцентов, чаще у женщин, чем у мужчин, а их выраженность и стойкость более высока у больных с полиорганными и коморбидными формами патологии, находившихся на лечении в палатах

интенсивной терапии и реанимационных отделениях [15].

Дисбаланс в работе иммунной системы может сопровождаться при ПКС развитием аутоиммунных механизмов, истощением и функциональной неполноценностью клеток врожденного и адаптивного иммунитета [8]. Нарушения молекулярных механизмов, связанные с продукцией интерферона (IFN), и проявление различных дисфункций нейтрофильных гранулоцитов (НГ) являются ключевым признаком постковидного периода [6]. Это отмечается как на уровне системного, так и мукозального иммунитета, и определяет развитие целого ряда симптомов, включая восприимчивость к острым инфекционным заболеваниям различной этиологии и активацию персистирующих герпесвирусных инфекций (ГВИ) [13]. Было показано, что острое течение COVID-19 сопровождается дефицитом выработки IFN, при этом происходит активация персистирующих ГВИ – вируса Эпштейна–Барра (ВЭБ), цитомегаловируса (ЦМВ), вируса герпеса человека 6-го типа (ВЧГ6) [13].

Кроме того, у большей части пациентов отмечаются возвратные респираторные инфекции в виде частых повторных эпизодов ОРВИ, обострение хронических бактериальных и грибковых инфекций (хронические гаймориты, синуситы, фарингиты, отиты, циститы, уретриты, вульвовагиниты и др.), развитие коинфекций различной локализации [6].

Особое значение в противовирусной иммунной защите при COVID-19 принадлежит НГ, которые играют важную роль в развитии, течении, исходе COVID-19 и при восстановлении в постковидном периоде, что связано с изменением их количества и функциональности [7]. Являясь эффекторными и регуляторными клетками иммунной системы, НГ экспрессируют поверхностные мембранные рецепторы к IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$ , формируя субпопуляции с определенным фенотипом. Путем связывания с этими рецепторами IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  способны регулировать функциональную активность НГ [14].

Для уточнения иммунопатогенеза ПКС, разработки новых диагностических методов мониторинга и наблюдения, контролирующих особенности прогрессирования и тяжесть болезни, создания новых таргетных иммунотерапевтических стратегий в лечении пациентов в постковидном периоде и предотвращения возникновения тяжелых осложнений болезни, крайне важным и актуальным является, наряду с оценкой клинической симптоматики, также и изучение различных функционально-значимых субпопуляций НГ.

Изучение молекулярных механизмов нарушений в системе НГ у пациентов с проявлениями ПКС, связанных с продукцией IFN, рецепторной функцией НГ, в частности субпопуляций, экспрессирующих IFN $\alpha$ / $\beta$ R, IFN $\gamma$ R (CD119) на мембране НГ, является актуальным и представляет несомненный интерес, что может помочь в поиске терапевтических стратегий, с целью восстановления и усиления врожденного иммунного ответа после перенесенной SARS-CoV-2 инфекции.

**Цель** – уточнить количественные и фенотипические характеристики субпопуляций CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup> нейтрофильных гранулоцитов периферической крови пациентов с постковидным синдромом.

## Материалы и методы

Обследовано 39 пациентов обоего пола (19 женщин, 20 мужчин) в возрасте от 24 до 60 лет с различными симптомами и проявлениями ПКС, находившихся на диспансерном наблюдении через 3 месяца после перенесенного заболевания COVID-19 – группа исследования 1 (ГИ1). По данным анамнеза вирус SARS-CoV-2 в ГИ1 был идентифицирован в остром периоде положительным ПЦР-тестом. По результатам компьютерной томографии органов грудной клетки в остром периоде COVID-19 характеризовался картиной вирусного поражения КТ 2-3. Группа сравнения (ГС) сформирована из 30 добровольцев сопоставимых по полу и возрасту, обследованных в доковидный период.

У всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании, согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 2013 г., и на обработку персональных данных.

При комплексном исследовании, кроме традиционных методов, включавших сбор анамнеза, методы физикального обследования, общий и биохимический анализы крови, использовали метод ПЦР в реальном времени для детекции ГВИ (ВПГ1, ВЭБ, ВЧГ6, ЦМВ) в соскобе с миндалин и задней стенки глотки, что имело значение для выявления реактивации хронических ГВИ.

Для оценки выраженности клинических симптомов у пациентов с СХУ и КР использована ранее разработанная нами анкета для пациентов с ПКС, в которой оценивалось наличие или отсутствие симптомов в зависимости от тяжести их проявления в баллах от 0 до 5 [11].

На следующем этапе было проведено исследование количества НГ, % субпопуляций CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ RI-CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ RI<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ RI<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup> и их фенотипа по плотности экспрессии мембранных рецепторов – MFI (FC 500, Beckman Coulter, США) с использованием конъюгатов МКАТ: IFN $\alpha$  $\beta$ RI-FITC, CD119-PE, CD16-ECD (Beckman Coulter International S.A., Франция). Для статистической обработки полученных данных использованы компьютерные программы Microsoft Excel. Ре-

зультаты представляли в виде медианы (Me) и верхнего и нижнего квартилей (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>), применяли критерии Манна–Уитни. Достоверность различия определяли при p < 0,05.

## Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что частота встречаемости клинических проявлений СХУ и КР была выявлена у всех пациентов ГИ1 с оценкой их выраженности

**ТАБЛИЦА 1. ВЫРАЖЕННОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 (В БАЛЛАХ), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. SEVERITY OF CLINICAL MANIFESTATIONS OF POST-COVID SYNDROME IN PATIENTS WHO UNDERWENT COVID-19 (IN POINTS), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Симптомы Symptoms	Группа сравнения (ГС) Comparison group n = 30	Пост-COVID-19 (ГИ1) Post-COVID-19 n = 39
<b>Синдром хронической усталости, непереносимость физической нагрузки, снижение работоспособности, повышенная утомляемость</b> Chronic fatigue syndrome, exercise intolerance, decreased performance, increased fatigue	0,5 (0,1-1,0)	3,0 (2,0-3,0)*
<b>Снижение процессов запоминания, трудности с концентрацией внимания, ощущение тумана в голове</b> Reduced memorization processes, difficulty concentrating, feeling foggy in the head	0,0 (0,0-0,0)	3,0 (3,0-3,0)*
<b>Головная боль, головокружение, мигрень</b> Headache, dizziness, migraine	0,5 (0,1-1,0)	2,0 (2,0-3,0)*
<b>Артралгии, миалгии</b> Arthralgia, myalgia	0,0 (0,0-0,0)	2,0 (1,0-3,0)*
<b>Панические атаки, расстройства настроения, эмоциональная лабильность, психогенная депрессия</b> Panic attacks, mood disorders, emotional lability, psychogenic depression	0,0 (0,0-0,0)	2,0 (2,0-2,0)*
<b>Нарушения засыпания и сна</b> Falling asleep and sleep disorders	0,0 (0,0-0,0)	2,0 (1,5-2,0)*
<b>Повышенная потливость, субфебрилитет</b> Excessive sweating, subfebrility	0,0 (0,0-0,0)	1,0 (1,0-1,5)*
<b>Кашель и одышка</b> Cough and shortness of breath	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-1,5)
<b>Клинические проявления герпесвирусных инфекций</b> Clinical manifestations of herpesvirus infections	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-1,5)
<b>Общее количество баллов</b> Total number of points	1,0 (0,5-2,0)	16,0 (14,75-20,25)*

Примечание. \* – значимость отличий от показателей группы сравнения, p < 0,05.

Note. \*, the significance of differences from the indicators of the comparison group; p < 0.05.

**ТАБЛИЦА 2. ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РЕЦЕПТОРЫ К IFN I И II ТИПОВ И АКТИВАЦИОННЫЙ МАРКЕРНЫЙ РЕЦЕПТОР CD16 У ПАЦИЕНТОВ В ПОСТКОВИДНОМ ПЕРИОДЕ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 2. PHENOTYPE OF NEUTROPHIL GRANULOCYTE SUBSETS EXPRESSING TYPE I AND II IFN RECEPTORS AND CD16 ACTIVATION MARKER RECEPTOR IN POST-COVID PATIENTS, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Показатели Parameter	Группа сравнения (ГС) Comparison group n = 30	Пост-COVID-19 (ГИ1) Post-COVID-19 n = 39
<b>CD16*IFN<math>\alpha</math>/<math>\beta</math>R1*CD119*НГ</b> CD16*IFN $\alpha$ / $\beta$ R1*CD119*NG		
НГ, % NG, %	93,7 (89,8-96,5)	94,4 (92,6-96,1)
<b>MFI CD16</b>	39,8 (20,4-51,3)	103,5 (73,9-121,0)*
<b>MFI CD119</b>	2,8 (2,5-3,1)	5,2 (4,4-6,2)*
<b>CD16*IFN<math>\alpha</math>/<math>\beta</math>R1*CD119*НГ</b> CD16*IFN $\alpha$ / $\beta$ R1*CD119*NG		
НГ, % NG, %	1,4 (0,5-2,4)	0,5 (0,4-2,0)
<b>MFI CD16</b>	39,9 (22,9-54,5)	67,7 (58,5-100,3)*
<b>MFI IFN<math>\alpha</math>/<math>\beta</math></b>	3,4 (2,6-4,1)	15,3 (6,8-22,2)*
<b>CD16*IFN<math>\alpha</math>/<math>\beta</math>R1*CD119*НГ</b> CD16*IFN $\alpha$ / $\beta$ R1*CD119*NG		
НГ, % NG, %	1,0 (0,4-1,8)	0
<b>MFI CD16</b>	39,1 (26,6-50,3)	0
<b>MFI IFN<math>\alpha</math>/<math>\beta</math></b>	5,7 (4,6-6,5)	0
<b>MFI CD119</b>	3,2 (2,9-5,8)	0

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

согласно разработанной нами 5-балльной шкале (0 баллов – отсутствие симптомов; 1 балл – минимальные симптомы; 2 балла – средняя выраженность симптомов; 3 балла – тяжелая степень; 4 балла – очень тяжелая степень; 5 баллов – крайне тяжелая степень). Таким образом, общее количество баллов составило – 16,0 (14,75-20,25), что в 16 раз больше чем в ГС-1,0 балл (0,5-2,0) ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Наиболее выраженными признаками, которые отмечались в 100% случаев в ГИ1 являлись: ощущение хронической усталости, непереносимость физической нагрузки, снижение работоспособности, повышенная утомляемость. Также у всех пациентов в разной степени выраженности выявлялись когнитивные нарушения в виде снижения процессов запоминания, трудности с концентрацией внимания, ощущение «тумана в голове», панических атак и психогенной депрессии, нарушениях сна и засыпания, а также

присутствовали головная боль, головокружение, артралгии, миалгии. У большинства пациентов (75%) возникали периодически повышенная потливость и субфебрилитет, а в 18% случаев длительно сохранялись кашель и одышка.

У пациентов ГИ1 были установлены клинические признаки ГВИ с последующей их детекцией. Согласно полученным данным, показано, что в ГИ1 частота встречаемости моно- и микст-ГВИ была следующей: у 20 пациентов отмечались клинические проявления ВПГ1-инфекции орофациальной локализации; из них у 37,2% детектировалась моно-ГВИ – ВПГ1-инфекция; у 62,8% определялась микст-ГВИ: ВПГ1-инфекция и ВЭБ-инфекция (36,8%); ВПГ1-инфекция и ВЧГ6-инфекция (21%); ВПГ1-инфекция, ВЭБ-инфекция и ВЧГ6-инфекция (5%). Среди пациентов, страдающих микст-ГВИ, отмечались наиболее яркие клинические проявления ПКС, среди которых лидирующее место занимали дли-

тельные ощущения СХУ и КР, а выраженность симптомов составляла 19 (17-21) баллов, тогда как при моно-ГВИ – 15 (14-16) баллов.

При исследовании уровня субпопуляций НГ, экспрессирующих рецепторы к IFN I (IFN $\alpha$ / $\beta$ R1), II типов IFN $\gamma$ R (CD119) и активационный маркерный рецептор CD16, было установлено, что в периферической крови ГС циркулируют 3 субпопуляции НГ: CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1-CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>. НГ субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1-CD119<sup>+</sup> составляют 93,7 (89,8-96,5)% с плотностью экспрессии по MFI CD16 – 39,8 (20,4-51,3) и CD119<sup>+</sup>(IFN $\gamma$ ) – 2,8 (2,5-3,1). Доля субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>, не экспрессирующая рецептор к IFN $\gamma$ , была представлена 1,4 (0,5-2,4)% НГ с плотностью экспрессии по MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 – 3,4 (2,6-4,1) и MFI CD16 – 39,9 (22,9-54,5). Также определялась субпопуляция НГ CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>, одновременно экспрессирующая IFN $\alpha$ / $\beta$  и IFN $\gamma$  рецепторы, представленная всего 0,9 (0,4-1,8)% НГ, но при этом имеющая более высокие значения плотности экспрессии IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 ( $p > 0,05$ ) и CD119 молекул ( $p > 0,05$ ) (табл. 2).

В ГИ 1 содержание НГ субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1-CD119<sup>+</sup>НГ не отличалось от ГС ( $p > 0,05$ ), но при этом было выявлено увеличение плотности экспрессии рецепторов по MFI в 2,6 раза CD16 ( $p < 0,05$ ) и в 1,9 раз CD119 ( $p < 0,05$ ). Напротив, наблюдалась тенденция снижения в 2,8 раз содержания субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119-НГ ( $p > 0,05$ ). При этом для этой субпопуляции были характерны повышенные уровни экспрессии в 4,5 раза рецептора IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 ( $p < 0,05$ ) и в 1,7 раз CD16 ( $p < 0,05$ ) по отношению к показателям ГС. Отличительной особенностью показателей ГИ 1 явилось отсутствие субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup> (табл. 2). При этом только у 3 пациентов с микст-ГВИ (ВПГ1-инфекция, ВЭБ-инфекция и ВЧГ6-инфекция) регистрировались 0,3 (0,3-0,7)% НГ субпопуляции CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup> с повышенными в 1,8 раз MFI IFN $\alpha$ / $\beta$ R1-10,3 (9,82-10,5), в 6 раз CD119 – 18,4 (10,4-34,8) и в 1,4 раза CD16 – 54,7 (38,4-91,8) по отношению к значениям ГС ( $p_{1-3} < 0,05$ ).

Таким образом, у пациентов с ПКС на фоне моно- и микст-ГВИ отмечается трансформация фенотипа субпопуляций НГ, несущих рецепторы к IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  и активационный рецептор CD16, отвечающий за цитотоксичность НГ по отношению к инфицированным вирусом клеткам. Выявлено статистически значимое повышение плотности экспрессии всех изучаемых рецепто-

ров на субпопуляциях CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119-НГ и CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1-CD119<sup>+</sup>НГ, демонстрирующих готовность к восприятию цитокиновых сигналов и ответа на них.

Ранее нами были получены данные об аналогичных вариантах трансформации фенотипа субпопуляций НГ CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1-CD119<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup> на фоне неадекватно низкого уровня IFN I и II типов у пациентов в острый период COVID-19 [5]. Кроме того, следует отметить, что регистрируемые показатели повышенной плотности экспрессии CD16, IFN $\alpha$ / $\beta$ R1 и CD119 при COVID-19 были существенно ниже, выявляемых значений у пациентов с ПКС через 3 месяца после перенесенного заболевания.

Сопоставление полученных результатов позволяет предположить, что у пациентов с ПКС сохраняется дефицит IFN, что способствует активации ГВИ. Из данных литературы также известно, что при COVID-19 на фоне дефицита IFN I типа происходит активация ВЭБ, ЦМВ, ВЧГ6 [9].

Также были продемонстрированы экспериментальные данные позитивного влияния рекIFN $\alpha$ 2b на количественные и фенотипические характеристики 3 субпопуляций НГ: CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1-CD119<sup>+</sup>НГ, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>-</sup>НГ, CD16<sup>+</sup>IFN $\alpha$ / $\beta$ R1<sup>+</sup>CD119<sup>+</sup>НГ, и фагоцитарную функцию пациентов с COVID-19. В эксперименте *in vitro* было показано восстановление дефектной экспрессии NF- $\kappa$ B под влиянием рекIFN $\alpha$ 2b у 48% НГ пациентов с ГВИ [5].

## Заключение

С этих позиций в лечении пациентов с ПКС с позитивной клинико-иммунологической эффективностью может быть использован рекIFN $\alpha$ 2b в комбинации с высокоактивными антиоксидантами, который может способствовать формированию протективного иммунитета и быть полезен как для профилактики различных острых вирусных инфекций, так и обострения хронических вирусных инфекций, в частности ГВИ, реставрации измененного фенотипа субпопуляций НГ и способности к восприятию интерферонов с последующим устранением дисбаланса в противоинфекционном иммунитете. Снижение инфекционной нагрузки в постковидном периоде и адекватная работа иммунной системы в реализации механизмов нейроиммуоэндокринной регуляции будут способствовать восстановлению функционирования различных органов и систем, что позволит нивелировать проявления постковидного синдрома.

## Список литературы / References

1. Белопасов В.В., Журавлева Е.Н., Нугманова Н.П., Абдрашитова А.Т. Постковидные неврологические синдромы // Клиническая практика, 2021. Т. 12, № 2. С. 69-82. [Belopasov V.V., Zhuravleva E.N., Nugmanova N.P., Abdzashitova A.T. Post-COVID-19 Neurological Syndromes. *Klinicheskaya praktika = Journal of Clinical Practic*, 2021, Vol. 12, no. 2, pp. 69-82. (In Russ.)]
2. Канорский С.Г. Постковидный синдром: распространенность и патогенез органических поражений, направления коррекции. Систематический обзор // Кубанский научный медицинский вестник, 2021. Т. 28, № 6. С. 90-116. [Kanorsky S.G. Postcovid syndrome: prevalence and pathogenesis of organ lesions, directions of correction. Systematic review. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2021, Vol. 28, no. 6, pp. 90-116. (In Russ.)]
3. Ковальчук В.В., Дроздова М.С., Чепель Ю.А., Нестерин К.В. Постковидный синдром. Мифы и реалии // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 23. С. 20-26. [Kovalchuk V.V., Drozdova M.S., Chepel Yu.A., Nesterin K.V. Postcovid syndrome. Myths and realities. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 23, pp. 20-26. (In Russ.)]
4. Методические рекомендации «Особенности течения Long-COVID инфекции. Терапевтические и реабилитационные мероприятия» // Терапия, 2022. Т. 1 (Приложение). С. 1-147. [Methodological recommendations "Features of Long-COVID infection clinical course. Therapeutic and rehabilitation measures". *Terapiya = Therapy*, 2022, Vol. 1 (Suppl.), pp. 1-147. (In Russ.)]
5. Нестерова И.В., Городин В.Н., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Матушкина В.А., Габдрахманова Р.Ю., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Малиновская В.В., Семененко Т.А. Эффекты влияния рекомбинантного интерферона  $\alpha$ -2b на фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов пациентов с COVID-19 // Инфекционные болезни, 2022. Т. 20, № 1. С. 43-51. [Nesterova I.V., Gorodin V.N., Chudilova G.A., Chapurina V.N., Matushkina V.A., Gabdrakhmanova R.Yu., Lomtaticze L.V., Kovaleva S.V., Malinovskaya V.V., Semenenko T.A. Effects of recombinant interferon  $\alpha$ -2b on the phenotype of neutrophil granulocyte subpopulations of patients with COVID-19. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2022, Vol. 20, no. 1, pp. 43-51. (In Russ.)]
6. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Халтурина Е.О., Малиновская В.В. Врожденные и приобретенные интерферопатии, ассоциированные с нетипично протекающими вирусными инфекциями и с COVID-19 // Иммуноterapia в практике ЛОР-врача и терапевта / Под ред. А.С. Симбирцев, Г.В. Лавренова. СПб.: Диалог, 2022. С. 234-269. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Khalturina E.O., Malinovskaya V.V. Congenital and acquired interferonopathies associated with atypical viral infections and COVID-19. Immunotherapy in the practice of ENT doctor and therapist / Ed. Simbirtsev A.S., Lavrenova G.V.] St. Petersburg: Dialog, 2022, pp. 234-269.
7. Нестерова И.В., Халтурина Е.О., Малиновская В.В. Клинико-иммунологическая эффективность интеграционной программы реабилитации иммунной системы у пациентов с атипичной хронической активной герпесвирусной коинфекцией до и во время COVID-19, а также в постковидном периоде // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 37. С. 30-41. [Nesterova I.V., Khalturina E.O., Malinovskaya V.V. Clinical and immunological effectiveness of the integration program for the rehabilitation of the immune system in patients with atypical chronic active herpesvirus coinfection before and during COVID-19, as well as in the postcovid period. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 37, pp. 30-41. (In Russ.)]
8. Хасанова Д.Р., Житкова Ю.В., Васкаева Г.Р. Постковидный синдром: обзор знаний о патогенезе, нейропсихиатрических проявлениях и перспективах лечения // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика, 2021. Т. 13, № 3. С. 93-98. [Khasanova D.R., Zhitkova Yu.In, Maskaeva G.R. Postcovid syndrome: a review of knowledge about pathogenesis, neuropsychiatric manifestations and treatment prospects. *Nevrologiya, neyropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*, 2021, Vol. 13, no. 3, pp. 93-98. (In Russ.)]
9. Chua R.L., Lukassen S., Trump S., Hennig B.P., Wendisch D., Pott F., Debnath O., Thürmann L., Kurth F., Völke M.T., Kazmierski J., Timmermann B., Twardziok S., Schneider S., Machleidt F., Müller-Redetzky H., Maier M., Krannich A., Schmidt S., Balzer F., Liebig J., Loske J., Suttorp N., Eils J., Ishaque N., Liebert U.G., von Kalle C., Hocke A., Witzenrath M., Goffinet C., Drosten C., Laudi S., Lehmann I., Conrad C., Sander L.-E., Eils R. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat. Biotechnol.*, 2020, Vol. 38, pp. 970-979.
10. COVID-19 rapid guideline: managing the long-term effects of COVID-19. NICE guideline. Available at: [www.nice.org.uk/guidance/ng188](http://www.nice.org.uk/guidance/ng188).
11. Nesterova I.V., Khalturina E.O., Malinovskaya V.V., Nguen T.L. Recombinant IFN $\alpha$ 2b in complex with immunotropic drugs restored antiviral functions of subset iFN $\alpha$ / $\beta$ RI<sup>+</sup>IFN $\gamma$ R<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup>NG neutrophilic granulocyte and demonstrated good clinical efficacy in patients with active chronic herpes-viral infections and chronic fatigue syndrome. Allergy & asthma, COVID-19 & COPD, immunophysiology & immunorehabilitology: innovative technologies. Ed. R. Sepiashvili. Bologna: Filodiritto Publishe, 2021, pp. 70-78.

12. Reusch N., de Dominico E., Bonaguro L., Schulte-Schrepping J., Babler K., Schultze J.L., Aschenbrenner A.C. Neutrophils in COVID-19. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 652470. doi: 10.3389/fimmu.2021.652470.
13. Simonnet A., Engelmann I., Moreau A.S., Garciaa B., Sixa S., Kalioubie A.E., Robriquet L., Hober D., Jourdain M. High incidence of Epstein–Barr virus, cytomegalovirus, and human-herpes virus-6 reactivations in critically ill patients with COVID-19. *Infect. Dis. Now*, 2021, Vol. 51, no. 3, pp. 296-299.
14. Whiteside D.M., Oleynick V., Holker E., Waldron E.J., Porter J., Kasprzak M. Neurocognitive deficits in severe COVID-19 infection: Case series and proposed model. *Clin. Neuropsychol.*, 2021, Vol. 35, no. 4, pp. 799-818.
15. Yang J., Zheng Y., Gou X., Pu K., Chen Z., Guo Q., Ji R., Wang H., Wang Y., Zhou Y. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 94, pp. 91-95.

---

**Авторы:**

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

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

**Authors:**

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

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

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

**Матушкина В.А.** — ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Ковалева С.В.** — д.м.н., доцент, старший научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Чапурина В.Н.** — ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

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

**Matushkina V.A.**, Assistant Professor, Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Kovaleva S.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory; Associate Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Chapurina V.N.**, Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

---

Поступила 15.05.2023  
Принята к печати 29.06.2023

---

Received 15.05.2023  
Accepted 29.06.2023

## ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ – ПЕПТИДА ZP2 НА АНТИЛИЗОЦИМНУЮ АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*

Пашинина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Гриценко В.А.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук – структурное научное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Резюме.** Цель – проанализировать характер влияния синтетического аналога активного центра ГМ-КСФ – пептида ZP2 на антилизоцимную активность (АЛА) грибов рода *Candida*.

В работе использовали 32 вагинальных изолята *Candida* spp. пяти видов, выделенных из отделяемого влагалища от условно здоровых беременных в рамках скрининга. Для изучения влияния ZP2 на АЛА грибов рода *Candida* проводили сокультивирование грибов с раствором ZP2 в бульоне Сабуро при 37 °С в течение 24 ч. Далее определяли АЛА грибов фотометрическим методом.

Установлено, что пептид ZP2 вызывал снижение экспрессивности АЛА вагинальных изолятов *Candida* spp.: потерю АЛА у изолятов *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* и у части изолятов *C. albicans*, а также снижение уровня АЛА у *C. kefir* и другой части изолятов *C. albicans*. Таким образом, синтетический аналог активного центра ГМ-КСФ – пептид ZP2 оказывает ингибирующее действие на АЛА грибов рода *Candida*

**Ключевые слова:** *Candida*, антилизоцимная активность, синтетический аналог ГМ-КСФ – пептид ZP2

## EFFECT OF SYNTHETIC ANALOGUE OF ZP2 PEPTIDE, AN ACTIVE CENTER OF GM-CSF, UPON ANTILYSOZYME ACTIVITY OF *CANDIDA*

Pashinina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M., Gritsenko V.A.

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

**Abstract.** Our aim was to analyze the effects of the ZP2 peptide, a synthetic analogue of active center of GM-CSF, upon antilysozyme activity (ALA) of *Candida*.

32 vaginal isolates of *Candida* spp were used in the work. Five species have been isolated from the vaginal secretions of the conditionally healthy pregnant women taken within a screening program. To study the effect of ZP2 on the ALA of the *Candida* fungi, the fungal cells were co-cultured with a ZP2 solution in Saburo broth medium at 37 °C for 24 hours. Thereafter, ALA of fungi was determined by photometric method.

### Адрес для переписки:

Пашинина Ольга Александровна  
ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук  
460014, Россия, г. Оренбург, ул. Набережная, 29.  
Тел.: 8 (922) 543-91-41.  
E-mail: olga25mikro@mail.ru

### Address for correspondence:

Olga A. Pashinina  
Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian  
Academy of Sciences  
29 Naberezhnaya St  
Orenburg  
460014 Russian Federation  
Phone: +7 (922) 543-91-41.  
E-mail: olga25mikro@mail.ru

### Образец цитирования:

О.А. Пашинина, О.Л. Карташова, Т.М. Пашкова, В.А. Гриценко «Влияние синтетического аналога активного центра ГМ-КСФ – пептида ZP2 на антилизоцимную активность грибов рода *Candida*» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 373-376.  
doi: 10.46235/1028-7221-9645-EOS

© Пашинина О.А. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

O.A. Pashinina, O.L. Kartashova, T.M. Pashkova, V.A. Gritsenko “Effect of synthetic analogue of ZP2 peptide, an active center of GM-CSF, upon antilysozyme activity of *Candida*”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 373-376.  
doi: 10.46235/1028-7221-9645-EOS

© Pashinina O.A. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-9645-EOS

It was found that the ZP2 peptide caused a decreased expression of ALA of vaginal *Candida* spp. Isolates, i.e., loss of ALA in the isolates of *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and some isolates of *C. albicans*, as well as a decreased level of ALA in *C. kefir* and other *C. albicans* isolates. Thus, the synthetic analogue of ZP2 peptide (active center of GM-CSF) showed an inhibitory effect upon the antilysozyme activity of *Candida*.

Keywords: *Candida*, antilysozyme activity, synthetic analogue of GM-CSF – peptide ZP2

## Введение

Антилизоцимная активность (АЛА) — один из факторов персистенции, обеспечивающих толерантность микроорганизмов к действию лизоцима человека и животных.

У дрожжеподобных грибов рода *Candida* АЛА встречается практически в 100% случаев [3, 8]. Распространенность и выраженность данного признака были изучены у грибов, выделенных при разных заболеваниях и из различных биотопов тела человека, при этом выявлено, что присутствие грибов с высоким уровнем АЛА способствует длительному течению инфекционного процесса и может быть критерием его хронизации [9, 10, 12, 14]. Рядом авторов показано влияние факторов различного генеза на выраженность АЛА у грибов рода *Candida* [15, 16, 17]. Однако влияние синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (ГМ-КСФ) — пептида ZP2 на антилизоцимную активность грибов рода *Candida* ранее не исследовалось.

В то же время известно, что данный пептид ZP2 обладает широким спектром биологического действия [5, 7]. В частности, установлены его модифицирующие эффекты на способность *S. aureus* формировать биопленки [4], а также показано его влияние на антицитокиновую активность ряда микроорганизмов и их способность к продукции цитокиноподобных веществ [6, 11].

Вышеизложенное указывает на актуальность изучения влияния синтетического пептида ZP2 на биологические свойства грибов рода *Candida*, в том числе, на их антилизоцимную активность и другие факторы персистенции.

**Цель** — проанализировать характер влияния синтетического аналога активного центра ГМ-КСФ — пептида ZP2 на антилизоцимную активность грибов рода *Candida*.

## Материалы и методы

В работе использовали 32 вагинальных изолята *Candida* spp. пяти видов (*C. albicans*, *C. glabrata*,

*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefir*), выделенных из отделяемого влагалища от условно-здоровых беременных в рамках регламентированного скрининга. Выделение грибов осуществляли по [13], видовую идентификацию изолятов грибов проводили общепринятым методом на основании морфологических и биохимических свойств.

Для изучения влияния ZP2 на АЛА грибов рода *Candida* проводили культивирование 1 мл взвеси грибов в физиологическом растворе с 1 мл раствора ZP2 концентрацией 0,1 мкг/мл в 2 мл бульона Сабуро при 37 °С в течение 24 ч. Контролем служили пробы без добавления раствора ZP2. Затем контрольные и опытные пробы центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин, сливали надосадочную жидкость, добавляли к осадку 2 мл бульона Сабуро и ресуспензировали. Далее отбирали по 150 мкл взвеси для оценки уровня АЛА грибов, которую определяли фотометрическим методом [2]. Полученные данные были обработаны методами вариационной статистики [1].

## Результаты и обсуждение

Установлено, что представители всех изученных видов грибов рода *Candida* проявляли АЛА, но с разной частотой. Инактивировать лизоцим были способны 100% изолятов *C. glabrata* и *C. krusei*, 86% — *C. albicans*, 75% — *C. tropicalis* и 50% — *C. kefir*.

Максимальный уровень АЛА отмечен у *C. kefir* (0,52±0,04 мкг/мл), минимальный — у *C. tropicalis* (0,18±0,01 мкг/мл), у *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. krusei* выраженность АЛА составила 0,39±0,01, 0,33±0,01 и 0,24±0,02 мкг/мл соответственно.

В результате проведения опытов *in vitro* установлено, что синтетический пептид ZP2 вызывал потерю способности инактивировать лизоцим у изолятов *C. glabrata*, *C. tropicalis* и *C. krusei*, а также у 50% штаммов *C. albicans*. На распространенность признака у *C. kefir* пептид влияния не оказывал.

При анализе влияния синтетического пептида ZP2 на выраженность антилизоцимного признака у вагинальных изолятов *Candida* spp. установлено достоверное снижение уровня АЛА у грибов

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА ZP2 НА АНТИЛИЗОЦИМНУЮ АКТИВНОСТЬ (АЛА) ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*

TABLE 1. EFFECT OF PEPTIDE ZP2 ON THE ANTILYSOZYME ACTIVITY (ALA) OF *CANDIDA* spp.

	Распространенность, % / Prevalence, %		Выраженность, мкг/мл / Expression, mcg/mL	
	Контроль / Control	Опыт / Experience	Контроль / Control	Опыт / Experience
<i>C. albicans</i> (n = 16)	86	43	0,39±0,01	0,27±0,03*
<i>C. glabrata</i> (n = 4)	100	0	0,33±0,02	0
<i>C. tropicalis</i> (n = 4)	75	0	0,18±0,01	0
<i>C. krusei</i> (n = 4)	100	0	0,24±0,01	0
<i>C. kefir</i> (n = 4)	50	50	0,52±0,04	0,24±0,02*

Примечание. \* – p < 0,01.

Note. \*, p < 0.01.

всех изученных видов. Так, у *C. albicans* отмечено уменьшение выраженности АЛА в 1,5 раза с  $0,39 \pm 0,01$  до  $0,27 \pm 0,03$  мкг/мл, а у *C. kefir* – в 2,1 раза с  $0,52 \pm 0,04$  до  $0,24 \pm 0,02$  мкг/мл ( $p < 0,01$ ) (табл. 1).

## Заключение

Впервые охарактеризовано влияние синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) – пептида ZP2 на антилизозимную активность штаммов грибов рода

*Candida*, выделенных из репродуктивного тракта условно-здоровых беременных. Установлено, что пептид ZP2 оказывал модифицирующее действие на антилизозимную активность грибов рода *Candida*, снижая как распространенность, так и выраженность АЛА.

Полученные материалы открывают возможность применения пептида ZP2 в качестве вещества, которое может быть эффективно в терапии инфекций, вызванных персистирующими штаммами грибов рода *Candida*, а также для коррекции вагинальной микрофлоры при носительстве грибов данного рода.

## Список литературы / References

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. изд-во мед. лит., 1962. 180 с. [Ashmarin I.P., Vorobyev A.A. Statistical methods in microbiological research]. Leningrad: State Publishing House of Medical Literature, 1962. 180 p.
2. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 365 с. [Bukharin O.V. Persistence of pathogenic bacteria]. Moscow: Meditsina, 1999. 365 p.
3. Вальшев А.В., Перунова Н.Б., Вальшева И.В., Карташова О.Л., Бухарин О.В. Факторы персистенции дрожжеподобных грибов рода *Candida* // Успехи медицинской микологии, 2003. Т. 1. С. 53. [Valyshev A.V., Perunova N.B., Valysheva I.V., Kartashova O.L., Bukharin O.V. Persistence factors of yeast-like fungi of the genus *Candida*. *Uspekhi meditsinskoy mikologii = Advances in Medical Mycology*, 2003, Vol. 1, p. 53. (In Russ.)]
4. Гриценко В.А., Зурочка В.А., Зурочка А.В., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П., Курлаев П.П. Влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на формирование биопленок клиническими изолятами стафилококков // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2015. № 4. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/VAG-2015-4.pdf>. [Gritsenko V.A., Zurochka V.A., Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Tyapaeva Ya.V., Belozertseva Yu.P., Kurlaev P.P. The effect of a synthetic peptide of the active center of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) on the formation of biofilms by clinical isolates of staphylococci. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2015, no. 4. [Electronic resource]. Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/VAG-2015-4.pdf> (In Russ.)]
5. Зурочка А.В., Гриценко В.А., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Черешнев В.А. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и его синтетические аналоги: иммунобиологические эффекты и клиническое применение. Екатеринбург: УрО РАН, 2021. 288 с. [Zurochka A.V., Gritsenko V.A., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Chereshev V.A. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and its synthetic analogues: immunobiological effects and clinical application]. Yekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2021. 288 p.
6. Зурочка В.А., Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Тяпаева Я.В., Гриценко В.А. Влияние синтетического пептида активного центра GM-CSF на продукцию бактериями цитокиноподобных веществ в бульонных культурах // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, Специальный выпуск. Экспериментальные модели. С. 33-34. [Zurochka V.A., Zurochka A.V., Ducardt V.V., Zueva E.B., Dobrynina M.A., Tyapaeva Ya.V., Gritsenko V.A. Effect of GM-CSF active site synthetic peptide for products with bacteria of cytokine-like substances in broth culture. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, Special issue. *Experimental models*, pp. 33-34. (In Russ.)]
7. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Гриценко В.А. Иммунобиологические свойства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и синтетических пептидов его активного центра // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1033-1056. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A. Immunobiological properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and synthetic peptides of its active center. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1033-1056. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2216.
8. Капустина О.А., Логачева Л.Е., Карташова О.Л. Видовой состав и биологические свойства грибов рода *Candida*, выделенных из разных биотопов тела человека // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2009. № 4 (24). С. 179-181. [Kapustina O.A., Logacheva L.E., Kartashova O.L. Species composition and biological properties of fungi of the genus *Candida* isolated from different biotopes of the human body. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Bulletin of the Orenburg State Agrarian University*, 2009, no. 4 (24), pp. 179-181. (In Russ.)]
9. Кузьмина Д.А., Новикова В.П., Шабашова Н.В., Оришак Е.А. *Candida* spp. и микробиоценоз полости рта у детей с декомпенсированной формой кариеса. // Проблемы медицинской микологии, 2011. Т. 13, № 1. С. 23-27. [Kuzmina D.A., Novikova V.P., Shabashova N.V., Orishak E.A. *Candida* spp. and microbiocenosis of the oral cavity in children with decompensated caries. *Problemy meditsinskoy mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2011, Vol. 13, no. 1, pp. 23-27. (In Russ.)]
10. Пашинина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Попова Л.П. Характеристика биофильей *Candida albicans*, выделенных у здоровых лиц и при патологии // Проблемы медицинской микологии, 2015. Т. 17, № 3. С. 46-49. [Pashinina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M., Popova L.P. Characteristics of bioprofiles of *Candida albicans* isolated from healthy individuals and in pathology. *Problemy meditsinskoy mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 46-49. (In Russ.)]

11. Пашинина О.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Гриценко В.А., Зурочка А.В. Влияние синтетического аналога активного центра ГМ-КСФ – пептида ZP2 на антицитокиновую активность грибов рода *Candida* и их способность к продукции цитокиноподобных веществ // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2022. Т. 19, № 3. С. 263-272. [Pashinina O.A., Kartashova O.L., Pashkova T.M., Gritsenko V.A., Zurochka A.V. Influence of a synthetic analogue of the active center of GM-CSF – peptide ZP2 on the anticytokine activity of fungi of the genus *Candida* and their ability to produce cytokine-like substances. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 263-272. (In Russ.)]
12. Пашинина О.А., Карташова О.Л., Уткина Т.М., Потехина Л.П. Характеристика биологических свойств клинических изолятов *Candida albicans* // Проблемы медицинской микологии, 2014. Т. 16, № 3. С. 91-93. [Pashinina O.A., Kartashova O.L., Utkina T.M., Potekhina L.P. Characterization of the biological properties of clinical isolates of *Candida albicans*. *Problemy meditsinskoy mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2014, Vol. 16, no. 3, pp. 91-93. (In Russ.)]
13. Реброва Р.Н. Грибы рода *Candida* при заболеваниях негрибковой этиологии. М.: Медицина, 1989. 128 с. [Rebrova R.N. *Candida* fungi in diseases of non-fungal etiology. Moscow: Meditsina, 1989. 128 p.]
14. Свиридов М.А., Долгушин И.И., Карташова О.Л. Оценка персистентных характеристик *Candida albicans* // Медицинская наука и образование Урала, 2008. № 4. С. 104-105. [Sviridov M.A., Dolgushin I.I., Kartashova O.L. Evaluation of persistent characteristics of *Candida albicans*. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala = Medical Science and Education of the Urals*, 2008, no. 4, pp. 104-105. (In Russ.)]
15. Уткина Т.М., Потехина Л.П., Карташова О.Л. Антимикробное и антиперсистентное действие растительных экстрактов различных видов полыни южной Сибири // Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2014. Т. 126, № 3. С. 93-96. [Utkina T.M., Potekhina L.P., Kartashova O.L. Antimicrobial and antipersistent action of plant extracts of various types of wormwood from southern Siberia. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2014, Vol. 126, no 3, pp. 93-96. (In Russ.)]
16. Уткина Т.М., Потехина Л.П., Карташова О.Л., Ткачев А.В. Регуляция персистентных свойств микроорганизмов экстрактами хвойных растений // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2013. № 3. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.elibrary.ru/download/elibrary\\_20450180\\_31990182.pdf](https://www.elibrary.ru/download/elibrary_20450180_31990182.pdf) [Utkina T.M., Potekhina L.P., Kartashova O.L., Tkachev A.V. Regulation of persistent properties of microorganisms by extracts of coniferous plants. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2013, no. 3. [Electronic resource]. Access mode: [https://www.elibrary.ru/download/elibrary\\_20450180\\_31990182.pdf](https://www.elibrary.ru/download/elibrary_20450180_31990182.pdf) (In Russ.)]
17. Филиппова Ю.В., Бондаренко Т.А., Панфилова Т.В., Железнова А.Д., Сарычева Ю.А., Токарева А.А. Влияние тритерпеноида милиацина на антилизоцимную активность микроорганизмов // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 2. С. 602-604. [Filippova Yu.V., Bondarenko T.A., Panfilova T.V., Zheleznova A.D., Sarycheva Yu.A., Tokareva A.A. Influence of the triterpenoid miliacin on the antilysozyme activity of microorganisms. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 2, pp. 602-604. (In Russ.)]

**Авторы:**

**Пашинина О.А.** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов ИКВС УрО РАН – структурного научного подразделения ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Карташова О.Л.** – д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук – структурное научное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Пашкова Т.М.** – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук – структурное научное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Гриценко В.А.** – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук – структурное научное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Authors:**

**Pashinina O.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Persistence and Symbiosis of Microorganisms, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Kartashova O.L.**, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Persistence and Symbiosis of Microorganisms, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Pashkova T.M.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Persistence and Symbiosis of Microorganisms, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

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

# ВЛИЯНИЕ КУКУРБИТУРИЛОВ НА КОЛИЧЕСТВО И КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ *IN VIVO*

Пашкина Е.А.<sup>1</sup>, Актанова А.А.<sup>1</sup>, Коваленко Е.А.<sup>2</sup>, Козлов В.А.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт неорганической химии им. А.В. Николаева» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Одной из актуальных проблем при разработке систем лекарственной доставки является иммунологическая безопасность наночастиц, применяемых в качестве основы для создания данных систем. Кукурбит[*n*]урилы (СВ[*n*]) – молекулярные наноконтейнеры, способные инкапсулировать различные лекарственные препараты и служить основой для систем доставки. Кукурбитурилы являются малотоксичными соединениями, в условиях *in vitro* проявляют слабые иммуномодулирующие свойства, не обладая при этом иммунотоксичностью.

Целью данного исследования была оценка действия кукурбитурилов в условиях *in vivo* на количество и субпопуляционный состав лейкоцитов периферической крови.

В работе были использованы мыши линии BALB/c в возрасте 2-4 мес. Для проведения данного исследования кукурбитурилы разводились в фосфатно-солевом буфере и вводились лабораторным животным внутрибрюшинно (трехкратно в течение недели).

При оценке влияния кукурбит[7]урилы на показатели крови после трехкратного введения в течение недели внутрибрюшинно лабораторным животным статистически значимых изменений обнаружено не было. Однако при первом введении у лабораторных животных отмечалось небольшое увеличение относительного количества лимфоцитов после первого введения СВ[6] и увеличение доли нейтрофилов после первого введения СВ[8]. В то же время после второго и третьего введения кукурбитурилов доли лимфоцитов и нейтрофилов находились в пределах нормы и не имели статистически значимых различий по сравнению с контролем. Далее проводилась оценка влияния на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови лабораторных животных. Было обнаружено, что после введения СВ[6] в периферической крови наблюдалось снижение Т-лимфоцитов, и одновременно увеличение доли CD19<sup>+</sup>В-лимфоцитов по сравнению с контролем. СВ[7] и СВ[8] не влияли на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови.

Было обнаружено, что введение СВ[*n*] не влияло на показатели крови лабораторных животных, что может свидетельствовать о безопасности данных соединений в условиях *in vivo*. При этом СВ[6] способен оказывать стимулирующее воздействие на гуморальный иммунитет, повышая относительное количество В-лимфоцитов.

**Ключевые слова:** кукурбитурилы, лекарственная доставка, иммунобезопасность, клетки крови, общий анализ крови

## Адрес для переписки:

Пашкина Екатерина Александровна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 227-01-35.  
E-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

## Address for correspondence:

Ekaterina A. Pashkina  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
14 Yadrintsevskaya St  
Novosibirsk  
630099 Russian Federation  
Phone: +7 (383) 227-01-35.  
E-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

## Образец цитирования:

Е.А. Пашкина, А.А. Актанова, Е.А. Коваленко, В.А. Козлов «Влияние кукурбитурилов на количество и клеточный состав лейкоцитов периферической крови лабораторных животных при парентеральном введении *in vivo*» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 377-380.  
doi: 10.46235/1028-7221-9970-EOC

© Пашкина Е.А. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

E.A. Pashkina, A.A. Aktanova, E.A. Kovalenko, V.A. Kozlov  
“Effect of cucurbiturils on the numbers and differential  
counts of peripheral blood leukocytes in laboratory animals  
after *in vivo* parenteral administration”, Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,  
Vol. 26, no. 3, pp. 377-380.  
doi: 10.46235/1028-7221-9970-EOC

© Pashkina E.A. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-9970-EOC

# EFFECT OF CUCURBITURILS ON THE NUMBERS AND DIFFERENTIAL COUNTS OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN LABORATORY ANIMALS AFTER *IN VIVO* PARENTERAL ADMINISTRATION

Pashkina E.A.<sup>a</sup>, Aktanova A.A.<sup>a</sup>, Kovalenko E.A.<sup>b</sup>, Kozlov V.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> A. Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** Immunological safety of nanoparticles is an urgent problem for development of drug delivery systems used as the basis for creating these systems. Cucurbit[n]urils (CB[n]) are molecular nanocontainers that can encapsulate various drugs and serve as the basis for delivery systems. Cucurbiturils are low-toxic compounds: under *in vitro* conditions, they exhibit weak immunomodulatory properties, without sufficient immunotoxicity. The aim of the present study was to evaluate the *in vivo* effects of cucurbiturils on the number and differential leukocyte counts in peripheral blood.

BALB/c mice aged 2–4 months were used in the work. For this study, cucurbiturils were diluted in phosphate-buffered saline and administered to laboratory animals intraperitoneally (three times a week).

When evaluating the effect of cucurbit[7]uril on blood parameters of the animals after three intraperitoneal injections weekly, no statistically significant changes were registered. However, at first administration, the animals showed a slight increase in relative number of lymphocytes after the first injection of CB[6], and an increased proportion of neutrophils after the first administration of CB[8]. Meanwhile, the proportions of lymphocytes and neutrophils were within normal ranges after the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> injections of cucurbiturils, and did not show any significant differences against the controls. Moreover, the impact upon the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in laboratory animals was assessed. After injection of CB[6], there was a decrease in T lymphocytes in the peripheral blood, along with increased proportion of CD19<sup>+</sup>B lymphocytes compared with the controls. CB[7] and CB[8] injections did not affect the subpopulation profile of peripheral blood lymphocytes.

We have found that intraperitoneal administration of CB[n] did not affect the blood parameters of laboratory animals, thus, probably suggesting the *in vivo* safety of these compounds. At the same time, CB[6] is able to exert a stimulating effect on humoral immunity by increasing relative contents of B lymphocytes.

**Keywords:** cucurbiturils, drug delivery, immunosafety, blood cells, blood test

Выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта РНФ № 19-15-00192.

## Введение

Кукурбитурилы – это наноразмерные кавитанды, имеющие форму тыквы, способные к включению в свою полость различных гидрофобных молекул или их фрагментов, а также связыванию положительно заряженных групп в области порталов [3]. Благодаря подобным свойствам кукурбитурилы способны инкапсулировать различные лекарственные препараты и служить основой для систем доставки. В связи с этим актуальной является оценка биологической безопасности кукурбитурилов. В настоящее время известно, что кукурбитурилы в ряде исследований *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали низкую токсичность [4, 5, 6, 7, 8, 10, 12]. При применении кукурбитурилов в очень высоких дозах возможны проявления миотоксичности и нейротоксичности, однако в стандартных концентрациях, используемых при комплексобразовании с лекарственными препаратами, признаков токсичности нет. Однако кроме иммунотоксичности необходимо также исследовать и возможные иммуномодулирующие

свойства систем доставки, так как иммуностимулирующие либо иммуносупрессирующие эффекты системы могут как усиливать, так и ослаблять действие доставляемого лекарственного средства.

Поскольку кукурбит[n]урилы – это ряд гомологов, отличающихся числом гликольурильных фрагментов, формирующих данную молекулу, а значит, и размером полости, нами для исследования были выбраны кукурбит[6]урил, кукурбит[7]урил и кукурбит[8]урил (CB[6], CB[7] и CB[8] соответственно), как обладающие наиболее подходящими для комплексобразования размерами и чаще других применяемые для создания систем лекарственной доставки.

В предыдущих исследованиях мы оценили возможное иммуномодулирующее действие кукурбитурилов [1, 2, 9], было показано, что при культивировании в присутствии CB[n] усиливалась пролиферативную активность клеток и повышалась экспрессию HLA-DR на лимфоцитах, что говорит о иммуностимулирующем действии. Важно отметить, что кукурбитурилы в условиях *in vitro* практически не оказывали иммуносупрессивного действия, за исключением незначительного снижения экспрессии HLA-DR и продукции активных форм кислорода Т-хелперами в сти-

мулированных культурах [2, 9]. Следовательно, представляется актуальным изучение иммунобезопасности и возможного иммуномодулирующего действия кукурбитурилов в условиях *in vivo*.

## Материалы и методы

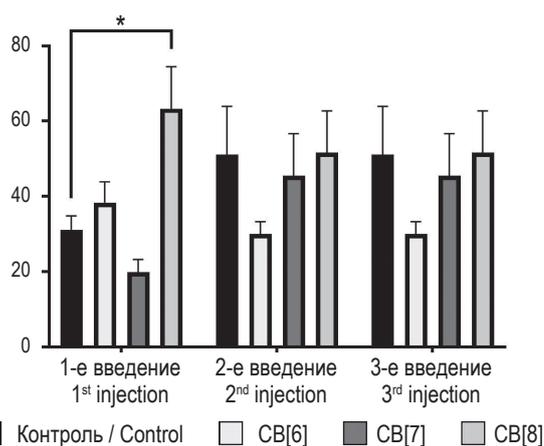
В работе были использованы мыши линии BALB/c в возрасте 2-4 мес. Для проведения данного исследования кукурбитурилы разводились в фосфатно-солевом буфере и вводились лабораторным животным внутривенно.

Животные были разделены на группы по 6-7 мышей, которым внутривенно трехкратно в течение недели проводили инъекции: первой группе – 0,25 мл фосфатно-солевого буфера, второй группе 4М раствора СВ[6], третьей – второй группе 4М раствора СВ[7], четвертой – второй группе 4М раствора СВ[8]. После каждого введения на следующий день лабораторным животным проводился анализ образцов крови в микропробирки с гепарином. Забор крови проводился через сутки после очередной инъекции. Кровь в количестве 10 мкл получали после надреза кончика хвоста, после проведения манипуляций рану прижигали раствором йода. Мазки крови фиксировали, окрашивали азур-эозином, после чего проводили подсчет количества лейкоцитов.

На следующие сутки после третьего введения животные умерщвлялись декапитацией, после чего проводился набор проб периферической крови объемом 1 мл. Выделение мононуклеарных клеток крови проводили с помощью центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографина. Мононуклеарные клетки окрашивали с помощью моноклональных антител с флуоресцентной меткой (CD45-FITC, CD3-APC, CD16-PE/Cy7 и CD19-PE, BioLegend, США), после чего проводили цитометрический анализ с помощью FACS CANTO II.

## Результаты и обсуждение

При оценке влияния кукурбит[7]урилы на показатели крови после трехкратного введения в течение недели внутривенно лабораторным животным статистически значимых изменений обнаружено не было. Однако при первом введении у лабораторных животных отмечалось небольшое увеличение относительного количества лимфоцитов после первого введения СВ[6] и уве-



**Рисунок 1. Влияние кукурбитурилов на относительное количество нейтрофилов в периферической крови лабораторных животных**

Figure 1. The effect of cucurbiturils on relative number of neutrophils in the peripheral blood of laboratory animals

личение доли нейтрофилов после первого введения СВ[8] (рис. 1). В то же время после второго и третьего введения кукурбитурилов доли лимфоцитов и нейтрофилов находились в пределах нормы и не имели статистически значимых различий по сравнению с контролем.

Далее нами проводилась оценка влияния на субпопуляционный состав лимфоцитов. Было показано, что СВ[7] и СВ[8] не влияли на соотношение Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-клеток в крови лабораторных животных (табл. 1). При этом СВ[6] приводил к увеличению относительного количества В-лимфоцитов и пропорционально снижал долю Т-клеток. Поскольку при проведении оценки общего числа лимфоцитов СВ[6] не снижал данный показатель у лабораторных мышей, а, напротив, приводил к повышению содержания лимфоцитов в периферической крови после первого введения, подобные изменения в субпопуляционном составе могут быть связаны прежде всего с увеличением доли В-клеток, а не снижением абсолютного количества Т-лимфоцитов.

Известно, что мыши линии BALB/c более склонны к развитию гуморального иммунного ответа [11], поэтому подобное увеличение доли В-лимфоцитов также может быть связано с особенностью реагирования данной линии живот-

**ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ КУКУРБИТУРИЛОВ НА СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

TABLE 1. EFFECT OF CUCURBITURILS ON THE SUBPOPULATION COMPOSITION OF LYMPHOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF LABORATORY ANIMALS

	PBS	CB[6]	CB[7]	CB[8]
CD3 <sup>+</sup>	54,50±4,67%	42,90±5,25%*	54,50±3,33	58,20±3,87%
CD19 <sup>+</sup>	32,80±3,58%	50,10±5,86%*	37,60±3,34%	30,10±3,04%
CD16 <sup>+</sup>	4,70±0,91%	5,00±0,67%	4,18±0,76%	4,80±1,77%

Примечание. \* – достоверные различия по сравнению с PBS.

Note. \*, significant differences compared to PBS.

ных. Однако поскольку СВ[7] и СВ[8] подобного эффекта в виде увеличения доли В-лимфоцитов не оказывали, можно предположить, что СВ[6] способен активировать гуморальный иммунитет в условиях *in vivo*. Ранее в условиях *in vitro* было продемонстрировано, что СВ[6] способен влиять на гуморальный иммунный ответ, усиливая антигенпрезентирующие свойства В-лимфоцитов [9]. Следовательно, кукурбитурилы при парентеральном введении не приводят к снижению количества иммунных клеток у лабораторных животных, но способны влиять на иммунологический баланс.

Подобные результаты могут свидетельствовать о безопасности использования кукурбитурилов в

качестве систем доставки *in vivo* и возможности применения данных наноразмерных кавитандов для модуляции иммунного ответа при лекарственной доставке.

## Выводы

Было обнаружено, что введение СВ[n] не влияло на показатели крови лабораторных животных, что может свидетельствовать о безопасности данных соединений в условиях *in vivo*. При этом СВ[6] способен оказывать стимулирующее воздействие на гуморальный иммунитет, повышая относительное количество В-лимфоцитов.

## Список литературы / References

1. Aktanova A., Abramova T., Pashkina E., Boeva O., Grishina L., Kovalenko E., Kozlov V. Assessment of the biocompatibility of cucurbiturils in blood cells. *Nanomaterials (Basel)*, 2021, Vol. 11, no. 6, 1356. doi: 10.3390/nano11061356.
2. Aktanova A.A., Boeva O.S., Barkovskaya M.S., Kovalenko E.A., Pashkina E.A. Influence of cucurbiturils on the production of reactive oxygen species by T and B lymphocytes, platelets and red blood cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 2, 1441. doi: 10.3390/ijms24021441.
3. Barooah N., Mohanty J., Bhasikuttan A.C. Cucurbituril-based supramolecular assemblies: prospective on drug delivery, sensing, separation, and catalytic applications. *Langmuir*, 2022, Vol. 38, no. 20, pp. 6249-6264.
4. Chen H., Chan J.Y.W., Yang X., Wyman I.W., Macartney D.H., Bardelang D., Lee S.M.Y., Wang R. Developmental and organspecific toxicity of cucurbit[7]uril: In vivo study on zebrafish models. *RSC Adv.*, 2015, Vol. 5, pp. 30067-30074.
5. Das D., Assaf K.I., Nau W.M. Applications of cucurbiturils in medicinal chemistry and chemical biology. *Front. Chem.*, 2019, Vol. 7, 619. doi: 10.3389/fchem.2019.00619.
6. Hettiarachchi G., Nguyen D., Wu J., Lucas D., Ma D., Isaacs L., Briken V. Toxicology and drug delivery by cucurbit[n]uril type molecular containers. *PLoS One*, 2010, Vol. 5, no. 5, e10514. doi: 10.1371/journal.pone.0010514.
7. Jeon Y.J., Kim S.Y., Ko Y.H., Sakamoto S., Yamaguchi K., Kim K. Novel molecular drug carrier: Encapsulation of oxaliplatin in cucurbit[7]uril and its effects on stability and reactivity of the drug. *Org. Biomol. Chem.*, 2005, Vol. 3, pp. 2122-2125.
8. Oun R., Floriano R.S., Isaacs L., Rowana E.G., Wheate N.J. The ex vivo neurotoxic, myotoxic and cardiotoxic activity of cucurbiturilbased macrocyclic drug delivery vehicles. *Toxicol. Res.*, 2014, Vol. 3, pp. 447-455.
9. Pashkina E., Aktanova A., Blinova E., Mirzaeva I., Kovalenko E., Knauer N., Ermakov A., Kozlov V. Evaluation of the immunosafety of cucurbit[n]uril on peripheral blood mononuclear cells *In Vitro. Molecules*, 2020, Vol. 25, no. 15, 3388. doi: 10.3390/molecules25153388.
10. Pejchal J., Jošt P., Múčková L., Andrýs R., Lísa M., Zdarova Karasova J. A systematic evaluation of the cucurbit[7]uril pharmacokinetics and toxicity after a single dose and short-term repeated administration in mice. *Arch. Toxicol.*, 2022, Vol. 96, no. 5, pp. 1411-1421.
11. Pinchuk L.M., Filipov N.M. Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immun. Ageing*, 2008, Vol. 5, 1. doi: 10.1186/1742-4933-5-1.
12. Uzunova V.D., Cullinane C., Brix K., Nau W.M., Day A.I. Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: An exploratory *in vitro* and *in vivo* study. *Org. Biomol. Chem.*, 2010, Vol. 8, pp. 2037-2042.

### Авторы:

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

**Актанова А.А.** — младший научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Коваленко Е.А.** — к.х.н., научный сотрудник ФГБНУ «Институт неорганической химии им. А.В. Николаева» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия

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

### Authors:

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

**Aktanova A.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Kovalenko E.A.**, PhD (Chemistry), Research Associate, Laboratory of Chemistry of Cluster and Supramolecular Compounds, A. Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

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

Поступила 15.05.2023  
Принята к печати 29.06.2023

Received 15.05.2023  
Accepted 29.06.2023

## СОДЕРЖАНИЕ МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТОК-СУПРЕССОРОВ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ

Радыгина Т.В.<sup>1</sup>, Купцова Д.Г.<sup>1</sup>, Петричук С.В.<sup>1</sup>, Потапов А.С.<sup>1,2</sup>,  
Мурашкин Н.Н.<sup>1,2,3</sup>, Абдуллаева Л.М.<sup>1</sup>, Курбатова О.В.<sup>1</sup>,  
Цветкова В.С.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента РФ, Москва, Россия

**Резюме.** Клетки-супрессоры миелоидного происхождения (MDSCs) играют важную роль в регуляции иммунного ответа. Показано увеличение их количества у взрослых пациентов с аутоиммунными заболеваниями. G-MDSCs, M-MDSCs и MDSCs(M<sup>+</sup>G<sup>-</sup>) на разных стадиях аутоиммунного заболевания могут как активировать пролиферацию Т-клеток, приводя к прогрессированию заболевания, так и подавлять их, способствуя дифференцировке Трег-клеток. Аргиназа-1 (Arg-1) — фермент MDSCs, который снижает концентрацию аргинина, необходимого для пролиферации Т-лимфоцитов. Цель — оценить содержание популяций MDSCs и функциональную активность MDSCs у детей с аутоиммунными заболеваниями. Обследовано 75 детей с воспалительными заболеваниями кишечника, 60 детей с рецидивирующе-ремиттирующим РС (РС), 69 детей с вульгарным псориазом (ПС), 62 здоровых ребенка сравнимых по возрасту. Содержание общей популяции MDSCs ((CD3, CD19, CD56, HLA-DR)<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup> и CD33<sup>+</sup>), популяций MDSCs (M-MDSCs, G-MDSCs разделяли по экспрессии CD14 и CD15), оценку активности Arg-1 (в пермеабиллизированных лимфоцитах) проводили методом проточной цитометрии. Результаты представлены в виде Me и Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>. Достоверность различий между группами оценивали непараметрическим U-критерием Манна-Уитни. Содержание MDSCs у пациентов с ВЗК, РС и ПС было достоверно выше, чем в группе сравнения, и зависело от состояния обострение/ремиссия. В обострении и ремиссии ВЗК, РС и ПС выявлено достоверное повышение % содержания MDSCs относительно здоровых детей, наибольшие значения выявлены у детей в обо-

### Адрес для переписки:

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

### Address for correspondence:

Tatyana V. Radygina  
National Medical Research Center for Children's Health  
2 Lomonosovsky Ave, Bldg 1  
Moscow  
119991 Russian Federation  
Phone: +7 (499) 134-13-98.  
Fax: +7 (499) 134-70-01.  
E-mail: tvradigina@mail.ru

### Образец цитирования:

Т.В. Радыгина, Д.Г. Купцова, С.В. Петричук, А.С. Потапов, Н.Н. Мурашкин, Л.М. Абдуллаева, О.В. Курбатова, В.С. Цветкова «Содержание миелоидных клеток-супрессоров при аутоиммунных заболеваниях у детей» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 381-388.  
doi: 10.46235/1028-7221-10044-COM

© Радыгина Т.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

T.V. Radygina, D.G. Kuptsova, S.V. Petrichuk, A.S. Potapov, N.N. Murashkin, L.M. Abdullaeva, O.V. Kurbatova, V.S. Tsvetkova "Content of myeloid-derived suppressor cells in autoimmune diseases in children", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 381-388.  
doi: 10.46235/1028-7221-10044-COM

© Radygina T.V. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-10044-COM

стрении РС (Me-3,5 (2,5-5,6) % МНК против Me-1,6 (0,9-2,5) % МНК,  $p < 0,001$ ). У пациентов с РС содержание G-MDSC, M-MDSC было достоверно выше, а MDSC(M-G<sup>-</sup>) ниже показателей здоровых детей. Показано повышение абсолютного количества G-MDSC в обострении РС по сравнению с ремиссией заболевания ( $p = 0,022$ ). Для пациентов с ВЗК получено значимое увеличение % содержания MDSCs и M-MDSC ( $p = 0,014$  и  $p = 0,045$  соответственно) в обострении заболевания относительно ремиссии. У пациентов с ВЗК, РС и ПС выявлено достоверное увеличение активности Arg-1 в MDSCs при снижении количества MDSCs у пациентов в ремиссии относительно обострения заболевания. У детей с аутоиммунными заболеваниями выявлено увеличение популяций MDSCs. Активность аргиназы-1 в MDSCs увеличена в состоянии ремиссии на фоне снижения их количества.

*Ключевые слова:* миелоидные клетки-супрессоры, ВЗК, РС, псориаз, дети

## CONTENT OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS IN AUTOIMMUNE DISEASES IN CHILDREN

Radygina T.V.<sup>a</sup>, Kuptsova D.G.<sup>a</sup>, Petrichuk S.V.<sup>a</sup>, Potapov A.S.<sup>a, b</sup>,  
Murashkin N.N.<sup>a, b, c</sup>, Abdullaeva L.M.<sup>a</sup>, Kurbatova O.V.<sup>a</sup>,  
Tsvetkova V.S.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) play an important role in regulation of immune response. An increase in their number in adult patients with autoimmune diseases has been reported. G-MDSCs, M-MDSCs, and MDSCs(M-G<sup>-</sup>) at different stages of autoimmune disease may both activate T cell proliferation, leading to disease progression, or inhibit it, thus promoting Treg differentiation. Arginase-1 (Arg-1) is an enzyme in MDSCs that reduces the concentration of arginine required for T lymphocyte proliferation. Our aim was to evaluate the content of MDSCs populations and functional activity of MDSCs in children with autoimmune diseases. 75 children with inflammatory bowel diseases (IBD), 60 children with multiple sclerosis (MS), 69 children with psoriasis (PS), 62 healthy age-matched children were included into the study. The content of MDSCs ((CD3, CD19, CD56, HLA-DR)<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup> and CD33<sup>+</sup>), subpopulations of MDSCs (M-MDSCs, G-MDSCs expressing CD14 and CD15), assessment of Arg-1 activity were performed by flow cytometry techniques. The content of MDSCs in patients with IBD, MS and PS was significantly higher than in the comparison group and depended on the state of exacerbation/remission. In exacerbation and remission of IBD, MS and PS, a significant increase of MDSCs was revealed when compared with healthy children; the highest values were found in children in exacerbation of MS (Me-3.5 (2.5-5.6) % MNC against Me-1.6 (0.9-2.5) % MNC,  $p < 0.001$ ). In patients with MS, the content of G-MDSC, M-MDSC was significantly higher, and MDSC(M-G<sup>-</sup>) was lower than in healthy children. An increase in absolute amounts of G-MDSCs was shown in MS exacerbation compared to the disease remission state ( $p = 0.022$ ). For patients with IBD, a significant increase in percentage of MDSCs and M-MDSCs ( $p = 0.014$  and  $p = 0.045$ , respectively) was obtained in exacerbation of the disease relative to remission state. In patients with IBD, MS, and PS, a significant increase in Arg-1 activity in MDSCs was found, with a decreased number of MDSCs in patients in remission compared to exacerbation phase of the disease. In children with autoimmune diseases, an increase in the MDSC populations was found. The activity of arginase-1 in MDSCs is increased in remission, along with a decrease in their numbers.

*Keywords:* myeloid-derived suppressor cells, inflammatory bowel disease, multiple sclerosis, psoriasis, children

### Введение

Клетки-супрессоры миелоидного происхождения (MDSCs) происходят из гемопоэтических стволовых клеток в результате измененного миелопоэза в ответ на патогенные сигналы,

такие как TLR, DAMPs, PAMPs, вызывая активацию различных воспалительных цитокинов. [8]. При патологических состояниях MDSCs, в отличие от физиологически дифференцированных миелоидных клеток, имеют незрелый фенотип, слабую фагоцитарную активность и

обладают иммуносупрессивной функцией [11]. Охарактеризованы две основные популяции MDSCs с экспрессией маркеров LIN<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>: моноцитарные (M-MDSCs) с экспрессией CD14<sup>+</sup> и полиморфноядерные (или гранулоцитарные) (PMN-MDSCs или G-MDSCs) с экспрессией CD15<sup>+</sup> [3]. Кроме того, была идентифицирована новая субпопуляция MDSCs—фиброцитоидная MDSCs (F-MDSCs) с фенотипом CD11b<sup>low</sup> CD11c<sup>low</sup> CD33<sup>+</sup>IL-4ra<sup>+</sup> в пуповинной крови или периферической крови пациентов с метастатической детской саркомой [15]. Иммуносупрессорная функция MDSCs реализуется за счет прямого контакта с клетками, а также вследствие истощения запасов аминокислот, необходимых для метаболизма Т-лимфоцитов. Так, в результате повышенной секреции аргиназы (Arg-1), индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и индоламиндиоксидазы (IDO), ингибируется синтез ζ-цепи в TCR, что приводит к апоптозу Т-клеток [4]. Иммуносупрессивная активность MDSCs при раке и инфекционных заболеваниях неблагоприятна для прогноза заболевания [4]. Роль MDSCs при аутоиммунных заболеваниях противоречива. Имеются данные о роли MDSC в регуляции прогрессирования различных аутоиммунных заболеваний. У пациентов с рассеянным склерозом (РС) с рецидивирующе-ремиттирующим течением в обострении заболевания количество MDSC увеличивалось. У пациентов со вторично-прогрессирующим РС при обострении содержание MDSC в крови было снижено [5]. В экспериментальных работах показано, что MDSCs ускоряют анегрию и апоптоз инфильтрированных Т-клеток. Легкое течение РС у животных было связано с более высоким содержанием MDSCs на периферии и меньшими демиелинизирующими поражениями в центральной нервной системе [7]. Для взрослых пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) показано, что увеличение количества M-MDSCs клеток было связано с активностью заболевания [12]. В одной из экспериментальных работ адаптивный перенос MDSCs уменьшал воспаление и способствовал эффективному восстановлению слизистой оболочки толстой кишки за счет экспансии Treg, подавления секреции цитокинов, таких как IL-17A и TNFα. Элиминация MDSCs приводила к ухудшению симптомов колита [13]. С другой стороны, G-MDSCs из периферической крови пациентов с ВЗК не только не подавляли ответ аутологичных Т-клеток, но усиливали пролиферацию Т-клеток *in vitro* [14]. Также было продемонстрировано, что делеция Arg-1 в миелоидных клетках способствует прогрессированию колита у экспериментальных животных [6]. Выявлена роль MDSCs в поляризации Th17-клеток,

являющаяся Arg-1-зависимой. Продемонстрировано на моделях мышей и у пациентов с системной красной волчанкой и артритом, что Arg-1 и IL-1β, секретируемые MDSCs, управляют дифференцировкой Т-хелперов 17-го типа (Th17). Количество MDSCs положительно коррелировало с активностью Arg-1 в сыворотке крови, с содержанием Th17 клеток и тяжестью заболевания у пациентов с СКВ [10]. MDSC, выделенные от пациентов с псориазом (ПС), не способны подавлять активацию Т-клеток с одной стороны [9]. С другой стороны, в эксперименте показано, что истощение MDSCs с помощью гемцитабина значительно подавляло псориазическое воспаление и утолщение эпидермиса, а также накопление клеток Th17 и Treg. Воздействие на MDSCs предлагается в качестве новой стратегии терапии псориаза [2].

Таким образом, MDSCs обладают как провоспалительными, так и противовоспалительными функциями. Объяснение разных функций MDSCs может заключаться в том, что иммунное микроокружение влияет на развитие и функцию MDSCs, M-MDSC и G-MDSC. Популяции MDSCs, вероятно, имеют разные иммуносупрессивные функции на разных стадиях аутоиммунного заболевания и по-разному регулируют иммунный ответ [14].

**Цель** – оценить содержание MDSCs, их субпопуляций и активность аргиназы-1 в MDSCs у детей с аутоиммунными заболеваниями.

## Материалы и методы

Обследовано 75 детей с ВЗК в возрасте Me-14,7 (10,1-16,7) лет, 60 детей с рецидивирующе-ремиттирующим РС (PC) в возрасте Me-16,8 (15-17,6) лет, 69 детей с вульгарным псориазом в возрасте Me-12,6 (9,4-14,4) лет. По течению заболевания пациенты были поделены на группы «обострение» и «ремиссия» с использованием клинико-anamnestических данных, а также специальных индексов и методов. Пациенты с ВЗК были разделены на группы с использованием педиатрических индексов активности болезни PCDAI для БК (≤ 10 – ремиссия, > 10 – обострение) и PUCAI для ЯК (≤ 10 – ремиссия, > 10 – обострение). Для оценки состояния пациентов с псориазом применяли индекс распространенности и тяжести псориаза PASI (≤ 10 – ремиссия, > 10 – обострение). Состояние пациентов с РС оценивали по результатам МРТ: пациенты с контрастнегативными очагами демиелинизации (ремиссия); с контрастпозитивными очагами демиелинизации (обострение). Группу сравнения составили 62 здоровых ребенка в возрасте Me-12,2 (10,3-17,3) без отклонений в стандартном клиническом и биохимическом исследованиях, а также при от-

сутствии острых или обострения хронических состояний, травм, аутоиммунных, онкологических и психических заболеваний.

Обследование всех групп детей проводилось согласно этическим и нормативным документам Российской Федерации. Исследование получило одобрение локального этического комитета ФГАУ НМИЦ здоровья детей. Перед исследованием было получено информированное согласие родителей для всех обследованных детей в соответствии с Хельсинкской декларацией. Образцы венозной крови для исследования получали натощак путем забора из локтевой вены в пробирки BD Vacutainer® с антикоагулянтом K<sub>2</sub>ЭДТА.

Содержание основных и малых популяций лимфоцитов, MDSC, популяций MDSCs, оценку активности Arg-1 проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии (Novocyte, ACEA Biosciences, США). Использовали панель моноклональных антител, конъюгированных с различными флюорохромами (Beckman Coulter, Sony Biotechnology, США). Для выделения определенных популяций использовали тактику пошагового гейтирования: для выделения Treg и Thact выделяли «лимфоидный» регион по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния, выделяли CD4<sup>+</sup> лимфоциты, среди CD4<sup>+</sup> клеток выделяли Treg по маркерам (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>), Thact (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>high</sup>), Th17-лимфоцитах (CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>). Для оценки содержания MDSCs использовали следующую тактику гейтирования: выделяли «лимфоидно-моноцитарный» регион (МНК), далее выделяли популяцию клеток, не несущих на себе линейные лимфоцитарные маркеры CD3, CD19, CD56 и негативные по HLA-DR, из этой популяции выделяли двойную позитивную популяцию по маркерам CD11b и CD33; M-MDSCs и G-MDSCs разделяли по экспрессии CD14 и CD15 соответственно. Оценивали относительное количество (% от МНК) и абсолютное количество (кл/мкл) для популяций MDSCs. Количественную оценку активности аргиназы в MDSCs проводили в предварительно выделенных пермеабиллизированных МНК из периферической крови пациентов после добавления соответствующей панели для выделения MDSCs, а также антител к Arg-1: коктейль – (CD3, CD19, CD56, HLA-DR)- FITC, CD11b APC-Cy7 и CD33 PE-Cy7, Arg-1PE.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Описательная статистика количественных признаков представлена в формате: медиана (нижние и верхние квартили) – Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Достоверность различий между группами оценивали с помощью

непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

### Содержание MDSCs, G-MDSCs, M-MDSCs, MDSCs (M-G-) у пациентов с ВЗК, РС, ПС

Относительное количество MDSCs у пациентов исследованных патологий было достоверно выше, чем в группе сравнения и зависело от состояния обострение/ремиссия (табл. 1). У пациентов с РС относительное содержание популяций M-MDSCs (Me-15,2 (8,2-22,9) % MDSCs) и G-MDSCs (Me-40,9 (31,5-64,3)) было достоверно выше, а MDSC(M-G-) (Me-29,3 (20,4-48,6)) значимо ниже относительно группы сравнения. Для пациентов с ВЗК характерно повышение популяции MDSCs за счет моноцитарной составляющей Me-21,5 (11,8-45,1) %. При анализе содержания MDSCs, M-MDSCs, G-MDSCs и MDSCs(M-G-) между пациентами с разными патологиями выявлено, что дети с РС значимо отличались от пациентов с ВЗК и ПС по популяциям клеток-супрессоров миелоидного происхождения. У детей с РС в обострении выявлено наибольшее содержание общей популяции MDSCs за счет G-MDSCs, которая составляла 53,3% от всех MDSCs. Дети с ВЗК относительно ПС имели более высокое содержание M-MDSCs и более низкое содержание двойных незрелых клеток-супрессоров.

Анализ содержания популяций клеток-супрессоров миелоидного происхождения показал достоверное повышение % содержания MDSCs в группах детей в обострении и в ремиссии заболевания для исследованных патологий по сравнению со здоровыми детьми (табл. 1). Наибольшие значения MDSCs наблюдались у пациентов в обострении РС по сравнению со здоровыми детьми (Me-3,5 (2,5-5,6) % МНК против Me-1,6 (0,9-2,5),  $p = 0,000$ ). Кроме того, у пациентов с РС как в обострении, так и в ремиссии заболевания содержание G-MDSC, M-MDSC было достоверно выше, а MDSC(M-G-) достоверно ниже показателей здоровых детей. Работ по исследованию MDSCs у пациентов с РС сравнительно немного и они противоречивы. У взрослых пациентов сообщалось о снижении содержания в циркуляции MDSCs по сравнению со здоровыми донорами [1]. Кроме того, было показано, что увеличение содержания G-MDSC у пациентов с РС связано с активностью заболевания [1]. В нашем исследовании достоверные отличия между группами детей с РС в обострении и ремиссии были получены для абсолютного количества G-MDSC (Me-38,2 (24,9-67,5) кл/мкл против Me-22,1 (14,9-42,9) кл/мкл,  $p = 0,022$ ).

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ MDSCS У ПАЦИЕНТОВ С ВЗК, РС, ПС В СОСТОЯНИИ ОБОСТРЕНИЯ И РЕМИССИИ ОТНОСИТЕЛЬНО ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ**

TABLE 1. CONTENT OF POPULATIONS OF MDSCS IN PATIENTS WITH IBD, MS, PS IN THE STATE OF EXACERBATION AND REMISSION RELATED TO THE COMPARISON GROUP

Параметр Parameter	Группы пациентов Patient groups	ВЗК <sub>1</sub> IBD <sub>1</sub>	РС <sub>2</sub> MS <sub>2</sub>	ПС <sub>3</sub> PS <sub>3</sub>	Группа сравнения Comparison group
MDSCs, %	Обострение Exacerbation	3,17* (2,34-4,70)	3,5* (2,5-5,6)	3,2* (1,9-3,9)	1,6 (0,9-2,5)
	Ремиссия Remission	2,3* (1,6-3,2) p <sub>1</sub> = 0,014	2,7* (2,1-4,5) p <sub>2</sub> = 0,088	2,5* (1,5-3,4) p <sub>3</sub> = 0,197	
M-MDSCs, кл/мкл M-MDSCs, cells/ $\mu$ L	Обострение Exacerbation	104* (54-166)	80* (68-115)	87* (52-123)	44 (25,4-53,9)
	Ремиссия Remission	73* (57-109) p <sub>1</sub> = 0,077	64* (41-79) p <sub>2</sub> = 0,018	76* (47-94) p <sub>3</sub> = 0,228	
M-MDSCs, %	Обострение Exacerbation	29* (13,0-65,1)	16,3 (8,8-22,9)	16,6 (3,2-29,5)	9,8 (5,6-16,7)
	Ремиссия Remission	17,1* (5,1-38,5) p <sub>1</sub> = 0,045	14,1 (6,8-27,8) p <sub>2</sub> = 0,467	10,6 (4,8-20,3) p <sub>3</sub> = 0,262	
M-MDSCs, кл/мкл M-MDSCs, cells/ $\mu$ L	Обострение Exacerbation	27* (9-76)	10* (6-17)	11* (3-30)	3,2 (1,3-7,5)
	Ремиссия Remission	10* (4-28) p <sub>1</sub> = 0,024	8* (4-16) p <sub>2</sub> = 0,082	7* (2-20) p <sub>3</sub> = 0,197	
G-MDSCs, %	Обострение Exacerbation	13,1 (5,1-38,7)	53,3* (35,5-64,7)	28,9 (17,6-40,5)	20,2 (12,3-41,3)
	Ремиссия Remission	22,7 (4,5-32,9) p <sub>1</sub> = 0,574	38,1* (30,2-55,9) p <sub>2</sub> = 0,096	20,9 (11,1-33,0) p <sub>3</sub> = 0,146	
G-MDSCs, кл/мкл G-MDSCs, cells/ $\mu$ L	Обострение Exacerbation	13* (5-41)	38* (25-68)	29* (15-40)	8,5 (4,2-15,9)
	Ремиссия Remission	13 (4-26) p <sub>1</sub> = 0,712	22* (15-43) p <sub>2</sub> = 0,022	13* (5-27) p <sub>3</sub> = 0,055	
MDSCs (M·G), %	Обострение Exacerbation	33,5* (18,7-51,7)	28* (20,2-43,8)	51,2* (36,3-62,3)	66,3 (46,5-77,2)
	Ремиссия Remission	54,3 (26,5-67,9) p <sub>1</sub> = 0,037	40,3* (20,6-58,5) p <sub>2</sub> = 0,230	64,6 (44,6-76,3) p <sub>3</sub> = 0,059	
MDSCs (M·G), кл/мкл MDSCs (M·G), cells/ $\mu$ L	Обострение Exacerbation	37 (19-56)	20 (12-34)	32* (23-53)	27,4 (12,3-35,0)
	Ремиссия Remission	37* (19-53) p <sub>1</sub> = 0,95	19 (13-29) p <sub>2</sub> = 0,843	38* (25-53) p <sub>3</sub> = 0,645	

Примечание. p<sub>1</sub> – достоверность различий между состоянием обострения и ремиссией у пациентов с ВЗК, p<sub>2</sub> – достоверность различий между состоянием обострения и ремиссией у пациентов с РС, p<sub>3</sub> – достоверность различий между состоянием обострения и ремиссией у пациентов с ПС, \* – достоверность различий между состоянием обострения и ремиссией у пациентов по сравнению со здоровыми детьми.

Note. p<sub>1</sub>, significance of differences between the state of exacerbation and remission in patients with IBD; p<sub>2</sub>, significance of differences between the state of exacerbation and remission in patients with MS; p<sub>3</sub>, significance of differences between the state of exacerbation and remission in patients with PS; \*, significance of differences between the state exacerbations and remissions in patients compared with healthy children.

У пациентов с ВЗК значимое увеличение относительного содержания MDSCs (Me-3,17 (2,34-4,7) % МНК против Me-2,3 (1,6-3,2),  $p = 0,014$ ) и увеличение доли популяции M-MDSC (Me-29 (13-65,1) % MDSCs против Me-17,1 (5,1-38,5),  $p = 0,045$ ) между группами пациентов в обострении и ремиссии были выявлены. Наши данные согласуются с данными, полученными у взрослых пациентов о прямой зависимости между увеличением количества M-MDSCs и активностью заболевания [12]. Кроме того, в нашем исследовании получено, что содержание MDSC(M<sup>+</sup>G<sup>-</sup>) у пациентов с ВЗК было достоверно выше в состоянии ремиссии по сравнению с группой детей в обострении (Me-33,5 (18,7-51,7) % MDSCs против Me-54,3 (26,5-67,9),  $p = 0,037$ ).

В исследовании зарубежных авторов также было показано увеличение как MDSCs, так и G-MDSCs у взрослых пациентов с РС в обострении заболевания [7]. Мы также показали, что у детей с РС в обострении по сравнению с группой детей в ремиссии были достоверно выше % содержание M-MDSCs и G-MDSCs. Как уже упоминалось, MDSCs в зависимости от микроокружения могут выполнять как провоспалительные, так и противовоспалительные функции. Иммунное микроокружение может влиять на развитие и функцию G-MDSCs, M-MDSCs и MDSCs(M<sup>+</sup>G<sup>-</sup>), которые выполняют разные функции на раз-

ных стадиях аутоиммунного заболевания и по-разному регулируют иммунный ответ [14].

#### Активность Arg-1 в MDSCs у пациентов с ВЗК РС, ПС

Для определения функциональной состоятельности популяций MDSCs были проанализированы результаты активности внутриклеточного фермента аргиназы-1. Выявлено достоверное увеличение активности Arg-1 у пациентов с ВЗК (Me-1676 (1284,5-2540) MFI) и ПС (Me-1603 (1020,5-3030) MFI) по сравнению с группой здоровых детей (Me-980,5 (897-1113,8) MFI),  $p = 0,000$ . Активность Arg-1 между группами пациентов с ВЗК и ПС не отличалась, но была значимо выше, чем в группе детей с РС (Me-1096 (642-2534)) ( $p < 0,05$ ).

Анализ активности Arg-1 в MDSCs в зависимости от состояний обострение/ремиссии выявил достоверное увеличение ферментативной активности при снижении % содержания MDSCs у пациентов в ремиссии относительно обострения заболевания для исследованных патологий (рис. 1А, Б).

Наибольшая активность Arg-1 относительно группы сравнения отмечена у пациентов с ПС (Me-2968 (1397,5-3311,5) MFI против Me-980,5 (897-1113,8) MFI,  $p = 0,000$ ). Между группами пациентов в обострении при исследованных патологиях наблюдались достоверные отличия (рис. 1Б). У пациентов в ремиссии наблюдалось

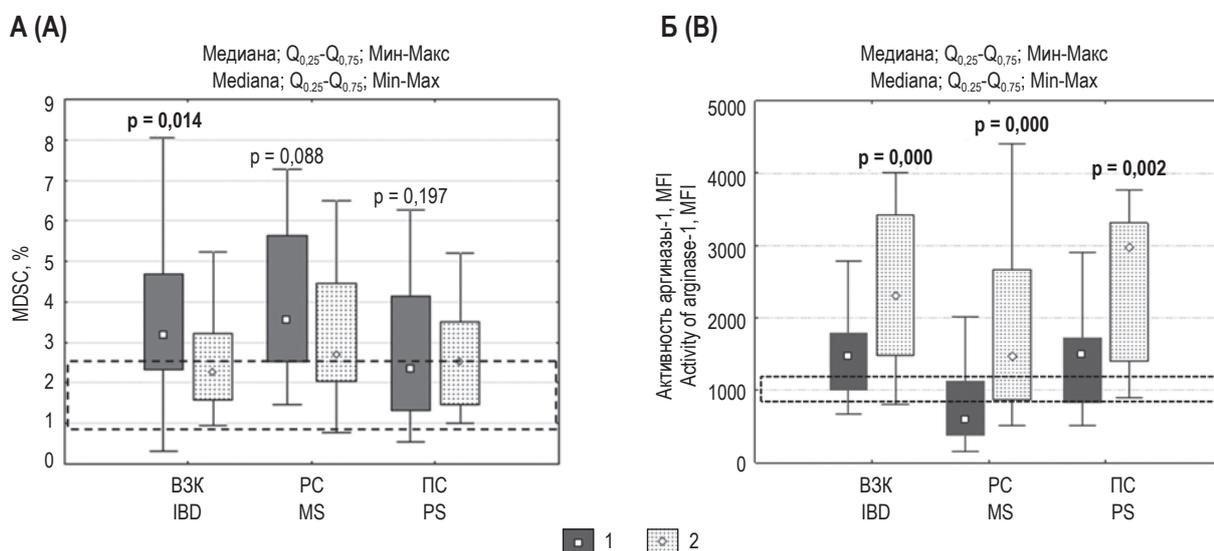


Рисунок 1. Относительное содержание MDSCs (А) и активность Arg-1 (Б) у пациентов с ВЗК, РС, ПС при обострении (1) и ремиссии (2)

Примечание. p – достоверность различий между группами обострение и ремиссия. Штрих-линией показан диапазон содержания MDSCs и Arg-1 у здоровых детей.

Figure 1. Relative content of MDSCs (A) and Arg-1 activity (B) in patients with IBD, MS, PS during exacerbation (1) and remission (2)

Note. p is the significance of differences between exacerbation and remission groups. The dashed line shows the range of MDSCs and Arg-1 content in healthy children.

значимое отличие ( $p < 0,01$ ) активности аргиназы: активность фермента у пациентов с ВЗК и РС была выше, чем у пациентов с РС. Полученные нами данные согласуются с экспериментальными исследованиями, в которых пониженное содержание Arg-1 усугубляло проявления колита у мышей [6]. Наименьшая активность Arg-1 наблюдалась у пациентов в обострении с РС (Ме-600 (381,9-1125) MFI) и была достоверно ниже по сравнению с группами пациентов в обострении с ВЗК (Ме-1467 (1002-1785) MFI), РС (Ме-1490 (830-1723) MFI) и группой здоровых детей ( $p < 0,01$ ). Таким образом, активность Arg-1 была значимо увеличена в состоянии ремиссии относительно обострения заболевания при ВЗК, РС и РС. Интересно отметить, что у пациентов с РС в обострении заболевания содержание общей популяции MDSCs было наибольшим, а активность Arg-1 – минимальная. Вероятно, увеличение количества MDSCs при данной патологии компен-

сирует недостаточную функциональность этих клеток.

## Заключение

Количество общей популяции MDSCs у детей с ВЗК, РС и РС было значимо выше относительно группы сравнения как в обострении, так и в ремиссии заболевания. Для разных патологических состояний характерно перераспределение относительного количества популяций MDSCs, которое ассоциировано с активностью заболевания. Для детей с ВЗК характерно повышение моноцитарной популяции MDSCs, а для детей с РС – гранулоцитарной популяции MDSCs. Содержание общей популяции MDSCs у детей с ВЗК в обострении заболевания значимо выше, чем в ремиссии. Иммуносупрессорная активность MDSCs (активность аргиназы-1) увеличена в состоянии ремиссии заболевания при ВЗК, РС и РС.

## Список литературы / References

1. Calahorra L., Camacho-Toledano C., Serrano-Regal M.P., Ortega M.C., Clemente D. Regulatory cells in multiple sclerosis: from blood to brain. *Biomedicines*, 2022, Vol. 10, no. 2, 335. doi: 10.3390/biomedicines10020335.
2. Chen C., Tan L., Zhu W., Lei L., Kuang Y., Liu P., Li J., Chen X., Peng C. Targeting myeloid-derived suppressor cells is a novel strategy for anti-psoriasis therapy. *Mediators Inflamm.*, 2020, Vol. 2020, 8567320. doi: 10.1155/2020/8567320.
3. Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, no. 9, pp. 162-174.
4. Goedegebuure P., Mitchem J. Myeloid-derived suppressor cells: general characteristics and relevance to clinical management of pancreatic cancer. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2011, no. 11, pp. 734-751.
5. Iacobaeus E., Douagi I., Jitschin R., Marcusson-Ståhl M., André A.T., Gavin C., Lefsihane K., Davies L.C., Mouggiakakos D., Kadri N., Le Blanc K. Phenotypic and functional alterations of myeloid-derived suppressor cells during the disease course of multiple sclerosis. *Immunol. Cell Biol.*, 2018, no. 96, pp. 820-830.
6. Ma Z., Zhen Y., Hu C., Yi H. Myeloid-derived suppressor cell-derived arginase-1 oppositely modulates IL-17A and IL-17F through the ESR/STAT3 pathway during colitis in mice. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 687. doi: 10.3389/fimmu.2020.00687.
7. Melero-Jerez C., Fernández-Gómez B., Lebrón-Galán R., Ortega M.C., Sánchez-de Lara I., Ojalvo A.C., Clemente D., de Castro F. Myeloid-derived suppressor cells support remyelination in a murine model of multiple sclerosis by promoting oligodendrocyte precursor cell survival, proliferation, and differentiation. *Glia*, 2021, Vol. 69, no. 4, pp. 905-924.
8. Millrud C.R., Bergenfelz C., Leandersson K. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, pp. 3649-3665.
9. Oka T., Sugaya M., Takahashi N. CXCL17 attenuates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation by recruiting myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, no. 10, pp. 3897-3908.
10. Wu H., Zhen Y., Ma Z., Li H., Yu J., Xu Z.G., Wang X.Y., Yi H., Yanget Y.G. Arginase-1-dependent promotion of TH17 differentiation and disease progression by MDSCs in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2016, Vol. 8, 331ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.aae0482.
11. Xu D., Li C., Xu Y., Huang M., Cui D., Xie J. Myeloid-derived suppressor cell: a crucial player in autoimmune diseases. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1021612. doi: 10.3389/fimmu.2022.1021612.
12. Xi Q., Li Y., Dai J., Chen W. High frequency of mononuclear myeloid-derived suppressor cells is associated with exacerbation of inflammatory bowel disease. *Immunol. Invest.*, 2015, no. 44, pp. 279-287.
13. Zhang R., Ito S., Nishio N., Cheng Z., Suzuki H., Isobe K.I. Dextran sulphate sodium increases splenic Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells which accelerate recovery from colitis following intravenous transplantation. *Clin. Exp. Immunol.*, 2011, Vol. 164, no. 3, pp. 417-427.
14. Zhao F., Gong W., Song J., Shen Z., Cui D. The paradoxical role of MDSCs in inflammatory bowel diseases: From bench to bedside. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1021634. doi: 10.3389/fimmu.2022.1021634
15. Zoso A., Mazza E., Bicciato S., Mandruzzato S., Bronte V., Serafini P., Inverardi L. Human fibrocytic myeloid-derived suppressor cells express IDO and promote tolerance via treg-cell expansion. *Eur. J. Immunol.*, 2014, no. 44, pp. 3307-3319.

**Авторы:**

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

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

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

**Потапов А.С.** — д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории научных основ детской гастроэнтерологии и гепатологии, начальник центра воспалительных заболеваний кишечника, заведующий гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой заведующий гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Мурашкин Н.Н.** — д.м.н., профессор, руководитель НИИ детской дерматологии, заведующий отделением дерматологии с группой лазерной хирургии и заведующий лабораторией патологии кожи у детей отдела научных исследований в педиатрии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Абдуллаева Л.М.** — младший научный сотрудник лаборатории редких наследственных болезней у детей Медико-генетического центра, врач-невролог отделения психоневрологии и психосоматической патологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

**Цветкова В.С.** — к.м.н., научный сотрудник, врач-гастроэнтеролог гастроэнтерологического отделения ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

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

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

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

**Potapov A.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Scientific Foundations of Pediatric Gastroenterology and Hepatology, Head of the Center for Inflammatory Bowel Diseases in Children, Head of Gastroenterology Department with Hepatology Group, National Medical Research Center for Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

**Murashkin N.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Research Institute of Pediatric Dermatology, Dermatology Department with Laser Surgery Unit and Children's Skin Pathology Laboratory, National Medical Research Center for Children's Health; Professor, Department of Dermatovenereology and Cosmetology, Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

**Abdullaeva L.M.**, Junior Research Associate, Laboratory of Rare Hereditary Diseases in Children at the Medical Genetic Center; Neurologist, Department of Psychoneurology and Psychosomatic Pathology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

**Kurbatova O.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Head, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

**Tsvetkova V.S.**, PhD (Medicine), Research Associate, Gastroenterologist, Gastroenterology Department with Hepatology Group, National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

# ОСОБЕННОСТИ Т-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ, БОЛЕВШИХ И НЕ БОЛЕВШИХ COVID-19, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ

Сафронова Э.А., Рябова Л.В.

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

**Резюме.** Обследовано 65 мужчин с нестабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда (острым коронарным синдромом – ОКС) от 40 до 65 лет, которые ранее болели COVID-19 и 20 лиц с ОКС, не перенесших COVID-19. У всех лиц также была гипертоническая болезнь, и им потребовалось стентирование коронарных артерий в ближайшие 3 суток после поступления в стационар. Из иммунологических показателей методом проточной цитометрии на цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter, США) по стандартизованной технологии оценки лимфоцитарного звена иммунитета [1] определялись: CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> (Т-лимфоциты общие), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Т-хелперы), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (цитотоксические Т-лимфоциты), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> (В-лимфоциты), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (Т-NK-клетки), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (натуральные киллеры), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (Т-регуляторные клетки), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Т-лимфоциты – ранняя активация), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>HLA-DR (Т-лимфоциты – поздняя активация). Все пациенты были поделены на группы в зависимости от содержания НК-клеток (натуральных киллеров). Больные, перенесшие COVID-19, имеют 3 фенотипа нарушений (пониженное количество НК-клеток нормальное и повышенное), а не перенесшие – 2 фенотипа (пониженное количество НК-клеток и нормальное). Наиболее тяжелое состояние и степень выраженности иммунных нарушений были выявлены у пациентов, перенесших COVID-19. У лиц с острым коронарным синдромом и COVID-19 преимущественно с нормальным и повышенным уровнем НК-клеток в сопоставлении с пациентами ОКС без COVID-19, наблюдалось более тяжелое течение заболевания – превалировали больные с острым инфарктом миокарда, у них выявлен более высокий уровень смертности, увеличена продолжительность лечения, а также чаще отмечались тромбозы стентов. У лиц с ОКС и COVID-19 с повышенными НК-клетками наблюдалось максимальное снижение Т-клеточного звена иммунитета: Т-лимфоцитов общих, Т-лимфоцитов-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов, Т-лимфоцитов ранней активации, Т-регуляторных клеток в абсолютных числах по сравнению с другими группами. Наимень-

## Адрес для переписки:

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

## Address for correspondence:

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

## Образец цитирования:

Э.А. Сафронова, Л.В. Рябова «Особенности  
Т-клеточного звена иммунитета у больных с острым  
коронарным синдромом, болевших и не болевших  
COVID-19, в зависимости от содержания натуральных  
киллеров» // Российский иммунологический журнал,  
2023. Т. 26, № 3. С. 389-396.  
doi: 10.46235/1028-7221-9640-FOT

© Сафронова Э.А., Рябова Л.В., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

E.A. Safronova, L.V. Ryabova “Features of T cell immunity  
depending on the content of natural killer cells in patients with  
acute coronary syndrome following COVID-19”, Russian  
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 389-396.  
doi: 10.46235/1028-7221-9640-FOT

© Safronova E.A., Ryabova L.V., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-9640-FOT

ший иммунорегуляторный индекс и при этом максимальное число Т-НК-лимфоцитов отмечались у лиц, перенесших COVID-19 и имевших пониженные НК-клетки. Минимальное количество Т-НК-лимфоцитов регистрировалось у больных с низкими НК-клетками, не болевших COVID-19. Минимальные Т-лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) поздней активации выявлены у лиц, переболевших COVID-19, с повышенными и нормальными НК-клетками. Наименьшее число Т-регуляторных клеток поздней активации отмечалось у пациентов, не болевших COVID-19, но вакцинированных, и имеющих нормальное содержание НК-клеток. Проведенное исследование также позволяет более четко определить группы пациентов с ОКС, нуждающихся в дополнительной иммунокоррекции.

*Ключевые слова:* острый коронарный синдром, проточная цитометрия, лимфоциты, НК-клетки, стентирование коронарных артерий, коронароангиография

## FEATURES OF T CELL IMMUNITY DEPENDING ON THE CONTENT OF NATURAL KILLER CELLS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME FOLLOWING COVID-19

Safronova E.A., Ryabova L.V.

*South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation*

**Abstract.** We examined 65 men (40 to 65 years old) with unstable angina and acute myocardial infarction (acute coronary syndrome, ACS) who previously had COVID-19, and 20 persons with ACS who did not suffer COVID-19. All patients also had arterial hypertension, and they required coronary artery stenting within the next 3 days after admission to the hospital. The following immunological parameters were determined by flow cytometry by means of Navios cytofluorimeter (BeckmanCoulter, USA), using standard technology for the profiling of lymphocyte populations: ), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (cytotoxic T cells), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> (B cells), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (T-NK cells), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (NK, natural killer cells), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (T regulatory cells, Tregs), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (T cells, early activation), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>HLA-DR (T cells, late activation). All patients were divided into groups depending on the contents of NK cells. The patients who had a history of COVID-19 exhibited 3 phenotypes of disorders (decreased, normal, or increased NK cell counts), whereas persons without COVID in their history displayed 2 phenotypes (decreased or normal NK cell counts). The most severe condition and higher grade of immune disorders were found in patients who underwent COVID-19. In patients with ACS and previous COVID-19, mostly with normal and elevated levels of NK cells, a more severe course of the disease was observed if compared with ACS patients without COVID-19 in their history, i.e., the patients with acute myocardial infarction prevailed, with higher mortality rate, longer duration of treatment, and more common incidence of stent thrombosis. In the persons with ACS and COVID-19 with elevated NK cells, a maximal decrease of T cell immunity was observed, i.e., lower contents of total T lymphocytes, T-helper cells, cytotoxic T cells, T cells of early activation, Tregs, with a decrease in absolute cell numbers as compared to other groups. The lowest immunoregulatory index and, at the same time, the maximal number of T-NK lymphocytes were observed in the persons who suffered from COVID-19 and had reduced NK cell contents. The minimal number of NK T cells was registered in patients with low NK cells who did not have a history of COVID-19. Minimal numbers of late-activation T cells (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) were found in persons who recovered from COVID-19 with elevated and normal NK cells. The lowest number of late-activation regulatory T cells was observed in the patients who did not suffer COVID-19 but were vaccinated, and had a normal content of NK cells. The study also allows us to more clearly define the groups of patients with ACS who need supplementary immunocorrection.

*Keywords:* acute coronary syndrome, flow cytometry, lymphocytes, NK cells, coronary artery stenting, coronary angiography

### Введение

Воспаление в миокарде при COVID-19 может привести к миокардиту, острому коронарному синдрому (ОКС), быстрому ухудшению состоя-

ния и внезапной смерти [7]. Прямое повреждение миокарда и цитокиновый шторм, приводящий к дестабилизации ранее существовавших и ускоренному образованию новых бляшек, явля-

ются механизмами, провоцирующими ОКС при COVID-19 [10].

В работе Хусаиновой Л.Н. и соавт. [4] показано, что у пациентов с ОКС снижено число Т-лимфоцитов, увеличено количество лимфоцитов, влияющих на апоптоз. По данным Лебедевой О.К. и соавт. [2] развитие острой сердечной недостаточности у пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) ассоциировано со снижением числа Т- и НК-клеток (натуральных киллеров).

В доступной литературе недостаточно данных о Т- и НК-клеточном иммунитете у пациентов с ОКС, перенесших COVID-19, что определяет актуальность проводимого исследования.

**Целью исследования** явилось исследование Т-клеточного звена иммунитета в зависимости от числа натуральных киллеров у больных с острым коронарным синдромом, перенесших COVID-19 в сопоставлении с данными параметрами у больных без перенесенного COVID-19.

Задачи исследования:

1. Выявить клинические отличия в течении заболевания у пациентов с ОКС, перенесших COVID-19 и не болевших им в зависимости от числа НК-клеток.

2. Определить показатели Т-клеточного иммунного статуса у больных с ОКС, имевших в анамнезе COVID-19 и не болевших новой коронавирусной инфекцией, в зависимости от показателей НК-клеточного иммунитета.

3. Выявить различия в содержании основных популяций Т-лимфоцитов в вышеуказанных категориях пациентов.

## Материалы и методы

Обследовано 65 мужчин с нестабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда (острым коронарным синдромом) от 40 до 65 лет, которые ранее болели COVID-19 и 20 лиц с ОКС, не перенесших COVID-19. У всех лиц также была гипертоническая болезнь, и им потребовалось стентирование коронарных артерий в ближайшие 3 суток после поступления в стационар. Коронароангиографию проводили на аппарате Innova JE, имплантировались стенты с лекарственным покрытием фирмы Xience Alpine. Все больные подписывали информированное согласие (протокол Этического комитета ЮУГМУ Минздрава России № 9 от 11.09.2006 и протокол этического комитета ГАУЗ ОТКЗ ГКБ № 1 г. Челябинска № 12 от 10.10.2022).

Из иммунологических показателей методом проточной цитометрии на цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter, США) по стандартизованной технологии оценки лимфоцитарного звена иммунитета [1] определялись: CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> (Т-лимфоциты общие), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>

(Т-хелперы), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (цитотоксические Т-лимфоциты), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> (В-лимфоциты), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (ТНК-клетки), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (натуральные киллеры), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> (Т-регуляторные клетки), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Т-лимфоциты – ранняя активация), CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>HLA-DR (Т-лимфоциты – поздняя активация).

С помощью программы StatPlus 2009 Professional проводилась статистическая обработка материала. Высчитывали: среднюю арифметическую (M), ошибку средней арифметической (m), определяли критерий Стьюдента для независимых выборок.

## Результаты и обсуждение

Все пациенты (отдельно перенесшие COVID-19 и не болевшие им, но вакцинированные от новой коронавирусной инфекции) были разбиты на 3 группы в зависимости от числа НК-клеток: со сниженными показателями НК-клеток, нормальными и повышенными [1]. Общая клиническая характеристика этих лиц проиллюстрирована в таблице 1.

Согласно таблице 1, у больных ОКС без COVID-19, преобладали больные с нестабильной стенокардией, а в группе перенесших COVID-19 преобладали пациенты с ОИМ, в основном с ОИМ с pST – в группе с нормальными НК-клетками. По количеству установленных стентов лидировали пациенты с нормальным и повышенным количеством НК-клеток, переболевшие COVID-19. Тромбозы стентов регистрировались у переболевших COVID-19: 3 (9,68%) лиц, имевших нормальные НК-клетки, и 1 (6,67%) с пониженными НК-клетками. В этих же группах больных чаще отмечались летальные исходы: 2 (10,53%) с повышенными НК-клетками, 3 (9,67%) с нормальными НК-клетками и 1 (6,67%) с пониженными НК-клетками. Ни одного смертельного исхода не было у лиц, не имевших в анамнезе новую коронавирусную инфекцию. Для купирования загрудинных болей использовали морфин на этапе скорой медицинской помощи более, чем у 30% пациентов с ОКС, имевших COVID-19 в анамнезе, а у лиц с ОКС без COVID-19 с нормальными НК-клетками – только у 10%. Наблюдалось статистически значимое отличие IgM и IgG у лиц с COVID-19 в сопоставлении с больными ОКС без такового, но вакцинированных. Максимальные цифры IgM наблюдались у лиц, болевших COVID-19, с повышенными НК-клетками.

Длительность нахождения в стационаре выше у лиц с COVID-19 и ОКС ( $p < 0,05$ ). Кроме того, у них наблюдались более высокие цифры тропони-

**ТАБЛИЦА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 И НЕ БОЛЕВШИХ ИМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ НК-КЛЕТОК**

TABLE 1. GENERAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME WHO HAD COVID-19 AND DID NOT HAVE IT, DEPENDING ON THE CONTENT OF NK CELLS

Показатель Index	Болевшие COVID-19 Sick with COVID-19			Не болевшие COVID-19 Not sick with COVID-19	
	1 НК-клетки понижены NK cells are reduced (n = 15) M±m, p	2 НК-клетки нормальные NK cells are normal (n = 31) M±m, p	3 НК-клетки повышены NK cells are raised (n = 19) M±m, p	4 НК-клетки понижены NK cells are reduced (n = 9) M±m, p	5 НК-клетки нормальные NK cells are normal (n = 11) M±m
Возраст, годы Age, years	57,33±1,59	56,19±1,13	56,63±1,60	54,78±2,53	54,06±2,06
Нестабильная стенокардия, абсолютное число больных, % Unstable angina, absolute number of patients, %	6 (40%)	14 (45,16%)	7 (36,84%)	5 (55,56%)	9 (81,82%)
ОИМ с пST, абсолютное число больных и % STEMI, absolute number of patients and %	5 (33,33%)	12 (38,71%)	6 (31,58%)	3 (33,33%)	1 (9,09%)
ОИМ бпST, абсолютное число больных, % NSTEMI, absolute number of patients, %	4 (26,67%)	5 (16,13%)	6 (31,58%)	1 (11,11%)	1 (9,09%)
ОИМ в прошлом, 3 (33,33%) абсолютное число больных, % AMI in the past, absolute number of patients, %	3 (21,43%)	7 (22,58%)	6 (31,58%)	3 (33,33%)	1 (9,09%)
Риск по Грейс, баллы Grace risk, points	112,55±12,43	119,58±9,77	122,75±7,74 p <sub>3-5</sub> = 0,049	113,67±11,90	101,70±9,74
Продолжительность госпитализации, сутки Duration of hospitalization, days	10,93±0,89 p <sub>1-5</sub> = 0,023	9,77±0,43 p <sub>2-5</sub> = 0,003	10,16±0,61	9,44±0,89	8,54±0,49
Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, mmol/L	2,29±0,27 p <sub>1-4</sub> = 0,049	1,84±0,27	1,80±0,27	1,58±0,26	1,57±0,22
Тропонин I, нг/мл Troponin I, ng/mL	8,99±2,82 p <sub>1-5</sub> = 0,028	9,23±1,96 p <sub>2-5</sub> = 0,019	9,97±2,68	6,22±3,44	1,85±1,60
IgM к COVID-19, коэффициент позитивности IgM to COVID-19, positivity coefficient	8,21±1,71 p <sub>1-4</sub> = 0,003	7,82±1,30 p <sub>2,3</sub> = 0,033 p <sub>2-4</sub> = 0,005 p <sub>2-5</sub> = 0,010	11,90±1,79 p <sub>3,4</sub> = 0,0002 p <sub>3-5</sub> = 0,0003	1,21±0,44	2,46±0,72
IgG к COVID-19, коэффициент позитивности (кп) IgG to COVID-19, positivity coefficient (pc)	20,89±1,30 p <sub>1-4</sub> = 0,001	18,12±1,47 p <sub>2-4</sub> = 0,052	20,88±1,44 p <sub>3,4</sub> = 0,0002 p <sub>3-5</sub> = 0,0011	9,95±2,55	13,43±3,26

Примечание. ОИМ – острый инфаркт миокарда, ОИМ с пST – острый инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST, ОИМ бпST – острый инфаркт миокарда без подъема сегмента ST.

Note. AMI, acute myocardial infarction; STEMI, acute myocardial infarction with ST segment elevation; NSTEMI, acute myocardial infarction without ST segment elevation.

**ТАБЛИЦА 2. СРАВНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ЛИЦ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ, БОЛЕВШИХ И НЕ БОЛЕВШИХ COVID-19 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЧИСЛА НК-КЛЕТОК**

TABLE 2. COMPARISON OF INDICATORS OF T CELL IMMUNITY IN PERSONS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME, SICK AND NOT SICK WITH COVID-19, DEPENDING ON THE NUMBER OF NK CELLS

Показатель Index  НК-клетки NK cells	Болевшие COVID-19 Sick with COVID-19			Не болевшие COVID-19 Not sick with COVID-19	
	1 НК-клетки понижены NK cells are reduced (n = 15) M±m, p	2 НК-клетки нормальные NK cells are normal (n = 31) M±m, p	3 НК-клетки повышены NK cells are raised (n = 19) M±m, p	4 НК-клетки понижены NK cells are reduced (n = 9) M±m, p	5 НК-клетки нормальные NK cells are normal (n = 11) M±m
<b>Т-лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), %</b> T lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> ), %	66,81±2,11 p <sub>1,2</sub> = 0,006 p <sub>1,3</sub> = 0,008 p <sub>1,4</sub> = 0,040 p <sub>1,5</sub> = 0,026	73,29±1,43	74,97±2,42	73,24±2,52	73,82±2,52
<b>Т-лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), 10<sup>6</sup> кл/л</b> T lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> ), 10 <sup>6</sup> cells/L	1866,21±157,84 p <sub>1,3</sub> = 0,001 p <sub>1,4</sub> = 0,01	1637,97±129,72 p <sub>2,4</sub> = 0,049	945,47±117,68 p <sub>3,5</sub> = 0,001	1215,44±179,24 p <sub>4,5</sub> = 0,004	1931,00±163,76
<b>Т-хелперы (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), %</b> T helpers (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ), %	40,22±2,13 p <sub>1,2</sub> = 0,0019 p <sub>1,3</sub> = 0,001 p <sub>1,4</sub> = 0,006 p <sub>1,5</sub> = 0,003	48,79±1,76	50,83±2,31	50,09±2,78	50,26±2,13
<b>Т-хелперы (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), 10<sup>6</sup> кл/л</b> T helpers (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ), 10 <sup>6</sup> cells/L	1116,05±102,77 p <sub>1,3</sub> = 0,001 p <sub>1,4</sub> = 0,049	1067,29±87,66 p <sub>2,3</sub> = 0,0014 p <sub>2,5</sub> = 0,049	631,27±80,25 p <sub>3,5</sub> = 0,001	838,56±127,59 p <sub>4,5</sub> = 0,007	1324,20±125,73
<b>Т-цитотоксические (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), 10<sup>6</sup> кл/л</b> T cytotoxic (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ), 10 <sup>6</sup> cells/L	674,95±76,27 p <sub>1,2</sub> = 0,020 p <sub>1,3</sub> = 0,001 p <sub>1,4</sub> = 0,005	504,77±42,93	334,87±65,85	347,44±60,84	549,20±48,07
<b>Иммунорегуляторный индекс (Тх/Тс)</b> Immunoregulatory index (Тх/Тс)	1,95±0,26 p <sub>1,3</sub> = 0,049	2,42±0,23	2,75±0,43	2,66±0,43	2,60±0,39
<b>Т-НК-лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), %</b> T-NK lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ), %	8,42±1,29 p <sub>1,4</sub> = 0,019	6,77±0,93	6,00±1,16	4,00±1,01 p <sub>4,5</sub> = 0,092	6,30±1,29
<b>Т-НК-лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), 10<sup>6</sup> кл/л</b> T-NK lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ), 10 <sup>6</sup> cells/L	242,24±56,86 p <sub>1,2</sub> = 0,044 p <sub>1,3</sub> = 0,009 p <sub>1,4</sub> = 0,021	145,13±26,48 p <sub>2,3</sub> = 0,049 p <sub>2,4</sub> = 0,049	78,00±17,92 p <sub>3,5</sub> = 0,018	62,22±16,11 p <sub>4,5</sub> = 0,017	164,400±39,708
<b>Т-лимфоциты CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (ранняя активация), %</b> T lymphocytes CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (early activation), %	7,84±0,84	8,37±0,52	7,89±0,53	8,84±0,66 p <sub>4,5</sub> = 0,016	6,85±0,55

Таблица 2 (окончание)  
Table 2 (continued)

Показатель Index  NK-клетки NK cells	Болевшие COVID-19 Sick with COVID-19			Не болевшие COVID-19 Not sick with COVID-19	
	1 NK-клетки понижены NK cells are reduced (n = 15) M±m, p	2 NK-клетки нормальные NK cells are normal (n = 31) M±m, p	3 NK-клетки повышены NK cells are raised (n = 19) M±m, p	4 NK-клетки понижены NK cells are reduced (n = 9) M±m, p	5 NK-клетки нормальные NK cells are normal (n = 11) M±m
<b>Т-лимфоциты CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (ранняя активация), 10<sup>6</sup> кл/л T lymphocytes CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (early activation), 10<sup>6</sup> cells/L</b>	79,05±11,81 p <sub>1-3</sub> = 0,033	86,35±8,41 p <sub>2,3</sub> = 0,0051	50,93±7,37 p <sub>3,4</sub> = 0,049 p <sub>3-5</sub> = 0,002	73,56±12,02	90,60±11,04
<b>Т-лимфоциты CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA DR<sup>+</sup> (поздняя активация), % T lymphocytes CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (late activation), %</b>	6,39±0,95	5,78±0,45 p <sub>2,4</sub> = 0,015	6,33±0,63 p <sub>3,4</sub> = 0,07	8,11±1,13 p <sub>4,5</sub> = 0,032	4,75±1,25
<b>Т-лимфоциты CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (поздняя активация), 10<sup>6</sup> кл/л T lymphocytes CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (late activation), 10<sup>6</sup> cells/L</b>	65,21±10,42 p <sub>1-3</sub> = 0,034	56,00±4,53 p <sub>2,3</sub> = 0,029	40,87±6,12 p <sub>3,4</sub> = 0,035	65,44±13,36	67,00±21,56
<b>Т-регуляторные клетки (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>), % T regulatory cells (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>), %</b>	2,39±0,25 p <sub>1,2</sub> = 0,049 p <sub>1-3</sub> = 0,002 p <sub>1-4</sub> = 0,001	3,22±0,35 p <sub>2,4</sub> = 0,014 p <sub>2-5</sub> = 0,049	3,85±0,42 p <sub>3-5</sub> = 0,003	4,98±0,78 p <sub>4,5</sub> = 0,002	2,13±0,34
<b>Т-регуляторные клетки (CD 45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>), 10<sup>6</sup> кл/л T regulatory cells (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>), 10<sup>6</sup> cells/L</b>	24,05±2,01 p <sub>1,2</sub> = 0,049 p <sub>1-4</sub> = 0,014	34,03±4,55 p <sub>2,3</sub> = 0,074	23,80±3,33 p <sub>3,4</sub> = 0,034	38,11±7,94	27,70±4,68
<b>Т-регуляторные клетки поздняя активация (CD 45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>), % T regulatory cells late activation (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>), %</b>	6,39±0,95 p <sub>1,2</sub> = 0,049 p <sub>1-4</sub> = 0,014	5,78±0,45 p <sub>2,3</sub> = 0,074	6,33±0,63 p <sub>3,4</sub> = 0,034	8,11±1,13	4,75±1,25
<b>Т-регуляторные клетки поздняя активация (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) абс. T regulatory cells late activation (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) 10<sup>6</sup> cells/L</b>	0,92±0,14 p <sub>1-3</sub> = 0,049 p <sub>1-4</sub> = 0,0012	1,04±0,14 p <sub>2,4</sub> = 0,002	1,37±0,23	2,02±0,36	0,62±0,11

на I крови (в большей степени с повышенными и нормальными NK-клетками), коэффициента атерогенности и риска по Грейс (с повышенными NK-клетками) в сравнении с этими параметрами у пациентов без COVID-19. Следует отметить, что в группе больных без COVID-19 в анамнезе, ни у одного пациента не было повышенных NK-клеток.

В таблице 2 представлены данные о Т-лимфоцитах, Т-NK-лимфоцитах, NK-лимфоцитах, а также Т-регуляторных клетках.

Согласно представленным показателям в таблице 2, у лиц с ОКС и COVID-19 с повышенными NK-клетками наблюдается минимальное число Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов, Т-лимфоцитов ранней активации, Т-лимфоцитов поздней активации, а также Т-регуляторных клеток в абсолютных единицах по сравнению с другими группами. Наименьший иммунорегуляторный индекс и при этом максимальное число Т-NK-лимфоцитов отмечались у лиц, перенесших COVID-19 и имевших пониженные NK-клетки. Минимальное количество Т-NK-лимфоцитов регистрировалось у больных с низкими NK-клетками, не болевших COVID-19. Минимальные Т-лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) поздней активации выявлены у лиц, переболевших COVID-19, с повышенными и нормальными NK-клетками.

Наименьшее число Т-регуляторных клеток поздней активации отмечалось у пациентов, не болевших COVID-19, но вакцинированных и имеющих нормальное содержание NK-клеток.

Согласно исследованиям Лебедевой О.К. и соавт. [2], у больных с острым инфарктом миокарда регистрировались более низкие CD16(+) Т- и NK-клетки.

Другие авторы [3] отмечают, что у 63,6% лиц с ОКС с имплантированными стентами был отмечен рост NK-лимфоцитов, что могло быть обусловлено усилением активности антитрансплантационного иммунитета.

По данным Liu Y. и соавт. [8], патологический аутореактивный иммунный ответ ответственен за разрыв бляшки и последующее начало ОКС. Регуляторные Т-клетки необходимы для подавления патологического аутореактивного иммунного ответа и поддержания иммунного гомеостаза. У пациентов с ОКС выявлено снижение количества и супрессивной функции Т-регуляторных клеток. Это наблюдается и у наших больных, перенесших COVID-19, и имевших повышенные NK-клетки. Согласно исследованиям Tian X. и соавт. [11], у пациентов с ОКС по сравнению с пациентами со стабильной стенокардией и контрольной группой, нарушение образования Т-регуляторных

клеток тесно связано с гиперактивностью симпатической системы.

В работе Gang H. и соавт. [6] отмечено, что Т-цитотоксические клетки от пациентов с ОИМ показали повышенную цитотоксичность по сравнению с контрольной группой. Нарушение регуляции цитотоксических Т-лимфоцитов у пациентов с ОКС и COVID-19 отметили Shafeghat M. и соавт. [9].

Согласно работе Liu P.P. [7], при COVID-19 лимфопения является потенциально связанной со снижением количества Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, что приводит к дисбалансу иммунного ответа, задержке клиренса вируса. Воспаление в сосудистой системе может привести к микроангиопатии с тромбозом, ОКС, внезапной смерти.

В наших исследованиях мы показали, что не все так просто с пациентами, перенесшими ОКС и имеющих те или иные показатели, связанных с определением NK-клеток. Так, больные, перенесшие COVID-19, имеют 3 фенотипа нарушений (пониженное количество NK-клеток нормальное и повышенное), а не перенесшие 2 фенотипа (пониженное количество NK-клеток и нормальное). При этом в этих группах несколько по-разному проявлялись, как нарушения в других компартментах лимфоцитов, так и выраженность клинико-лабораторных изменений. Наиболее тяжелое состояние и степень выраженности иммунных нарушений были выявлены у пациентов, перенесших COVID-19. Проведенное исследование также позволяет более четко определить группы пациентов с ОКС, нуждающихся в дополнительной иммунокоррекции.

## Выводы

1. У лиц с острым коронарным синдромом и COVID-19 преимущественно с нормальным и повышенным уровнем NK-клеток в сопоставлении с пациентами ОКС без COVID-19, наблюдалось более тяжелое течение заболевания – превалировали больные с острым инфарктом миокарда, у них выявлен более высокий уровень смертности, увеличена продолжительность лечения, а также чаще отмечались тромбозы стентов.

2. У лиц с ОКС и COVID-19 с повышенными NK-клетками наблюдалось максимальное снижение Т-клеточного звена иммунитета: Т-лимфоцитов общих, Т-лимфоцитов-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов, Т-лимфоцитов ранней активации, Т-регуляторных клеток в абсолютных числах по сравнению с другими группами.

## Список литературы / References

1. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. 2-е изд., доп. и расшир. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014. 576 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in medicine and biology. 2<sup>nd</sup> edition, supplemented and expanded]. Yekaterinburg: RIO, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. 576 p.
2. Лебедева О.К., Ермаков А.И., Гайковая Л.Б., Кухарчик Г.А. Особенности моноцитарного и лимфоцитарного ответа при инфаркте миокарда с явлениями острой сердечной недостаточности у пациентов с сахарным диабетом 2 типа // Трансляционная медицина, 2021. Т. 8, № 4. С. 5-17. [Lebedeva O.K., Ermakov A.I., Gaykovaya L.B., Kukharchik G.A. Features of the monocytic and lymphocytic response in myocardial infarction with symptoms of acute heart failure in patients with type 2 diabetes. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*, 2021, Vol. 8, no. 4, pp. 5-17. (In Russ.)]
3. Смирнова И.Н., Антипова И.И., Тицкая Е.В., Зайцев А.А., Барабаш Л.В., Тонкошкурова А.В., Зарипова Т.Н., Коршунов Д.В. Анализ клинико-функционального состояния больных острым коронарным синдромом после эндоваскулярных вмешательств на стационарном этапе реабилитации // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация, 2018. Т. 17, № 6. С. 324-331. [Smirnova I.N., Antipova I.I., Titskaya E.V., Zaitsev A.A., Barabash L.V., Tonkoshkurova A.V., Zaripova T.N., Korshunov D.V. Analysis of the clinical and functional state of patients with acute coronary syndrome after endovascular interventions at the stationary stage of rehabilitation. *Fizioterapiya, balneologiya i reabilitatsiya = Physiotherapy, Balneology and Rehabilitation*, 2018, Vol. 17, no. 6, pp. 324-331. (In Russ.)]
4. Хусаинова Л.Н., Смакаева Э.Р., Садикова Р.И., Мингазетдинова Л.Н. Клеточные маркеры апоптоза при остром коронарном синдроме // Медицинский вестник Башкортостана, 2013. Т. 8, № 3. С. 78-81. [Khusainova L.N., Smakaeva E.R., Sadikova R.I., Mingazetdinova L.N. Cellular markers of apoptosis in acute coronary syndrome. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana = Medical Bulletin of Bashkortostan*, 2013, Vol. 8, no. 3, pp. 78-81. (In Russ.)]
5. Bansal M. Cardiovascular disease and COVID-19. *Diabetes Syndr.*, 2020, Vol. 14, no. 3, pp. 247-250.
6. Gang H., Peng D., Hu Y., Tang S., Li S., Huang Q. Interleukin-9-secreting CD4<sup>+</sup> T cells regulate CD8<sup>+</sup> T cells cytotoxicity in patients with acute coronary syndromes. *APMIS*, 2021, Vol. 129, no. 2, pp. 91-102.
7. Liu P.P., Blet A., Smyth D., Li H. The Science Underlying COVID-19: Implications for the Cardiovascular System. *Circulation*, 2020, Vol. 142, no. 1, pp. 68-78.
8. Liu Y., Zhao X., Zhong Y., Meng K., Yu K., Shi H., Wu B., Tony H., Zhu J., Zhu R., Peng Y., Mao Y., Cheng P., Mao X., Zeng Q. Heme oxygenase-1 restores impaired GARP/CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from patients with acute coronary syndrome by upregulating LAP and GARP expression on activated T lymphocytes. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2015, Vol. 35, no. 2, pp. 553-570.
9. Shafeghat M., Aminorroaya A., Rezaei N. How stable ischemic heart disease leads to acute coronary syndrome in COVID-19? *Acta Biomed.*, 2021, Vol. 92, no. 5, e2021512. doi: 10.23750/abm.v92i5.12013.
10. Sheth A.R., Grewal U.S., Patel H.P., Thakkar S., Garikipati S., Gaddam J., Bawa D. Possible mechanisms responsible for acute coronary events in COVID-19. *Med. Hypotheses*, 2020, Vol. 143, 110125. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110125.
11. Tian X., Guo R., Zhang Y., Xu L., Liu X., Hou Y. Effects of the sympathetic nervous system on regulatory T cell and T helper 1 chemokine expression in patients with acute coronary syndrome. *Neuroimmunomodulation*, 2016, Vol. 23, no. 3, pp. 168-178.

---

### Авторы:

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

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

### Authors:

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

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

---

Поступила 14.05.2023  
Принята к печати 29.06.2023

---

Received 14.05.2023  
Accepted 29.06.2023

## ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ НА НЕМЕДИКАМЕНТОЗНУЮ ТЕРАПИЮ ХРОНИЧЕСКОГО АДЕНОИДИТА

Солодовник А.В.<sup>1</sup>, Вялова Т.А.<sup>2</sup>, Габова Е.В.<sup>1</sup>, Поздняков П.А.<sup>1</sup>,  
Бушуева Д.С.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

**Резюме.** Целью работы явилось изучение отдельных показателей иммунологической реактивности у детей с хроническим аденоидитом и оценка их динамики при включении в схему лечения низкочастотной ультразвуковой кавитации в сочетании с фотохромотерапией. В исследовании приняли участие 104 пациента от 3 до 15 лет, разделенные на три группы: 1-я группа контроля (n = 34), получавшая стандартное лечение в течение 7 дней; 2-я группа (n = 37) дополнительно получала низкочастотное ультразвуковое кавитационное орошение глоточной миндалины в сочетании с фотохромотерапией на лимфоидную ткань глоточной миндалины в течение 7 дней; 3-я группа (n = 33) получала дополнительно только низкочастотное ультразвуковое кавитационное орошение. Сравнительная оценка клинических и иммунологических показателей (sIgA, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ ) осуществлялась до начала терапии (0-й день) и на 7-й день от проведенного лечения. До лечения отмечено снижение содержания sIgA, IgA у всех детей. Во второй группе после лечения отмечено статистически значимое повышение уровня IgA, что свидетельствует об активации факторов местного иммунитета. Динамика провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-10) говорит также об эффективности проводимого немедикаментозного лечения в уменьшении проявлений иммунологической реактивности тканей глоточной миндалины. Повышение противовоспалительных цитокинов IL-8, IL-10 может носить компенсаторный характер в ответ на снижение провоспалительных цитокинов.

Таким образом, включение в комплексную схему лечения хронического аденоидита низкочастотной ультразвуковой кавитации в сочетании с фотохромотерапией стабилизирует процессы иммунологической реактивности.

*Ключевые слова:* цитокины, хронический аденоидит, гипертрофия аденоидов, физиолечение

### Адрес для переписки:

Солодовник Анна Валерьевна  
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный  
медицинский университет»  
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.  
Тел.: 8 (932) 010-00-06.  
E-mail: Korkmazov74@gmail.com

### Address for correspondence:

Anna V. Solodovnik  
South Ural State Medical University  
64 Vorovsky St  
Chelyabinsk  
454092 Russian Federation  
Phone: +7 (932) 010-00-06.  
E-mail: Korkmazov74@gmail.com

### Образец цитирования:

А.В. Солодовник, Т.А. Вялова, Е.В. Габова,  
П.А. Поздняков, Д.С. Бушуева «Показатели  
иммунологической реактивности на  
немедикаментозную терапию хронического  
аденоидита» // Российский иммунологический журнал,  
2023. Т. 26, № 3. С. 397-402.  
doi: 10.46235/1028-7221-9448-IOI

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

### For citation:

A.V. Solodovnik, T.A. Vyalova, E.V. Gabov, P.A. Pozdnyakov,  
D.S. Bushueva "Indicators of immunological response to  
non-drug therapy of chronic adenoiditis", Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,  
Vol. 26, no. 3, pp. 397-402.  
doi: 10.46235/1028-7221-9448-IOI

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

DOI: 10.46235/1028-7221-9448-IOI

## INDICATORS OF IMMUNOLOGICAL RESPONSE TO NON-DRUG THERAPY OF CHRONIC ADENOIDITIS

Solodovnik A.V.<sup>a</sup>, Vyalova T.A.<sup>b</sup>, Gabov E.V.<sup>a</sup>, Pozdnyakov P.A.<sup>a</sup>,  
Bushueva D.S.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

**Abstract.** The aim of our work was to study individual indices of immune response in children with chronic adenoiditis and evaluate their dynamics following low-frequency ultrasonic cavitation combined with photochromotherapy included into the treatment regimen. The study involved 104 patients 3 to 15 years old, divided into three groups: the 1<sup>st</sup> control group (n = 34) received standard treatment for 7 days; 2<sup>nd</sup> group (n = 37) received a supplementary low-frequency ultrasonic cavitation irrigation of pharyngeal tonsil combined with photochromotherapy on lymphoid tissue of the pharyngeal tonsil for 7 days; the 3<sup>rd</sup> group (n = 33) received only low-frequency ultrasonic cavitation irrigation treatment. Comparative estimation of clinical and immunological indicators (sIgA, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ ) was performed prior to the therapy (day 0) and on the 7<sup>th</sup> day from the start of treatment. Before therapy, a decrease in the content of sIgA, IgA was revealed in all groups. In the second group, there was a statistically significant increase in the level of IgA after treatment, which suggests activation of local immunity factors. The dynamics of proinflammatory cytokines (IL-6, IL-10) also indicates effectiveness of the drug treatment by reducing manifestations of the tissue immunological reactivity in pharyngeal tonsil. An increased number of anti-inflammatory IL-8 and IL-10 cytokines could be considered a compensatory response to decreased level of pro-inflammatory cytokines.

As a result, the inclusion of low-frequency ultrasonic cavitation in combination with photochromotherapy into the complex treatment for chronic adenoiditis thus stabilizing the course of immune response.

*Keywords:* cytokines, chronic adenoiditis, adenoid hypertrophy, physiotherapy

### Введение

Персистирующий характер течения хронического аденоидита (ХА) обусловлен становлением иммунной системы в детском возрасте под воздействием триггерных факторов окружающей среды (вирусы, бактерии, аллергены, грибы и другие) на фоне сниженного гуморального иммунитета. Микробная обсемененность тканей глоточной миндалины (ГМ) приводит к повышению функциональной активности лимфоидной ткани с последующей гиперплазией и вовлечению в формирование стойкого хронического воспаления [13]. При этом несостоятельность адекватного ответа на локальном уровне обусловлена высоким уровнем провоспалительных цитокинов, что способствует развитию системной воспалительной реакции. Например, особенности течения воспалительного ответа при ХА, ассоциированного с *Streptococcus pneumoniae*, показали повышение уровня IL-6 только в системном кровотоке без значимых изменений в слюне. Уровень же рецепторов к IL-6 и TNF $\alpha$  был высоким как на локальном, так и системном уровнях [4]. Наличие при этом герпесвирусной инфекции (ВЭБ, ЦМВ) уменьшает внутриклеточную продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 в тканях ГМ, пролонгирует иммуносупрессию и поддерживает

хроническое воспаление и клинически проявляется лимфоидной пролиферацией [1].

Значимый вклад в развитие хронического воспаления в тканях ГМ вносят нейтрофильные гранулоциты, осуществляя фагоцитоз, путем формирования внеклеточных нейтрофильных ловушек, с выделением во внеклеточное пространство содержимого гранул и т. д. [15]. В этом контексте интересным представляются работы, где отмечено снижение лизосомальной активности и биоцидных показателей НСТ-теста нейтрофильных гранулоцитов с поверхности ГМ при ХА, свидетельствующие о выраженной дисфункции клеточных факторов местного иммунитета в защите от инфекционного агента [3].

Одним из факторов, приводящих к гиперплазии лимфоидных фолликулов тканей ГМ, является активация антиген-презентирующих и Т-клеток под действием суперантигенов, вырабатываемых некоторыми микроорганизмами, входящими в состав резидентной микрофлоры. При этом происходит активная пролиферация В- и Т-лимфоцитов [8].

Таким образом, развитие иммунного воспаления I или II типа на уровне местной иммунной подсистемы слизистых оболочек определяется свойствами антигенной нагрузки патогенами и состоятельностью защитных факторов [14]. Несвоевременное принятие лечебных мер или их

затягивание приводит к вовлечению в воспалительный процесс слуховой трубы, вследствие чего развиваются острые, а затем средние отиты с деструкцией костной ткани височной кости [5, 6]. Приобретая затяжной характер, заболевания верхних дыхательных путей и уха, провоцируемые ХА, значительно ухудшают качество жизни пациентов, неблагоприятно сказываются на повседневной активности – учебе, спорте и т. д. [9, 10].

Учитывая важную роль лимфоузлов в формировании мукозального иммунитета, в терапии хронического аденоидита у детей наиболее оправданы консервативные методы лечения [11, 12].

Эффективным способом немедикаментозного воздействия является оптическое излучение, все чаще применяемое при лечении ЛОР-заболеваний. Взаимодействие с биологическими тканями обеспечивает превращение энергии фотонов в ее другие виды, такие как тепловая, механическая и химическая. Возбуждение, равно как и нагревание тканей, инициирует запуск физико-химических и биологических реакций организма. Интересен тот факт, что специфика терапевтических эффектов излучения определяется особенностями физико-химических процессов, вызываемых различными видами как электромагнитных полей, так и излучения [2]. Так, известно, что красный спектр излучения (760-620 нм) стимулирует биологическую активность гранул фагоцитов, включающих металлосодежащие ферменты, такие как каталаза, цитохромы и супероксиддисмутаза, активация молекул влечет за собой гиперсекрецию цитокинов, влияющих непосредственно на тонус сосудов, а также течение биохимических процессов превращения арахидоновой кислоты, участия в перекисном окислении липидов, влияя на специфику функционирования иммунитета и т. д. Клиническая эффективность данного метода заключается в обеспечении нормализации микроциркуляции, активации фагоцитоза, выработки антител, в уменьшении выраженности клинических проявлений, в частности болевого синдрома и купированию развития реакций процесса воспаления [7]. Таким образом, изучение воздействия монохроматического поляризованного света представляет научно-практический интерес.

**Цель исследования** – повысить эффективность лечения хронического аденоидита у детей включением в стандартную терапию низкочастотной ультразвуковой кавитации в сочетании с фототерапией.

## Материалы и методы

В исследовании участвовали 104 пациента с гипертрофией аденоидов II или III степени (по классификации А.Г. Лихачева, 1967) на основании трансназальной эндоскопии носоглотки,

с признаками хронического аденоидита. План проведения исследования одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (Протокол заседания № 1 от 15.01.2016), а также соответствует положениям Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. До начала исследования были определены критерии включения и исключения.

Путем рандомизации методом конвертов были сформированы три группы пациентов: 1-я группа контроля (n = 34), получавшая стандартное лечение в течение 7 дней; 2-я группа (n = 37) дополнительно получала низкочастотное ультразвуковое кавитационное орошение ГМ в сочетании с фототерапией на лимфоидную ткань глоточной миндалины в течение 7 дней; 3-я группа (n = 33) получала дополнительно только низкочастотное ультразвуковое кавитационное орошение.

Сравнительная оценка клинических и иммунологических показателей осуществлялась до начала терапии (0-й день) и на 7-й день от проведенного воздействия. Все пациенты, участвовавшие в исследовании, отмечали жалобы на затрудненное носовое дыхание, храп во сне, малопродуктивный утренний кашель, выделения из полости носа. Учитывая растущую резистентность к антибактериальной терапии, немедикаментозные методы воздействия были выбраны в качестве эффективной альтернативы. Анализ динамики клинических симптомов проводился с использованием визуальной аналоговой шкалы (ВАШ) (Huskisson E.C., 1974). Инструментальный осмотр проводился по стандартной методике, и визуализация осуществлялась с помощью видеокамеры и монитора Otopront. Для оценки размеров гипертрофии глоточной миндалины использовалась классификация А.Г. Лихачева (1967), разделяющую гипертрофию аденоидных вегетаций на три степени. В исследование включались пациенты, размеры ГМ которых соответствовали II или III степени.

Диагностическая эндоскопия подтвердила у обследуемых детей хронический характер изменений, на поверхности ГМ были выявлены слизисто-гнойное или слизистое отделяемое, отечность и гиперемия. Иммунологические исследования были проведены в клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ ОДКБ города Челябинска и в Научно-исследовательском институте Иммунологии ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России.

## Результаты и обсуждение

Проведенный анализ показал, что величина концентрации  $slgA$  в слюне у пациентов контрольной группы была в среднем вдвое меньше, чем в группе с применением УЗОЛ и ФХТ ( $303,4 \pm 2,75$  г/л в контрольной группе,  $627,1 \pm 3,28$  г/л во 2-й группе и  $630,4 \pm 3,76$  г/л в

3-й группе ( $p < 0,05$ ). Предотвращение воспаления на поверхности глоточных миндалин осуществляется благодаря функциям sIgA в случае снижения концентрации последнего усиливается рост колонизации патогенных организмов поверхности аденоидов на фоне снижения защитных свойств поверхностей слизистых оболочек. Пониженное содержание sIgA, регистрируемое при хроническом аденоидите, подтверждают опубликованные на сегодняшний день результаты исследований подчеркивающие значимую роль sIgA в системе мукозальной защиты миндалин наряду с другими факторами. Из этого следует, что снижение содержания sIgA в слюне может регистрироваться на фоне выраженного негативного влияния со стороны чужеродных антигенов, так называемого «прессинга» и являться следствием активации факторов адаптивного иммунитета на фоне хронического воспалительного процесса в носоглотке. Увеличение уровня sIgA при использовании в лечении НУЗ и ФХТ свидетельствует об активном влиянии на местные факторы иммунологической защиты поверхности глоточной миндалины.

Воспаление при хроническом аденоидите является результатом запуска цитокинового каскада, включающего в себя противовоспалительные медиаторы и противовоспалительные цитокины. При этом особенности течения воспалительного процесса при хроническом аденоидите обусловлены соотношением между оппозитными группами цитокинов. Оценка содержания цитокинов позволяет увидеть состояние цитокиновой сети и оценки динамику на фоне проводимой терапии.

Общая картина цитокинового профиля смылов с поверхности ГА IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 и

TNF $\alpha$ , стимулирующих эффекторов врожденного иммунитета, в частности активации фагоцитов и эндотелиоцитов, участвующих в регуляции провоспалительных реакций с участием IL-6 и IL-10, клеточной гибели TNF $\alpha$ , отражена в таблице 1.

Концентрация IL-6, регистрируемая в группе контроля, была выше в 3,14 раза относительно величин показателей в группе с использованием УЗОЛ+ФХТ, и в 3,1 раза в группе УЗОЛ ( $p < 0,05$ ). Снижение концентрации IL-6 при применении немедикаментозных методов физического воздействия может свидетельствовать об ограничении воспалительного процесса в глоточной миндалине при хроническом аденоидите, что согласуется с опубликованными результатами известных научных исследований.

На фоне проводимой терапии УЗОЛ+ФХТ у детей с ХА показатели концентрации IL-10 с поверхности ГМ почти вдвое выше показателей контрольной группы ( $p < 0,05$ ). Данные изменения проявляются купированием признаков воспаления при хроническом аденоидите и улучшения клинического состояния пациентов. Более низкие показатели содержания IL-1 $\beta$  были отмечены у детей с ХА на фоне проводимого лечения по сравнению с данными контрольной группы.

В группе с использованием УЗОЛ и ФХТ отмечалось достоверное снижение показателя уровня IL-8 почти в 4 раза в сравнении с пациентами контрольной группы ( $p < 0,05$ ). Увеличение концентрации IL-8 в группе контроля, вероятно, является следствием антигенной активности микроорганизмов лимфоидной ткани, осуществляющих повышение активности генов медиаторов воспаления.

**ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В ОТДЕЛЯЕМОМ С ПОВЕРХНОСТИ ГЛОТОЧНОЙ МИНДАЛИНЫ (n = 104), M $\pm$ m**

TABLE 1. CONTENT OF CYTOKINES IN DISCHARGE FROM THE SURFACE OF THE PHARYNGEAL TONSIL (n = 104), M $\pm$ m

Содержание цитокинов Content of cytokines	Группа контроля Control group (n = 34)	Группа УЗОЛ + ФХТ UZOL + FHT group (n = 37)	Группа УЗОЛ UZOL group (n = 33)
IL-1 $\beta$ (пг/мл) IL-1 $\beta$ (pg/mL)	1,50 $\pm$ 0,03	1,10 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,05
IL-6 (пг/мл) IL-6 (pg/mL)	11,30 $\pm$ 0,01	3,40 $\pm$ 0,01*	3,60 $\pm$ 0,02*
IL-8 (пг/мл) IL-8 (pg/mL)	3,50 $\pm$ 0,06	0,93 $\pm$ 0,02*	0,95 $\pm$ 0,03*
IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/mL)	19,70 $\pm$ 0,02	11,60 $\pm$ 0,02*	11,40 $\pm$ 0,05*
TNF $\alpha$ (пг/мл) TNF $\alpha$ (pg/mL)	3,21 $\pm$ 0,01	1,10 $\pm$ 0,01*	1,30 $\pm$ 0,07*

Примечание. \* – статистически значимые отличия от показателей контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

Note. \*, statistically significant differences from the indicators of the control group ( $p < 0.05$ ).

В группе контроля концентрации TNF $\alpha$  была увеличена почти в три раза по сравнению с величиной показателя в группе с использованием в лечении УЗОЛ + ФХТ ( $p < 0,05$ ) и составила  $3,21 \pm 0,01$  пг/мл.

Снижение концентрации IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  при хроническом воспалении ГМ на фоне применения в комплексном терапии УЗОЛ и ФХТ свидетельствует о влиянии иммунокомпетентных клеток на течение воспалительного процесса в тканях глоточной миндалины, в частности ограничении выраженности последнего при хроническом процессе.

## Выводы

На фоне хронического течения воспалительного процесса глоточной миндалины персистенция бактериальной флоры инициирует инфекционно-зависимые иммунопатологические состояния, оказывая негативное влияние как на продолжительность течения заболевания в детском возрасте, так и вероятность развития рецидивов. Включение в комплексную схему лечения ХА низкочастотной ультразвуковой кавитации в сочетании с фотохромотерапией способствует стабилизации иммунологического дисбаланса.

## Список литературы / References

1. Бойко Н.В., Стагниева И.В., Ким А.С., Симбирцев А.С. Содержание провоспалительных цитокинов в слюне детей с хроническим тонзиллитом // Вестник оториноларингологии, 2019. Т. 84, № 3. С. 26-31. [Boiko N.V., Stagnieva I.V., Kim A.S., Simbirtsev A.S. Proinflammatory cytokine content in the saliva of children suffering from chronic tonsillitis. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2019, Vol. 84, no. 3, pp. 26-31. (In Russ.)]
2. Веселовский А.Б., Кирьянова В.В., Митрофанов А.С., Петрищев Н.Н., Фефилов Г.Д., Янтарева Л.И. Тенденции развития, разработка и исследование физиотерапевтической аппаратуры для фотохромотерапии // Оптические и лазерные технологии: сб. ст. СПб., 2001. С. 149-164. [Veselovsky A.B., Kiryanova V.V., Mitrofanov A.S., Petrishchev N.N., Fefilov G.D., Yantareva L.I. Development trends, development and research of physiotherapy equipment for photochromotherapy. *Optical and laser technologies: collection of articles*. St. Petersburg, 2001, pp. 149-164. (In Russ.)]
3. Гизингер О.А., Коркмазов А.М., Коркмазов М.Ю. Состояние факторов антимикробной защиты назального секрета у пациентов, оперированных по поводу искривления носовой перегородки в ранний послеоперационный период // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 2. С. 117-119. [Gizinger O.A., Korkmazov A.M., Korkmazov M.Yu. State of antimicrobial protection factors of nasal secretion in patients operated on for deviated nasal septum in the early postoperative period. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 2, pp. 117-119. (In Russ.)]
4. Дроздова М.В., Симбирцев А.С., Варюшина Е.А., Тырнова Е.В. Продукция провоспалительных цитокинов в ткани глоточной миндалины при хроническом лимфопролиферативном синдроме у детей // Российская оториноларингология, 2009. № 5 (42). С. 35-44. [Drozdova M.V., Simbirtsev A.S., Varyushina E.A., Tyrnova E.V. Production of proinflammatory cytokines by nasopharyngeal tonsil (adenoid) tissue in children with chronic lymph proliferative syndrome. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2009, no. 5 (42), pp. 35-44. (In Russ.)]
5. Дубинец И.Д., Коркмазов М.Ю., Синицкий А.И., Учаев Д.А., Ангелович М.С. Изменение элементного состава височной кости у пациентов с хроническим гнойным средним отитом // Вестник оториноларингологии, 2020. Т.85, №5. С. 44-50. [Dubinets I.D., Korkmazov M.Y., Sinitsky A.I., Uchaev D.A., Angelovich M.S. Changes in the elemental composition of the temporal bone in patients with chronic suppurative otitis media. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2020, Vol. 85, no. 5, pp. 44-50. (In Russ.)]
6. Дубинец И.Д., Коркмазов М.Ю., Синицкий А.И., Даньшова Е.И., Скирпичников И.Н., Мокина М.В., Мирзагалиев Д.М. Окислительный стресс на локальном и системном уровне при хронических гнойных средних отитах // Медицинский совет, 2021. № 18. С. 148-156. [Dubinets I.D., Korkmazov M.Yu., Sinitskii A.I., Danshova E.I., Skirpichnikov I.N., Mokina M.V., Mirzagaliev D.M. Local and systemic oxidative stress in chronic suppurative otitis media. *Meditinskiy sovet = Medical Council*, 2021, no. 18, pp. 148-156. (In Russ.)]
7. Ёлкина Т.Н., Захарова Л.Н., Евстропов А.Н., Маринкин И.О., Несина И.А., Люткевич А.А., Худоногова З.П., Шоларь М.В., Пустоветова М.Г., Грачев В.И., Грибанова О.А., Татаренко Ю.А. Опыт применения селективной поляризованной хромотерапии в клинической практике // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры, 2013. Т. 90, № 6. С. 42-47. [Elkina T.N., Zakharova L.N., Evstropov A.N., Marinkin I.O., Nesina I.A., Liutkevich A.A., Khudonogova Z.P., Sholar M.V., Grachev V.I., Pustovetova M.G., Gribanova O.A., Tatarenko Yu.A. The experience with the application of selective polarized chromotherapy in the clinical practice. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoi fizicheskoi kultury = Problems of Balneology, Physiotherapy and Exercise Therapy*, 2013, Vol. 90, no. 6, pp. 42-47. (In Russ.)]
8. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 642 с. [Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R.Ya. *Clinical immunology and allergology with the basics of general immunology*. Moscow: GEOTAR-Media, 2012. 642 p.
9. Коркмазов М.Ю., Коркмазов А.М., Дубинец И.Д., Ленгина М.А., Кривопапов А.А. Особенности альтеративного воздействия импульсного шума на кохлеарный анализатор у спортсменов: прогноз, методы коррекции и профилактики // Человек. Спорт. Медицина, 2021. Т. 21, № 2. С. 189-200. [Korkmazov M.Yu.,

Korkmazov A.M., Dubinets I.D., Lengina M.A., Krivopalov A.A. Features of the alterative effect of impulse noise on the auditory analyzer in athletes: prognosis, correction and prevention. *Chelovek. Sport. Meditsina = Human. Sport. Medicine*, 2021, Vol. 21, no. 2, pp. 189-200. (In Russ.)]

10. Коркмазов М.Ю., Дубинец И.Д., Ленгина М.А., Коркмазов А.М., Корнова Н.В., Рябенко Ю.И. Отдельные показатели иммунологической реактивности при хирургической альтерации лор-органов // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 201-206. [Korkmazov M.Yu., Dubinets I.D., Lengina M.A., Korkmazov A.M., Kornova N.V., Ryabenko Yu.I. Distinct indexes of immunological reactivity in surgical alteration of ORL organs. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 201-206. (In Russ.)]. doi: 10.46235/1028-7221-1121-DIO.

11. Коркмазов М.Ю., Солодовник А.В., Коркмазов А.М., Ленгина М.А. Перспективы использования растительного препарата в сочетании с физическими методами при комплексной терапии хронического аденоидита // Медицинский совет, 2021. № 18. С. 19-27. [Korkmazov M.Yu., Solodovnik A.V., Korkmazov A.M., Lengina M.A. Prospects for using herbal preparation in combination with physical methods in complex therapy of chronic adenoiditis. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2021, no. 18, pp. 19-27. (In Russ.)]

12. Коркмазов М.Ю., Ленгина М.А., Дубинец И.Д., Коркмазов А.М., Смирнов А.А. Возможности коррекции отдельных звеньев патогенеза аллергического ринита и бронхиальной астмы с оценкой качества жизни пациентов // Медицинский совет, 2022. Т. 16, № 4. С. 24-34. [Korkmazov M.Yu., Lengina M.A., Dubinets I.D., Korkmazov A.M., Smirnov A.A. Opportunities for correction of individual links of the pathogenesis of allergic rhinitis and bronchial asthma with assessment of the quality of life of patients. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2022, Vol. 16, no. 4, pp. 24-34. (In Russ.)]

13. Куртасова Л.М., Шакина Н.А., Лубнина Т.В., Николаева А.И. Иммунологические показатели и энзиматическая активность лимфоцитов периферической крови у детей с гипертрофией глоточной миндалины // Вестник оториноларингологии, 2017. Т. 82, № 2. С. 42-45. [Kurtasova L.M., Shakina N.A., Lubnina T.V., Nikolaeva A.I. The immunological characteristics and enzymatic activity of lymphocytes from the peripheral blood of the children presenting with pharyngeal tonsillar hypertrophy. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2017, Vol. 82, no. 2, pp. 42-45. (In Russ.)]

14. Терскова Н.В., Камзалакова Н.И., Вахрушев С.Г., Смбастьян А.С. Характеристика клеточного и гуморального звеньев иммунитета у детей с хроническим аденоидитом // Вестник оториноларингологии, 2013. № 4. С. 10-14. [Terskova N.V., Kamzalakova N.I., Vakhrushev S.G., Smbatian A.S. Characteristics of cell-mediated and humoral components of the immune response in the children presenting with chronic adenoiditis. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2013, no. 4, pp. 10-14. (In Russ.)]

15. Щегинин С.А., Гизингер О.А., Коркмазов М.Ю. Клинические проявления и дисфункции иммунного статуса у детей с хроническим аденоидитом и методы их коррекции с использованием озонотерапии // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 3-1. С. 255-257. [Shchetinin S.A., Gisinger O.A., Korkmazov M.Yu. Clinical manifestations and dysfunctions of the immune status in children with chronic adenoiditis and methods of their correction using ozone therapy. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 3-1, pp. 255-257. (In Russ.)]

---

**Авторы:**

**Солодовник А.В.** — аспирантка кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Вялова Т.А.** — заслуженный врач РФ, заведующая отделением кардиологии № 2 ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

**Габова Е.В.** — студентка педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Поздняков П.А.** — студент лечебного факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Бушуева Д.С.** — студент лечебного факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

---

**Authors:**

**Solodovnik A.V.**, Postgraduate Student, Department of Otorhinolaryngology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Vyalova T.A.**, Honored Doctor of the Russian Federation, Head, Department of Cardiology No. 2, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

**Gabova E.V.**, Student, Pediatric Faculty, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Pozdnyakov P.A.**, Student, Faculty of Medicine, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

**Bushueva D.S.**, Student, Faculty of Medicine, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

---

Поступила 30.05.2023

Отправлена на доработку 29.06.2023

Принята к печати 06.07.2023

---

Received 30.05.2023

Revision received 29.06.2023

Accepted 06.07.2023

## ВЛИЯНИЕ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β1-ГЛИКОПРОТЕИНА НА ЭКСПРЕССИЮ АРГИНАЗЫ-1 И ИНДОЛАМИН-2,3-ДИОКСИГЕНАЗЫ МИЕЛОИДНЫМИ СУПРЕССОРНЫМИ КЛЕТКАМИ

Тимганова В.П., Шардина К.Ю., Гутина Е.В.

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

**Резюме.** Миелоидные супрессорные клетки (МСК, MDSC) — популяция незрелых клеток миелоидного происхождения, проявляющая угнетающие функции, преимущественно в отношении Т-лимфоцитов. В норме MDSC составляют менее 1% от лейкоцитов периферической крови. Количество этих клеток возрастает при здоровой беременности, однако показана решающая роль MDSC в поддержании роста опухолей и при аутоиммунных патологиях.

Поскольку MDSC в настоящее время относят к важным регуляторам иммунитета, поиск способов манипулирования их функциями актуален для разработки лечения злокачественных и аутоиммунных заболеваний, а также патологий беременности и посттрансплантационных осложнений. Иммуносупрессивные механизмы этих клеток опосредованы экспрессией ими поверхностных молекул CD73, ADAM17, PD-L1, ферментов аргиназы 1 (Arg1), индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), активных форм кислорода, а также продукцией противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF-β1.

Трофобластический β1-гликопротеин (ТБГ) — гликопротеин беременности, обладающий иммуномодулирующими эффектами в отношении клеток естественного (дендритные клетки и макрофаги) и адаптивного (Т-клетки) иммунитета. В то же время влияние ТБГ на MDSC ранее не было изучено. Так как данный гликопротеин обладает перспективами фармакологического применения, необходимо исследовать не только нативный вариант ТБГ, но и его рекомбинантную форму.

Поскольку основной функцией MDSC является иммуносупрессия, целью нашей работы стала оценка одного из ее механизмов, а именно внутриклеточной экспрессии ферментов деградации аминокислот, Arg1 и IDO, под влиянием нативного и рекомбинантного ТБГ *in vitro*.

Дифференцировку MDSC производили из CD11b<sup>+</sup> клеток, выделенных из периферической крови здоровых добровольцев. Клетки культивировали 7 дней с поэтапным добавлением GM-CSF, IL-1β и LPS. Нативный (н) (1, 10 и 100 мкг/мл) и рекомбинантный (р) (1 и 10 мкг/мл) ТБГ вносили в культуры за три дня до окончания инкубации. Методом проточной цитометрии определяли процент MDSC (Lin<sup>-</sup>HLA-DR-CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>), внутриклеточно экспрессирующих Arg1 и IDO.

### Адрес для переписки:

Тимганова Валерия Павловна  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения Российской академии наук  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (902) 836-14-55.  
Email: timganovavp@gmail.com

### Address for correspondence:

Valeria P. Timganova  
Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms  
13 Golev St  
Perm  
614081 Russian Federation.  
Phone: +7 (902) 836-14-55.  
Email: timganovavp@gmail.com

### Образец цитирования:

В.П. Тимганова, К.Ю. Шардина, Е.В. Гутина  
«Влияние трофобластического β1-гликопротеина на  
экспрессию аргиназы-1 и индоламин-2,3-диоксигеназы  
миелоидными супрессорными клетками» // Российский  
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 403-408.  
doi: 10.46235/1028-7221-10003-EOT

© Тимганова В.П. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

V.P. Timganova, K.Yu. Shardina, E.V. Gutina “Effects  
of pregnancy-specific β1-glycoprotein on expression of arginase  
1 and indoleamine 2,3-dioxygenase by myeloid-derived  
suppressor cells”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 403-408.  
doi: 10.46235/1028-7221-10003-EOT

© Timganova V.P. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-10003-EOT

Обнаружено, что нТБГ и рТБГ во всех исследованных концентрациях не изменяли количество MDSC, экспрессирующих Arg1. Однако оба вида белка в концентрации 10 мкг/мл вызывали статистически значимое увеличение процента клеток, экспрессирующих IDO.

Ранее нами было обнаружено, что нТБГ и рТБГ влияют на дифференцировку MDSC, увеличивая процент этих клеток, относящихся к моноцитарной субпопуляции. Однако сейчас можно сказать, что, помимо этого, ТБГ усиливает супрессивную функцию исследуемых клеток.

Полученные данные являются новыми и открывают перспективы таргетного воздействия на миелоидные супрессорные клетки с целью совершенствования клеточных технологий в науке и медицине.

*Ключевые слова:* миелоидные супрессорные клетки, трофобластический  $\beta 1$ -гликопротеин, аргиназа-1, индоламин-2,3-диоксигеназа, иммуносупрессия

## EFFECTS OF PREGNANCY-SPECIFIC $\beta 1$ -GLYCOPROTEIN ON EXPRESSION OF ARGINASE 1 AND INDOLEAMINE 2,3-DIOXYGENASE BY MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS

Timganova V.P., Shardina K.Yu., Gutina E.V.

*Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

**Abstract.** Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) represent a population of immature myeloid cells with inhibitory properties, mainly related to T lymphocytes. Normally, MDSCs account for < 1% of peripheral blood leukocytes. These cells increase in number during physiological pregnancy. However, MDSCs seem to play a critical role in the maintenance of tumor growth and autoimmune disorders.

Due to significant role of MDSCs in immune regulation, the ways to manipulate their functions are important for development of therapies in malignant and autoimmune diseases, pregnancy disorders and post-transplant complications. The immunosuppressive mechanisms of these cells are mediated by the surface expression of certain molecules, e.g., CD73, ADAM17, PD-L1, and several enzymes including arginase 1 (Arg 1), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), along with production of reactive oxygen species and anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta 1$ .

Pregnancy-specific  $\beta 1$ -glycoprotein (PSG) is a pregnancy-related protein which exerts immunomodulatory effects on natural immunity cells (dendritic cells and macrophages) and T cells in adaptive immune response. So far, the effect of PSG on MDSCs has not been investigated. Since this glycoprotein has promising pharmacological properties, it is necessary to study both the native PSG and its recombinant form. Since immunosuppression is the main function of MDSC, the aim of our work was to evaluate its effector mechanisms, i.e., the *in vitro* cellular expression of amino acid degradation enzymes Arg1 and IDO under the influence of native and recombinant PSG.

MDSC differentiation was performed from the CD11b<sup>+</sup> cells isolated from peripheral blood of healthy volunteers. The cells were cultured for 7 days with stepwise addition of GM-CSF, IL-1 $\beta$ , and LPS. Native PSG (1, 10, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and recombinant PSG (rPSG, 1 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were added to the cultures three days before the end of incubation. The percentage of MDSCs (Lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup>) with intracellular expression of Arg1 and IDO was determined by flow cytometry.

It was found that native PSG and rPSG did not alter the amount of Arg1-expressing MDSCs at any concentration used. However, both types of proteins applied at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , caused a statistically significant increase in the percentage of IDO-expressing cells.

We have previously reported that native PSG and rPSG affect MDSC differentiation by increasing the proportion of these cells belonging to monocytic subpopulation. Moreover, we can state now that PSG may enhance the suppressive function of the studied cells. The obtained novel data provide an outlook for targeting myeloid suppressor cells in order to improve cellular technologies in science and medicine.

*Keywords:* myeloid-derived suppressor cells, pregnancy-specific  $\beta 1$ - glycoprotein, arginase-1, indoleamine-2,3-dioxygenase, immunosuppression

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-25-00378).

## Введение

Миелоидные супрессорные клетки (МСК, MDSC) представляют собой небольшую (в норме менее 1% от лейкоцитов крови) гетерогенную популяцию, состоящую из незрелых нейтрофилов и моноцитов, способных подавлять врожденный, адаптивный, а также противоопухолевый иммунный ответ. Количество MDSC возрастает при беременности и при различных патологических состояниях, таких как воспаление, заражение крови, травматический шок, аутоиммунные заболевания и рак [12].

MDSC ингибируют иммунный ответ через межклеточные взаимодействия с помощью молекул на поверхности клеток, а также короткоживущих медиаторов. Супрессивное действие этих клеток затрагивает разные звенья клеточного иммунитета, однако в первую очередь они подавляют функции Т-лимфоцитов. К поверхностным молекулам-посредникам угнетения клеточных функций относят CD73, ADAM17, PD-L1, Gal-9 и CD40. К растворимым факторам MDSC, угнетающим иммунный ответ, относят цитокины IL-10, TGF- $\beta$  и активные формы кислорода [12].

Одним из самых главных механизмов иммуносупрессии для MDSC служит нарушение метаболизма аргинина и триптофана, а именно, их истощение. Фермент iNOS (индуцибельная NO-синтаза) конвертирует аргинин в NO и цитруллин, а аргиназа 1 (Arg1) – в орнитин и мочевины. Недостаток аргинина в месте иммунного ответа угнетает пролиферацию Т-клеток и подавляет экспрессию CD3-цепей TCR [15]. Аналогичным образом, STAT3 – зависимая активация индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) приводит к дефициту L-триптофана и последующему апоптозу Т-лимфоцитов [13]. Кроме того, образуются метаболиты триптофана (кинуренин, 3-гидроксикинуренин, 3-гидроксиантралиловая кислота), которые влияют на нормальное функционирование макрофагов и Т-лимфоцитов, а также могут привести к образованию Treg за счет связывания с арильными углеводородными рецепторами [7].

Благодаря большому спектру механизмов супрессии MDSC в настоящее время считаются одними из важнейших регуляторов иммунного ответа. Поиск способов контроля над ними чрезвычайно актуален с точки зрения терапии всех заболеваний и состояний, в которые вовлечены эти клетки. Кроме того, MDSC могут стать удачной фармакологической мишенью для решения проблем, связанных с иммунным отторжением как полуаллогенных эмбрионов, так и пересаженных органов или тканей.

Трофобластический  $\beta$ 1-гликопротеин (ТБГ, англ. PSG) является доминирующим фетоплацентарным белком, обладающим иммуномодулирующими свойствами. За последние 10 лет, благодаря разработке авторского метода получения нативного препарата ТБГ человека [1], мы продемонстрировали эффекты этого белка в отношении различных популяций иммунных клеток [10]. Было установлено, что ТБГ стимулирует экспрессию IDO моноцитами женщин, подавляет пролиферацию и дифференцировку Th17, подавляет продукцию провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-17, IFN $\gamma$ , MCP-1, TNF $\alpha$ ) а также G-CSF и GM-CSF [10]. Помимо этого, было установлено, что ТБГ угнетал экспрессию маркеров активации CD28 и CD25 наивными Т-клетками, не влияя на продукцию ими IL-2, однако на уровне Т-клеток иммунной памяти ТБГ снижал поверхностную экспрессию CD25 одновременно со снижением продукции IL-2. Кроме того, было показано подавление экспрессии генов, регулирующих альтернативный сплайсинг CD45 (Gfi1, hnRNPLL) под действием ТБГ, что, по-видимому, в контексте нашей работы, может блокировать трансдифференцировку наивных Т-клеток в Т-клетки памяти [11]. Разнообразие иммунорегуляторных эффектов ТБГ натолкнуло нас на мысль о том, что этот уникальный гликопротеин может оказывать влияние и на популяцию MDSC.

Свойства нативного и рекомбинантного (негликозилированного) препаратов ТБГ могут отличаться. В то же время очевидно, что для практического применения препарата необходимо детальное изучение эффектов более доступных рекомбинантных форм ТБГ.

Ввиду гетерогенности MDSC и сложности получения их *in vitro*, наряду с поверхностными маркерами необходимо определять функциональное состояние этих клеток, в частности экспрессию ими ферментов деградации аминокислот, Arg1 и IDO.

Таким образом, **целью настоящей работы** является изучение влияния нативного и рекомбинантного ТБГ на экспрессию аргиназы-1 и индоламин-2,3-диоксигеназы миелоидными супрессорными клетками.

## Материалы и методы

Периферическую кровь доноров-добровольцев забирали венепункцией (n = 4). Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 г. и Протоколом к Конвенции Совета Европы о правах человека и био-медицине 1999 г. На используемую экспериментальную схему получено одобрение Комитета по этике ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 15 февраля 2022 г., протокол № 15. У всех пациентов

было получено письменное информированное согласие.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ , «Диаколл», «Диаэм», Россия). CD11b<sup>+</sup> клетки выделяли из РВМС с помощью позитивной иммуномагнитной сепарации (MacsBeads, колонки LS (Miltenyi Biotec, Германия)). Полученные клетки в концентрации  $1 \times 10^6$  высевали в 96-луночный планшет, содержащий полную питательную среду (RPMI-1640, 10% ЭТС, 10 мМ Нерес (ICN Ph., США), 2 мМ-глутамин (ICN Ph.) и 100 мкг/мл пенициллина-стрептомицина-амфотерицина (100 мкл на 10 мл среды, BI, Израиль)). К культурам добавляли GM-CSF (Miltenyi Biotec, Германия) в концентрации 20 нг/мл. Клетки инкубировали в течение трех дней во влажной атмосфере в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub> и 37 °С. Затем культуральную среду заменяли, добавляли IL-1 $\beta$  (20 нг/мл, Miltenyi Biotec, Германия) и ЛПС (0,1 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) для активации клеток. На следующий день добавляли исследуемые белки: нативный ТБГ (Патент РФ № 2367449, Раев М.Б.) в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл и рекомбинантный ТБГ (PSG 1, Cusabio, Китай) в концентрациях 1 и 10 мкг/мл (выбор концентраций основывался на их соответствии разным триместрам беременности [6] и предварительным экспериментам по влиянию белков на жизнеспособность клеток. Затем клетки культивировали в течение дополнительных трех дней. Через 7 суток общей продолжительности инкубации клетки окрашивали на жизнеспособность красителем Zombie Aqua (BioLegend, США) и антителами, мечеными флуорохромами, для определения фенотипа MDSC на проточном цитометре. Панель антител для поверхностного окрашивания: анти-HLA-DR-Alexa Fluor 750, анти-CD33-APC, анти-CD11b-Alexa Fluor 405, анти-CD66b-PE, анти-CD14-PerCP (R&D Systems, США). Для исключения лимфоцитов и NK-клеток из целевого гейта использовали антитела: анти-CD19-AF700, анти-CD56-AF700, анти-CD3-AF700. Экспрессию Arg1 и IDO определяли при помощи внутриклеточного окрашивания антителами anti-h Arginase 1-AF488 и anti-h IDO-AF488 (R&D Systems, США). Пробы FMO (fluorescence minus one) и изотипические контроли использовали для разделения «негативных» и «позитивных» популяций. Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). После гейтирования ZA-Lin<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> клеток, на отдельных гистограммах определяли процент Arg<sup>+</sup> и IDO<sup>+</sup> клеток. Данные проточной цитометрии обрабатывали с помощью программы CytExpert (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8.0.1 с использованием критерия Фридмана и апостериорного кри-

терия Данна для множественных сравнений. Результаты представлены в виде медианы, нижнего квартиля и верхнего квартиля – Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Уровень значимости был принят за 0,05.

## Результаты и обсуждение

Обнаружено, что ТБГ обоих типов во всех исследованных концентрациях не влиял на процент MDSC, содержащих аргиназу-1 (рис. 1).

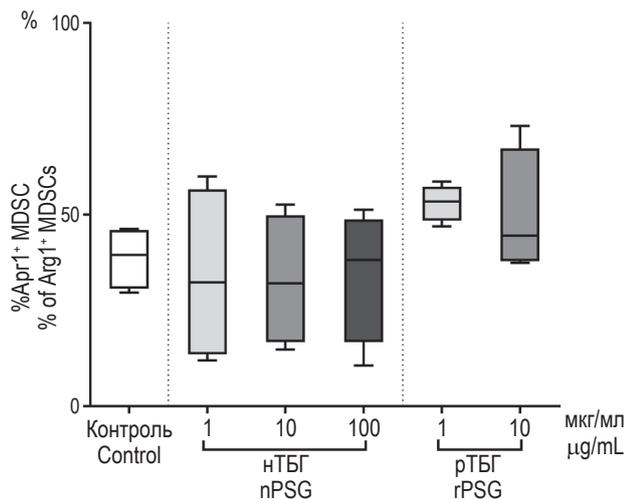
Показано, что как рекомбинантный, так и нативный вариант ТБГ вызывали статистически значимое по отношению к контролю повышение процента клеток, экспрессирующих IDO (рис. 2). Хотя в среднем процент IDO<sup>+</sup> клеток был больше в культурах с 10 мкг/мл рТБГ, чем в культурах с такой же дозой нТБГ, статистически значимых отличий между ними не было.

Таким образом, установлено, что ТБГ в нашей экспериментальной системе не модулировали экспрессию Arg1, однако стимулировал экспрессию IDO в концентрации 10 мкг/мл, соответствующей II триместру беременности.

Истощение запасов аргинина за счет активации аргиназы-1 было одним из первых механизмов супрессии Т-клеток, описанных для MDSC. Переносчик катионных аминокислот CAT-2В быстро переносит внеклеточный L-аргинин в MDSC, который впоследствии расщепляется на мочевины и L-орнитин под действием Arg1 [4]. Дефицит аргинина во внеклеточном пространстве может привести к потере цепи CD3 $\zeta$  и очевидно ингибированию пролиферации Т-клеток [15].

В целом содержание Arg1 в культурах клеток MDSC, полученных *in vitro* из клеток, выделенных из периферической крови здоровых доноров, является подтверждением наличия у них супрессивной активности, что является определенным методическим успехом. Однако как мы видим, внесение ТБГ в культуры не приводило к статистически значимым изменениям числа содержащих этот фермент клеток в культурах. Данный феномен может быть связан с тем, что Arg1 человека может продуцироваться в среде, следовательно, детектироваться только в части клеток [8]. Здесь мы представляем данные только по внутриклеточному содержанию Arg1 в MDSC, однако дальнейший анализ супернатантов может помочь прояснить ситуацию. Интересно, что наряду с информацией об экспрессируемой MDSC аргиназе-1 как об одном из основных механизмов супрессии, получены данные, что MDSC из костного мозга мышей с прогрессирующей опухолью могут не экспрессировать Arg1, и авторы сделали вывод, что Arg1 не является конститутивным ферментом, а индуцируется присутствием активирующих Т-клеток [2].

Что касается второго исследуемого фермента, нами показано, что процент клеток MDSC, экс-



**Рисунок 1.** Процент MDSC, содержащих Arg1 в культурах с добавлением нативного и рекомбинантного ТБГ  
Примечание. n = 4; контроль – культуры без ТБГ; по оси абсцисс тип и концентрация ТБГ; ось ординат – процент клеток, содержащих Arg1 в гейте MDSC. Показаны медианы (горизонтальные линии), межквартильные размахи (прямоугольники), максимальные и минимальные значения («усы»).

Figure 1. Percentage of MDSC containing Arg1 in cultures supplemented with native and recombinant PSG

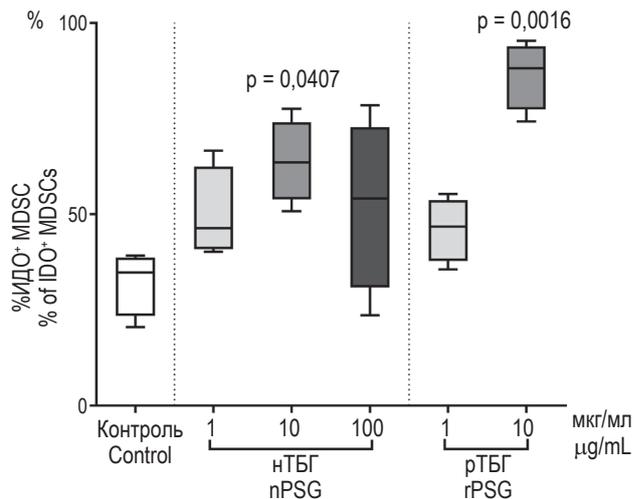
Note. n = 4; control, cultures without PSG; x-axis, type and concentration of PSG; y-axis, percentage of cells containing Arg1 in the MDSC gate. Medians (horizontal lines), interquartile ranges (rectangles), maximum and minimum values (“whiskers”) are shown.

прессурующих IDO, возрастал под действием обоих видов ТБГ в концентрации 10 мкг/мл.

Существуют разные варианты регуляции экспрессии IDO. Активировать сигнальные механизмы, которые либо индуцируют, либо поддерживают экспрессию IDO способны толл-подобные рецепторы (TLR), члены суперсемейства фактора некроза опухоли (TNFR), рецептор интерферона бета (IFNBR), рецептор интерферона гамма (IFNGR), рецепторы трансформирующего фактора роста бета (TGFBR) и арилуглеводородный рецептор (AhR) [7]. В нашем случае в культуральной среде присутствовал ЛПС, участвующий в индукции IDO, таким образом, именно на фоне активации молекул TLR ТБГ оказывал свои стимулирующие эффекты.

Ранее нами была показана способность нативного ТБГ в тех же физиологических концентрациях стимулировать экспрессию IDO моноцитами периферической крови. Было установлено, что нативный ТБГ в концентрации 10 мкг/мл стимулировал экспрессию IDO в моноцитах в присутствии ЛПС, что согласуется с текущими результатами [14].

В контексте беременности, способность ТБГ модулировать активность IDO может вносить свой вклад в формировании иммунной толерант-



**Рисунок 2.** Процент MDSC, содержащих IDO, в культурах с добавлением нативного и рекомбинантного ТБГ  
Примечание. n = 4; контроль – культуры без ТБГ; по оси абсцисс тип и концентрация ТБГ; ось ординат – процент клеток в гейте MDSC, содержащих IDO. Показаны медианы (горизонтальные линии), межквартильные размахи (прямоугольники), максимальные и минимальные значения («усы»). Указаны значения  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

Figure 2. Percentage of MDSC containing IDO in cultures supplemented with native and recombinant PSG

Note. n = 4; control, cultures without PSG; x-axis, type and concentration of PSG; y-axis, percentage of cells in MDSC gate containing IDO. Medians (horizontal lines), interquartile ranges (rectangles), maximum and minimum values (“whiskers”) are shown.  $p < 0.05$  values are given relative to control.

ности матери к полуаллогенному плоду. К настоящему времени не обнаружены рецепторы к PSG человека на поверхности клеток, однако обнаружен механизм, при помощи которого этот белок может активировать TGF- $\beta$ , связываясь с его латентной формой [3].

Вероятно, именно посредством TGF- $\beta$  происходит активация синтеза IDO. Известно, что в дендритных клетках в усиление биосинтеза IDO вовлечена индукция неканонического пути NF- $\kappa$ B, создающая петлю положительной обратной связи для устойчивой продукции TGF- $\beta$  и IDO1 через фосфатидилинозитол-3-киназа – зависимый механизм [9]. Можно предположить, что MDSC также могут использовать данный механизм для индукции экспрессии IDO и реализации супрессорной активности.

## Заключение

Таким образом, нами получены новые данные, касающиеся стимуляции нативным и рекомбинантным ТБГ супрессивной функции MDSC. Эти результаты открывают возможности прицельного действия на функции миелоидных супрессоров с целью разработки и усовершенствования клеточных технологий в биомедицине.

## Список литературы / References

1. Раев М.Б. Способ выделения и очистки трофобластического  $\beta$ 1-гликопротеина. Патент РФ № 2367449. Опубликовано 20.09.2009, Бюл. № 26. [Rayev M.B. Method for isolation and purification of trophoblastic  $\beta$ 1-glycoprotein. RF Patent. 2009;2367449(Bull): 26.]
2. Bian Z., Abdelaal A.M., Shi L., Liang H., Xiong L., Kidder K., Venkataramani M., Culpepper C., Zen K., Liu Y. Arginase-1 is neither constitutively expressed in nor required for myeloid-derived suppressor cell-mediated inhibition of T-cell proliferation. *Eur. J. Immunol.*, 2018, Vol. 48, no. 6, pp. 1046-1058.
3. Blois S.M., Sulkowski G., Tirado-Gonzalez I., Warren J., Freitag N., Klapp B.F., Rifkin D., Fuss I., Strober W., Dveksler G.S. Pregnancy-specific glycoprotein 1 (PSG1) activates TGF-beta and prevents dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice. *Mucosal Immunol.*, 2014, Vol. 7, pp. 3448-3458.
4. Bozkus C.C., Elzey B.D., Crist S.A., Ellies L.G., Ratliff T.L. Expression of cationic amino acid transporter 2 is required for myeloid-derived suppressor cell-mediated control of T cell immunity. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, pp. 5237-5250.
5. Fallarino F., Grohmann U., Vacca C., Bianchi R., Orabona C., Spreca A., Fioretti M.C., Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.*, 2002, Vol. 9, no. 10, pp. 1069-1077.
6. Lin T.M., Halbert S.P., Spellacy W.N. Measurement of pregnancy associated plasma proteins during human gestation. *J. Clin. Invest.*, 1974, Vol. 54, no. 3, pp. 576-582.
7. Mbongue J.C., Nicholas D.A., Torrez T.W., Kim N.-S., Fire A.F., Langridge W.H.R. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in immune suppression and autoimmunity. *Vaccines*, 2015, Vol. 3, no. 3, pp. 703-729.
8. Munder M., Mollinedo F., Calafat J., Canchado J., Gil-Lamaignere C., Fuentes J.M., Luckner C., Doschko G., Soler G., Eichmann K., Müller F.M., Ho A.D., Goerner M., Modolell M. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 6, pp. 2549-2556.
9. Pallotta M.T., Orabona C., Volpi C., Vacca C., Belladonna M.L., Bianchi R., Servillo G., Brunacci C., Calvitti M., Biccato S., Mazza E.M., Boon L., Grassi F., Fioretti M.C., Fallarino F., Puccetti P., Grohmann U. Indoleamine 2, 3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 9, pp. 870-878.
10. Timganova V.P., Bochkova M.S., Rayev M.B., Khramtsov P.V., Zamorina S.A. Immunoregulatory potential of pregnancy-specific  $\beta$ 1-glycoprotein. *Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 455-468.
11. Timganova V.P., Litvinova L.S., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Raev M.B., Zamorina S.A. Effect of pregnancy specific  $\beta$ 1-glycoprotein on the replicative potential of naïve T cells and immune memory T cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2021, Vol. 172, no. 2, pp. 169-174.
12. Veglia F., Sanseviero E., Gabrilovich D.I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021, Vol., no. 21, pp. 485-498.
13. Yu J., Wang Y., Yan F., Zhang P., Li H., Zhao H., Yan C., Yan F., Ren X. Noncanonical NF- $\kappa$ B activation mediates STAT3-stimulated IDO upregulation in myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 5, pp. 2574-2586.
14. Zamorina S.A., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Rayev M.B. Effect of pregnancy-specific  $\beta$ 1-glycoprotein on indoleamine-2,3-dioxygenase activity in human monocytes. *Dokl. Biol. Sci.*, 2016, Vol. 469, no. 1, pp. 206-208.
15. Zea A.H., Rodriguez P.C., Culotta K.S., Hernandez C.P., DeSalvo J., Ochoa J.B., Park H.J., Zabaleta J., Ochoa A.C. L-Arginine modulates CD3zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes. *Cell Immunol.*, 2004, Vol. 232, no. 1-2, pp. 21-31.

### Авторы:

**Тимганова В.П.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

**Шардина К.Ю.** — инженер-исследователь лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

**Гутина Е.В.** — инженер лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

### Authors:

**Timganova V.P.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Shardina K. Yu.**, Research Engineer, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Gutina E.V.**, Research Engineer, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 15.05.2023  
Принята к печати 29.06.2023

Received 15.05.2023  
Accepted 29.06.2023

## **ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА АПОПТОЗ Т-ЛИМФОЦИТОВ И КЛЕТОК ЛИНИИ JURKAT**

**Усанина Д.И.<sup>1,2</sup>, Ужвиюк С.В.<sup>1</sup>, Заморина С.А.<sup>1,2</sup>**

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

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Резюме.** Графен и его производные – материалы с уникальными физико-химическими свойствами, углубленное изучение которых позволяет рассматривать их в качестве перспективных биомедицинских агентов для адресной доставки лекарств и генов, фототермической терапии раковых заболеваний, биовизуализации и пр. Однако для этого требуется комплексное изучение влияния наноматериалов на организм, в том числе на клетки иммунной системы.

Цель нашего исследования – изучение влияния пегилированных наночастиц оксида графена (ОГ) на апоптоз Т-лимфоцитов из крови здоровых доноров, а также клеток иммортализованной Т-клеточной линии Jurkat 5332. Сравнение полученных данных позволит углубить наше понимание биосовместимости наноматериалов, а также ответит на вопрос, насколько результаты, полученные с использованием клеточных линий, справедливы для аналогичных клеток здорового организма.

В работе мы использовали наночастицы ОГ разных размеров (100-200 нм, 1-5 мкм), функционализированные линейным и разветвленным полиэтиленгликолем (ПЭГ). Клетки культивировали в течение суток при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub> с наночастицами в концентрациях 5 и 25 мкг/мл, после чего оценивали жизнеспособность, а также ранний и поздний апоптоз клеток линии Jurkat и CD3<sup>+</sup> клеток здоровых доноров методом проточной цитометрии.

При изучении влияния наночастиц ОГ на Т-клетки здоровых доноров было установлено, что наночастицы малой размерности, покрытые линейным ПЭГ, в высокой концентрации (25 мкг/мл) способны достоверно понижать число живых клеток, а также увеличивать число клеток в состоянии позднего апоптоза. В то же время наночастицы большой размерности, покрытые разветвленным ПЭГ, в высокой концентрации (25 мкг/мл), увеличивали число Т-клеток, находящихся в раннем апоптозе.

Установлено, что наночастицы ОГ в исследуемых концентрациях не оказывали влияния на жизнеспособность, а также показатели апоптоза клеток линии Jurkat вне зависимости от размеров, концентрации и типа поверхностной функционализации частиц.

Полученные данные свидетельствуют о том, что наночастицы ОГ оказывают различные эффекты на здоровые и раковые Т-лимфоциты. Можно предположить, что подобные несоответствия могут быть объяснены большей устойчивостью опухолевых клеток в сравнении со здоровыми. Из этого можно сделать вывод о том, что при изучении воздействия наноматериалов на клетки нельзя ограничиваться экспериментами на клеточных линиях, так как их характеристики могут значительно отличаться от таковых у здоровых клеток.

**Ключевые слова:** наночастицы оксида графена, Т-лимфоциты, апоптоз, Jurkat

---

### **Адрес для переписки:**

Усанина Дарья Игоревна  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения Российской академии наук  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (342) 280-77-94.  
E-mail: usanina\_d@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Darya I. Usanina  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms  
13 Golev St  
Perm  
614081 Russian Federation  
Phone: +7 (342) 280-77-94.  
E-mail: usanina\_d@mail.ru

---

### **Образец цитирования:**

Д.И. Усанина, С.В. Ужвиюк, С.А. Заморина  
«Влияние наночастиц оксида графена на апоптоз  
Т-лимфоцитов и клеток линии Jurkat» // Российский  
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 409-414.  
doi: 10.46235/1028-7221-9635-EOG

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

### **For citation:**

D.I. Usanina, S.V. Uzhviyuk, S.A. Zamorina “Effect  
of graphene oxide nanoparticles on apoptosis of T lymphocytes  
and Jurkat cells”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 409-414.  
doi: 10.46235/1028-7221-9635-EOG

© Usanina D.I. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

**DOI:** 10.46235/1028-7221-9635-EOG

# EFFECT OF GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON APOPTOSIS OF T LYMPHOCYTES AND JURKAT CELLS

Usanina D.I.<sup>a, b</sup>, Uzhviyuk S.V.<sup>a</sup>, Zamorina S.A.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – Branch of Perm Federal Research Center, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm State University, Perm, Russian Federation

**Abstract.** Graphene and its derivatives are materials with unique physicochemical properties. A detailed study of these materials allows to consider them prospective biomedical agents for targeted drug and gene delivery, photothermal therapy of cancer, bioimaging, etc. However, this requires a comprehensive studies of their effects on the body tissues, including cells of the immune system.

The aim of our research was to study the effects of nanoparticles based on pegylated graphene oxide (GO) upon apoptosis of T lymphocytes derived from blood of healthy donors and Jurkat 5332 cell line. Comparison of these cells will extend our knowledge of the effects of nanomaterials on the cells, and to respond the question, what results obtained with continuous cell lines are valid for normal non-malignant cells. In this work, we used GO nanoparticles (100–200 nm, 1–5 μm) coated with linear (LP-GO) and branched (BP-GO) polyethylene glycol (PEG). The cells were cultured for 24 hours at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> with nanoparticles at concentrations of 5 and 25 μg/mL. Viability and early and late apoptosis of incubated Jurkat cells and CD3<sup>+</sup> cells from healthy donors were assessed by flow cytometry. It was found that the small nanoparticles coated with linear PEG at high concentrations (25 μg/mL) could significantly reduce the number of live cells and increase the number of cells in late apoptosis. At the same time, large nanoparticles coated with branched PEG at high concentrations (25 μg/mL) increased the percentage of T cells in early apoptosis.

Meanwhile, the GO nanoparticles at both concentrations did not affect the viability and apoptosis of Jurkat cells, regardless of the size, concentration, and type of surface function of the particles.

The obtained results suggest that GO nanoparticles exert different effects upon normal and malignant lymphocytes of T lineage. One may assume that these discrepancies could be explained by greater resistance of tumor cells compared to normal T cells. These findings suggests that studies of nanomaterials upon living cells should not be limited to experiments on cell lines, since their properties may significantly differ from those of non-malignant cells.

*Keywords:* graphene oxide, nanoparticles, T lymphocytes, apoptosis, Jurkat

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

## Введение

Биомедицинские и фармацевтические исследования не теряют своей актуальности. Одно из перспективных направлений в данной области — наноматериалы. В последние десятилетия тема наноматериалов активно развивается благодаря их уникальным физико-химическим свойствам, возможностям направленной модификации и многофункциональности. Наноматериалы могут быть использованы для адресной доставки лекарств и генов, фототермической терапии раковых заболеваний, биовизуализации и пр. [10].

Наноматериалы на основе углерода включают в себя углеродные нанотрубки, фуллерены, нанолампы, графен и его производные. Преимуществами углеродных материалов являются обширные возможности модификации, малые размеры, большая удельная площадь поверхности, высокая тепло- и электропроводность, уникальные оптические и механические свойства. Углубленное изучение этих материалов позволяет рассматривать их в качестве перспективных биомедицинских агентов, однако требует тщательного

исследования их влияния на различные клетки организма [8, 12].

В настоящее время активно изучается биосовместимость графена и его производных. Актуальным является исследование взаимодействия графена с клетками иммунной системы, так как именно они будут первыми контактировать с наноматериалом в случае его биомедицинского применения. В литературе можно найти как отдельные исследования по этой теме, так и комплексные обзоры, охватывающие большое число клеточных популяций [3]. Стоит отметить, что наноматериалы обычно покрывают биосовместимыми полимерами, снижающими их цитотоксичность, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В качестве модели для изучения биосовместимости материалов часто используют линии раковых клеток, так как это облегчает проведение экспериментов и позволяет избавиться от процедур изоляции клеток. Однако, ввиду большей устойчивости раковых клеток, остается спорным вопрос о возможности экстраполяции данных, полученных в ходе подобных экспериментов, на неизменные клетки.

Мы поставили перед собой цель выяснить, оказывают ли наночастицы оксида графена влияние на жизнеспособность и апоптоз

Т-лимфоцитов из крови здоровых людей, а также линию раковых лимфоцитов. Полученные данные позволяют расширить наше понимание взаимодействия наноматериалов с живыми системами, а также сделать выводы о достоверности данных, полученных лишь при использовании иммортализованных линий клеток.

## Материалы и методы

Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., на используемую экспериментальную схему получено разрешение Этического комитета «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» (IRB00010009) от 30.08.2019. От каждого донора было получено информированное согласие.

В работе использовали наночастицы оксида графена размерами 100-200 нм (маленькие, «м»), и 1-5 мкм (большие, «б») (Ossila Ltd, Великобритания). Функционализированные наночастицы были получены в рамках проекта РФФИ № 19-15-00244 (рук. Заморина С.А.). Процедуры модификации наночастиц осуществлялись в ИТХ УрО РАН к.х.н. Нечаевым А.И.

Модификация наночастиц оксида графена линейным (П-ОГ) и разветвленным (рП-ОГ) полиэтиленгликолем осуществлялась методом ковалентной пришивки аминогрупп к карбоксильным группам на поверхности оксида графена через образование амидной связи [5]. Покрытие наночастиц разветвленным ПЭГ по сравнению с линейным улучшает их коллоидную стабильность в растворах. Модификацию структуры и состава оксида графена полиэтиленгликолем подтверждали при помощи УФ- и ИК-Фурье спектроскопии. Определение степени покрытия наночастиц полиэтиленгликолем проводили методом термogravиметрического анализа. Характеристика наночастиц и процедуры функционализации ОГ была представлена нами ранее [7].

Для сравнения эффектов, оказываемых оксидом графена на здоровые, и раковые клетки, мы использовали лимфоциты, полученные из крови условно здоровых доноров ( $n = 5$ ), а также клетки иммортализованной Т-клеточной линии Jurkat 5332 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург) ( $n = 5$ ).

Лейкоциты выделяли из крови методом спонтанной седиментации в течение 40 минут при 37 °С, после чего культивировали в полной культуральной среде (ССМ, RPMI (Sigma) с добавлением 1% пенициллина-стрептомицина-амфотерицина (ВИ), 10% объединенной человеческой сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 10 мМ HEPES. Клетки линии Jurkat 5332 культивировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глутамин, 100 Ед пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина, 2,5 мкг/мл амфотерицина В и

10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки.

Клетки культивировали в 96-луночных планшетах в концентрации 1 млн клеток/мл. Клетки культивировали во влажной атмосфере в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub> в течение суток. Так как число доноров для получения мононуклеарных клеток составляло 5, с клетками Jurkat также проводили серию из пяти экспериментов. Наночастицы П-ОГ и рП-ОГ вносили до конечных концентраций 5 и 25 мкг/мл. Контролем служили лунки без добавления наночастиц.

Для определения жизнеспособности клеток после культивирования в присутствии наночастиц оксида графена использовали краситель Zombie aqua (ZA) (Invitrogen, США). Для оценки числа апоптозирующих клеток использовали Annexin V FITC (BioLegend, США). Оценивали ранний (ZA-AnnV<sup>+</sup>) и поздний апоптоз/некроз (ZA<sup>+</sup>AnnV<sup>+</sup>) клеток. Лейкоциты из крови доноров также окрашивали антителами к CD3-PB (Miltenyi Biotec, США) и оценивали апоптоз в субпопуляции CD3<sup>+</sup> (Т-клетки). Окрашенные образцы анализировали с использованием проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Порог между позитивными (окрашенными) и негативными субпопуляциями клеток определяли с использованием неокрашенных проб, а также контролей флуоресценции минус один (FMO). Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программы CytExpert (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8.0.1. Для оценки использовали тест Фридмана и post-hoc тест Данна для множественных сравнений. Результаты представляли в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей – Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Уровень значимости принимали за 0,05.

## Результаты и обсуждение

При изучении влияния пегилированных наночастиц оксида графена установлено, что в исследуемых концентрациях они не оказывают влияния на жизнеспособность клеток линии Jurkat вне зависимости от типа поверхностной функционализации (рис. 1). Средние значения жизнеспособности клеток в культурах с добавлением графена колебались в пределах 96,97-97,47% (контроль – 97,18%) Однако частицы малых размеров, функционализированные линейным полиэтиленгликолем, в концентрации 25 мкг/мл достоверно понижали жизнеспособность Т-лимфоцитов здоровых доноров (рис. 1).

Эти же наночастицы (П-ОГм, 25 мкг/мл) повышали число клеток в состоянии позднего апоптоза (рис. 2). В то же время в отношении раннего апоптоза зафиксирован стимулирующий эффект другого типа наночастиц – больших, функционализированных разветвленным полиэтиленгликолем (рП-ОГб, 25 мкг/мл) (рис. 2).

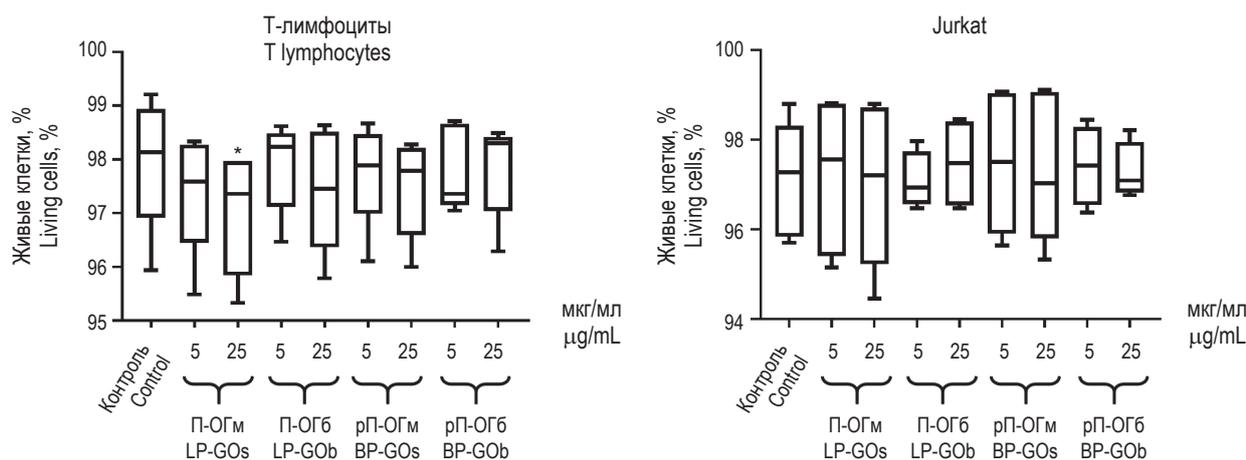
В отношении клеток линии Jurkat не установлено достоверных различий в числе клеток в состоянии раннего и позднего апоптоза в присутствии наночастиц оксида графена (рис. 2).

Ранее нами было установлено, что наночастицы пегилированного оксида графена вызывают снижение прироста клеточной массы Т-лимфоцитов линии Jurkat [1]. При этом статистический анализ не выявил достоверного снижения жизнеспособности клеток, что согласуется с данными текущего исследования. Исходя из полученной информации, можно сделать вывод о том, что пегилированный оксид графена в концентрации 5–25 мкг/мл затрудняет лишь пролиферацию клеток данной линии, не вызывая их гибели.

Проведенные ранее исследования свидетельствуют также о снижении клеточной массы мононуклеарных клеток периферической крови человека при суточной инкубации с оксидом графена [2]. Наиболее выраженный подавляющий эффект наблюдался у частиц, покрытых разветвленным ПЭГом, которые также вызвали образование клеточных агрегатов; а в текущей работе такие частицы повышали число клеток в состоянии раннего апоптоза. Одновременно, не было отмечено влияния наночастиц ОГ на жизнеспособность мононуклеарных клеток [2]. В настоящей работе наночастицы вызвали достоверное снижение процента живых CD3<sup>+</sup> клеток, однако нельзя игнорировать тот факт, что в целом, показатели жизнеспособности остаются довольно высокими. Кроме того, CD3<sup>+</sup> клетки составляют 45–70% от всех мононуклеаров крови, и изменения количества живых клеток в этой субпопуляции могли быть не детектируемы в предыдущем исследовании.

Известно, что присутствие наночастиц оксида графена может вызывать гибель клеток, однако оказываемые эффекты находятся в зависимости от размеров и концентрации частиц, а также типа поверхностной функционализации [11]. Например, в отношении Т-клеток известно, что ОГ без поверхностной модификации, а также ОГ-СООН, обладают хорошей биосовместимостью в концентрациях до 25 мкг/мл, в то время как покрытые полиэтиленамином частицы токсичны уже в концентрации 1,6 мкг/мл [5]. При этом в большей степени апоптозу подвержены активированные Т-лимфоциты [9]. Так, в исследованиях Ding с соавт. [5] в состоянии позднего апоптоза находилось до 67,4% клеток из культуры Т-лимфоцитов после суточной инкубации с ОГ. В нашем исследовании Т-клетки не подвергались предварительной активации, что объясняет гораздо меньшую выраженность цитотоксических эффектов графена. Кроме того, при покрытии частиц полиэтиленгликолем, как и в нашем случае, также обнаруживается снижение апоптоза клеток [11].

Для оценки биосовместимости материалов, в том числе графена, зачастую используют линии раковых клеток [4, 6]. В большинстве случаев, как и в нашем исследовании, отмечается, что жизнеспособность раковых клеток снижается в меньшей степени, чем у нормальных. Это может быть объяснено тем, что линии раковых клеток более устойчивы к повреждениям или метаболическим нарушениям. Наше исследование подтверждает, что использование клеточных линий не может полностью заменить эксперименты со здоровыми клетками, а к полученным данным следует относиться с осторожностью: иммортализованные клетки не отображают процессы, происходящие

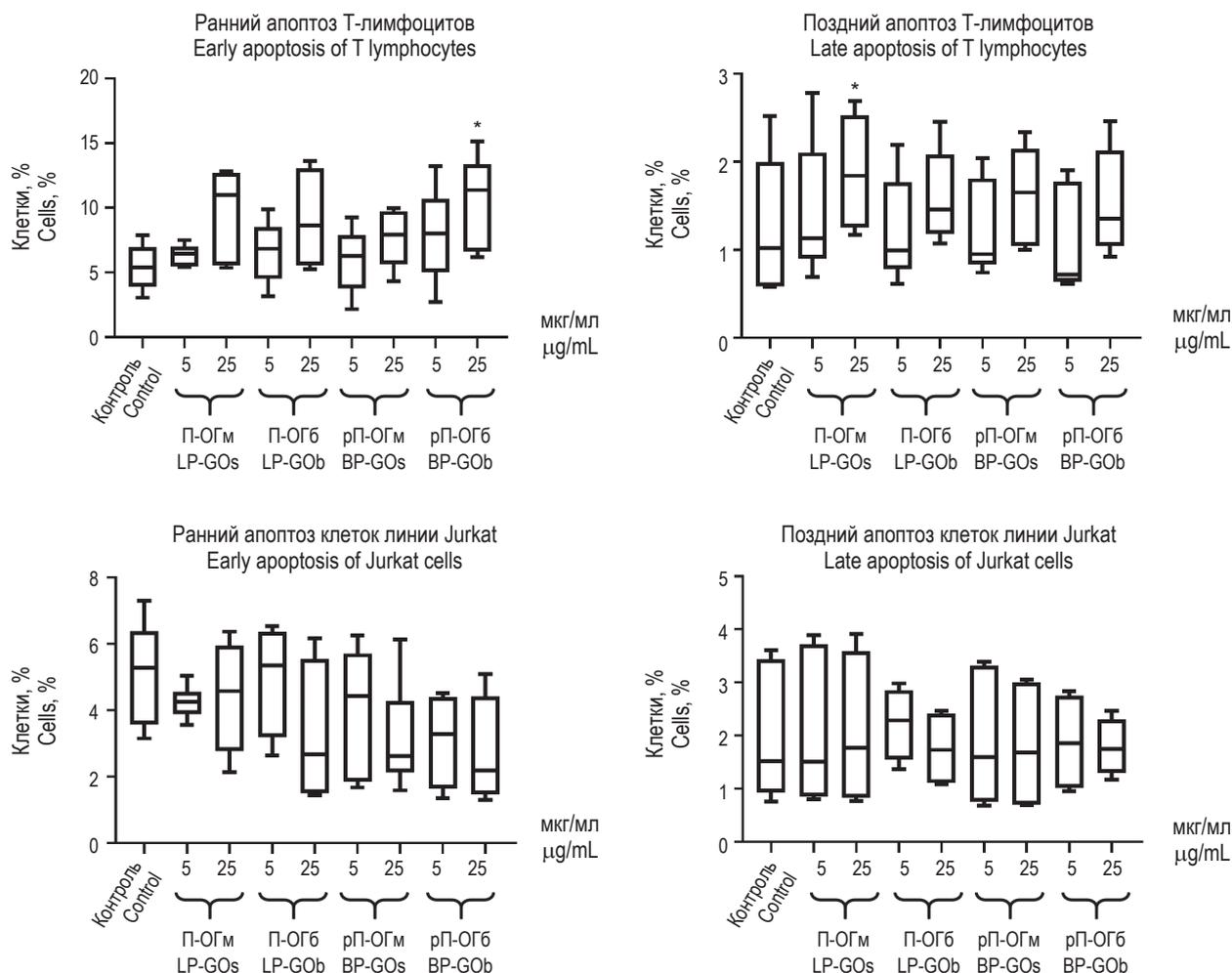


**Рисунок 1.** Влияние оксида графена на жизнеспособность Т-лимфоцитов из крови здоровых доноров и клеток линии Jurkat

**Примечание.** По оси X обозначены тип и концентрация наночастиц оксида графена, по оси Y – процент живых клеток (ZA). Контроль – культуры без добавления графена. Звездочкой обозначены значения  $p < 0,05$ .

Figure 1. Effect of graphene oxide on the viability of T lymphocytes from the blood of healthy donors and Jurkat cells

Note. The x-axis indicates the type and concentration of nanoparticles; the y-axis is the percentage of living cells (ZA). Control, culture without GO. Significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated (\*).



**Рисунок 2. Влияние оксида графена на ранний и поздний апоптоз Т-лимфоцитов и клеток линии Jurkat**

**Примечание.** По оси X обозначены тип и концентрация наночастиц оксида графена, по оси Y – процент клеток в состоянии раннего и позднего апоптоза соответственно. Контроль – культуры без добавления графена. Звездочкой обозначены значения  $p < 0,05$ .

Figure 2. Effect of graphene oxide on early and late apoptosis of T lymphocytes and Jurkat cells

Note. The x-axis indicates the type and concentration of nanoparticles; the y-axis is the percentage of cells in the state of early and late apoptosis, respectively. Control, culture without GO. Significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated (\*).

при взаимодействии наноматериала со здоровыми клетками.

## Выводы

Показано, что наночастицы оксида графена в концентрации 25 мкг/мл способны вызывать апоптоз Т-клеток, а также снижать их жизнеспособность. Оказываемые эффекты определяются типом поверхностной функционализации и раз-

мером частиц. В то же время наночастицы ОГ не оказывали цитотоксического влияния на изучаемые параметры клеток линии Jurkat.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что наночастицы ОГ по-разному влияют на Т-лимфоциты и клетки линии Jurkat, из-за чего данные, полученные при использовании клеточной линии, нельзя экстраполировать на здоровые клетки.

## Список литературы / References

1. Заморина С.А., Храмов П.В., Раев М.Б., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Нечаев А.И., Шунькин Е.О., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Литвинова Л.С. Взаимодействие наночастиц оксида графена с клетками линии Jurkat в системе Cell-IQ // Доклады российской академии наук. Науки о жизни, 2021. Т. 501. С. 78-84. [Zamorina S.A., Khramtsov P.V., Rayev M.B., Timganova V.P., Bochkova M.S., Nechaev A.I., Shunkin E.O., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Litvinova L.S. Graphene oxide nanoparticles interaction with Jurkat cell line in Cell-IQ system. *Doklady rossiyskoy akademii nauk. Nauki o zhizni = Reports of the Russian Academy of Sciences. Life Sciences*, 2021, Vol. 501, pp. 78-84. (In Russ.)]

2. Ужвиюк С.В., Храмов П.В., Раев М.Б., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Литвинова Л.С., Заморина С.А. Взаимодействие наночастиц оксида графена с мононуклеарными клетками человека в системе Cell-IQ // Клеточные технологии в биологии и медицине, 2023. № 1. [Uzhviyuk S.V., Khramtsov P.V., Rayev M.B., Timganova V.P., Bochkova M.S., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Litvinova L.S., Zamorina S.A. Graphene oxide nanoparticles interaction with human mononuclear cells in Cell-IQ system. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine = Cellular Technologies in Biology and Medicine*, 2023, Vol. 1. (In Russ.)]
3. Храмов П.В., Раев М.Б., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Заморина С.А. Взаимодействие наночастиц оксида графена с клетками иммунной системы // Гены и клетки, 2020. Т. 15, № 3. С. 29-38. [Khramtsov P.V., Rayev M.B., Timganova V.P., Bochkova M.S., Zamorina S.A. Interaction of graphene oxide nanoparticles with cells of the immune system. *Geny i kletki = Genes and Cells*, 2020, Vol. 15, pp. 29-38. (In Russ.)]
4. Cai X., Tan S., Yu A., Zhang J., Liu J., Mai W., Jiang Z. Sodium 1-naphthalenesulfonate-functionalized reduced graphene oxide stabilizes silver nanoparticles with lower cytotoxicity and long-term antibacterial activity. *Chem. Asian J.*, 2012, Vol. 7, no. 7, pp. 1664-1670.
5. Ding Z., Zhang Z., Ma H., Chen Y. *In vitro* hemocompatibility and toxic mechanism of graphene oxide on human peripheral blood T lymphocytes and serum albumin. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, Vol. 6, no. 22, pp. 19797-19807.
6. Hong B.J., Compton O.C., An Z., Eryazici I., Nguyen S.T. Successful Stabilization of Graphene Oxide in Electrolyte Solutions: Enhancement of biofunctionalization and cellular uptake. *ACS Nano*, 2012, Vol. 6, no. 1, pp. 63-73.
7. Khramtsov P., Bochkova M., Timganova V., Nechaev A., Uzhviyuk S., Shardina K., Maslennikova I., Rayev M., Zamorina S. Interaction of graphene oxide modified with linear and branched PEG with monocytes isolated from human blood. *Nanomaterials*, 2022, Vol. 12, no. 1, 126. doi: 10.3390/nano12010126.
8. Kiew S.F., Kiew L.V., Lee H.B., Imae T., Chung L.Y. Assessing biocompatibility of graphene oxide-based nanocarriers: A review. *J. Control. Release*, 2016, Vol. 226, pp. 217-228.
9. Lenardo M., Chan K.M., Hornung F., McFarland H., Siegel R., Wang J., Zheng L. Mature T lymphocyte apoptosis – immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev. Immunol.*, 1999, Vol. 17, pp. 221-253.
10. Liao C., Li Y., Tjong S.C. Graphene nanomaterials: synthesis, biocompatibility, and cytotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 11, 3564. doi:10.3390/ijms19113564.
11. Ou L., Lin S., Song B., Liu J., Lai R., Shao L. The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. *Int. J. Nanomedicine*, 2017, Vol. 12, pp. 6633-6646.
12. Rhazouani A., Gamrani H., El Achaby M., Aziz K., Gebrati L., Uddin M.S., Aziz F. Synthesis and toxicity of graphene oxide nanoparticles: a literature review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Biomed Res Int.*, 2021, Vol. 2021, 5518999. doi: 10.1155/2021/5518999.

**Авторы:**

**Усанина Д.И.** – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; магистр кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Ужвиюк С.В.** – инженер лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь Россия

**Заморина С.А.** – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Authors:**

**Usanina D.I.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – Branch of Perm Federal Research Center; Master Student, Department of Microbiology and Immunology, Perm State University, Perm, Russian Federation

**Uzhviyuk S.V.**, Engineer, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – Branch of Perm Federal Research Center, Perm, Russian Federation

**Zamorina S.A.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – Branch of Perm Federal Research Center; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biology, Perm State University, Perm, Russian Federation

## **АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ PD1 НА CD3<sup>+</sup> ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ КРЫСЫ, СТИМУЛИРОВАННЫХ АНТИТЕЛАМИ К CD3, МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

**Храмова Т.В., Бедулева Л.В., Фомина К.В., Абишева Н.Н.**

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия

ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

**Резюме.** Исследование PD-1/PD-L сигнального пути в регуляции иммунного ответа является фокусом исследований в настоящее время. Показана ключевая роль PD-1 молекулы в регуляции ауто-иммунных, противоопухолевых и противовирусных реакций. Культура лимфоцитов крыс и мышей, а также экспериментальные модели иммунопатологий на животных широко используются в исследованиях. Однако лимфоциты крыс почти не используют для изучения PD-1/PD-L пути. Нет данных об экспрессии PD-1 или ее индукции в лимфоцитах крыс. В культуре Т-лимфоцитов человека экспрессию PD-1 можно индуцировать с помощью сорбированных в лунках планшета антител к CD3 клона N1B1412. В настоящем исследовании мы выясняли влияние антител к CD3 крысы клона G4.18 на экспрессию PD-1 в культуре лимфоцитов периферической крови интактных крыс Wistar. По некоторым данным литературы, антитела к CD3 клона G4.18 в иммобилизованном виде могут активировать изолированные Т-клетки крыс, а по другим, ингибируют аллогенные реакции в смешанной культуре лимфоцитов, блокируют цитотоксичность клеток, полученных от крыс с развившейся реакцией отторжения трансплантата. Мы обнаружили, что инкубация лимфоцитов крови крыс с иммобилизованными на пластике антителами к CD3 клона G4.18 приводит к изменению морфологии клеток и индукции PD-1 на CD3<sup>+</sup> лимфоцитах. После инкубации с антителами к CD3 доля PD-1<sup>+</sup> лимфоцитов среди CD3<sup>+</sup> лимфоцитов составила 12,05±6,04%, что достоверно больше, чем доли таких клеток до инкубации и при инкубации в питательной среде, составившие 2,60±2,62% и 4,59±5,81% соответственно. На графиках дот-плот, показывающих распределение клеток по параметрам прямого и бокового светорассеяния, PD-1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> лимфоциты, индуцированные антителами к CD3, локализованы в области относительно меньшей величины прямого светорассеяния и большей величины бокового светорассеяния. Возможно, данные клетки относятся к клеткам, вступившим в апоптоз.

*Ключевые слова:* индукция PD-1, антитела к CD3, Т-лимфоциты, проточная цитометрия

### **Адрес для переписки:**

Храмова Татьяна Владимировна  
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный  
университет»  
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1.  
Тел.: 8 (909) 058-32-07.  
E-mail: khratat@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Tatyana V. Khratova  
Udmurt State University  
1 Universitetskaya St  
Izhevsk  
426034 Russian Federation  
Phone: +7 (909) 058-32-07.  
E-mail: khratat@mail.ru

### **Образец цитирования:**

Т.В. Храмова, Л.В. Бедулева, К.В. Фомина, Н.Н. Абишева «Анализ экспрессии PD1 на CD3<sup>+</sup> лимфоцитах крови крысы, стимулированных антителами к CD3, методом проточной цитометрии» // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 415-420.  
doi: 10.46235/1028-7221-9639-FCA

© Храмова Т.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

T.V. Khratova, L.V. Beduleva, K.V. Fomina, N.N. Abisheva "Flow cytometry analysis of PD1 expression on rat blood CD3<sup>+</sup> lymphocytes stimulated by CD3 antibodies", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 415-420.  
doi: 10.46235/1028-7221-9639-FCA

© Khratova T.V. et al., 2023

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

DOI: 10.46235/1028-7221-9639-FCA

# FLOW CYTOMETRY ANALYSIS OF PD1 EXPRESSION ON RAT BLOOD CD3<sup>+</sup> LYMPHOCYTES STIMULATED BY CD3 ANTIBODIES

Khramova T.V., Beduleva L.V., Fomina K.V., Abisheva N.N.

Udmurt State University, Izhevsk, Russian Federation

Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

**Abstract.** The role of PD-1/PD-L signaling pathway in the regulation of the immune response is currently in the focus of research. Numerous studies have shown the key role of PD-1 molecules in regulation of autoimmune, antitumor and antiviral responses. The culture of rat and mice lymphocytes, as well as animal experimental models of immunopathologies are widely used in research. However, rat lymphocytes are infrequently used for studying the PD-1/PD-L pathway. There are no data on PD-1 expression or methods of its induction in rat lymphocytes. In human T lymphocyte culture, PD-1 expression can be induced by NIB1412 anti-CD3 antibodies immobilized onto the wells of culture plates. In this study, we investigated the effect of G4.18 anti-CD3 antibody on the *in vitro* PD-1 expression by peripheral blood lymphocyte of intact Wistar rats. According to some literature data, the immobilized G4.18 anti-CD3 antibodies may activate isolated rat T cells, and, as elsewhere reported, inhibit allogeneic reactions in mixed lymphocyte culture and block cytotoxicity of cells obtained from the rats with a developed graft rejection response. We have found that incubation of rat blood lymphocytes with G4.18 anti-CD3 antibodies immobilized on plastic is associated with changes in cell morphology and induction of PD-1 on CD3<sup>+</sup> lymphocytes. After incubation with anti-CD3 antibodies, the proportion of PD-1<sup>+</sup> lymphocytes among CD3<sup>+</sup> lymphocytes was 12.05±6.04%, thus being significantly higher than the proportion of such cells before incubation and during incubation in a cultural medium, which amounted to 2.60±2.62% and 4.59±5.81%, respectively. In the dot-plot graphs showing the cell distribution by the parameters of forward- and side-scatter, the PD-1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> lymphocytes induced by anti-CD3 antibodies are localized in the area of relatively low forward scatter and great side scatter. Hence, these cells may represent apoptotic cells.

**Keywords:** PD-1 induction, anti-CD3 antibodies, T lymphocytes, flow cytometry

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0827-2020-0012).

## Введение

PD-1 – молекула запрограммированной гибели 1 – экспрессируется Т-лимфоцитами во время активации и действует как естественный тормоз для сдерживания гиперактивации Т-лимфоцитов [6]. Ингибирующий рецептор PD-1 был назван «иммунным контрольным пунктом» в связи с его ролью в качестве привратника иммунных реакций [4]. В сигнальном пути PD-1 было обнаружено два лиганда: PD-L1 и PD-L2. Взаимодействие PD-1 с PD-L1 и PD-L2 вызывает функциональное истощение Т-клеток за счет ослабления пролиферации Т-клеток, продукции цитокинов и снижения выживаемости

Т-клеток [1]. Считается, что через путь PD-1 осуществляется негативная регуляция иммунной системы, поддерживающая периферическую толерантность и защищающая ткани от аутоиммунной атаки [2]. PD-L1, экспрессируемые на опухолевых клетках, взаимодействуют с PD-1 на атакующих их Т-клетках, что предотвращает их активацию и способствует индукции иммунной толерантности к опухоли [1].

Роль PD1/PD-L пути в функционировании Т-лимфоцитов человека исследуют в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Известно, что индуцировать экспрессию PD-1 в Т-лимфоцитах человека *in vitro* можно стимуляцией антителами к CD3 и антителами к CD28 [5]. Так, Thaventhiran и соавт. показали, что инкубация изолированных CD4<sup>+</sup>Т-клеток памяти человека в присутствии иммобилизованных в лунках планшета антител клона NIB1412, специфичных к эпсилон субъе-

динице CD3 человека, приводит к повышению числа PD-1 экспрессирующих клеток уже в первый день инкубации с максимумом на третий день [7].

В ряде случаев работа с использованием материалов человека ограничена, тогда исследования проводят на лабораторных животных. Мало известно об экспрессии PD-1 у крыс и возможности индукции экспрессии PD-1 *in vitro* и *in vivo*. Для индукции PD-1 на лимфоцитах крыс в настоящем исследовании мы апробировали антитела к CD3 клона G4.18. Показано, что данные антитела вызывают ингибирование аллогенных реакций в смешанной культуре лимфоцитов, блокируют цитотоксичность клеток, полученных от крыс с развившейся реакцией отторжения трансплантата [3]. В *in vivo* экспериментах показано, что терапия крыс антителами клона G4.18 индуцирует долгосрочную специфическую толерантность к аллотрансплантату органа [3], и способствует снижению тяжести и ускорению выздоровления от экспериментального аллергического энцефаломиелита путем блокирования функций эффекторных Th1-клеток [8]. Возможно, иммуносупрессивный эффект антител к CD3 клона G4.18 опосредован через сигнальный PD-1/PD-L путь. Однако вызывают ли антитела к CD3 клона G4.18 индукцию экспрессии PD-1 на лимфоцитах не известно.

**Цель работы** – исследовать влияние антител к CD3 клона G4.18 на экспрессию PD-1 на T-лимфоцитах *in vitro* у крыс Wistar.

## Материалы и методы

Лимфоциты выделяли из свежей крови 13 интактных крыс Wistar (Питомник лабораторных животных «Рапполово») центрифугированием в растворе фикола, 400g, 30 минут. 1 млн лимфоцитов крови крыс в 1 мл полной питательной среды (ППС), содержащей среду RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), 50 Ед/мл пенициллина («ПанЭко», Россия), 0,05 мг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) культивировали 2,5 суток при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> в 24-луночном планшете с предварительно засорбированными на дне лунок антителами к CD3 клона G4.18 (Anti-Rat CD3 SAFIRE Purified, MBS696583, MyBioSource, США). Для сорбции антител, 500 мкл раствора антител в ЗФР с С = 5 мкг/мл инкубировали 2 часа при 37 °С, затем дважды отмывали ЗФР и один раз питательной средой RPMI-1640. После культивирования клетки извлекали из лу-

нок, центрифугировали и измеряли популяции клеток на проточном цитометре CytoFLEX Flow Cytometer Beckman Coulter (предоставлен Центром коллективного пользования приборами ФГБОУ ВО УдГУ) с использованием антител к CD3 крысы, меченных FITC, антител к PD-1 крысы, меченных APC (MyBioSource, США). Статистический анализ проводили с помощью ANOVA, GraphPad Prism 8.4.3. Отличия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Типичная картина распределения клеток по параметрам бокового и прямого светорассеяния, выявленная до культивирования, после 2,5 дней культивирования без антител и в присутствии антител к CD3 клона G4.18 представлена на рисунке 1 А-В (см. 2-ю стр. обложки). Область I по параметрам прямого и бокового светорассеяния соответствует интактным лимфоцитам крыс. Как видно на рисунке 1А (см. 2-ю стр. обложки), большая часть интактных лимфоцитов крови, изолированных на фиколле, локализуется в области I. После 2,5-дневного инкубирования клеток в питательной среде без антител к CD3 большая часть клеток остается в той же области I (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). Клетки, культивированные 2,5 дня в присутствии антител к CD3, локализируются в области II, т. е. характеризуются относительно большей величиной бокового светорассеяния и малой величиной прямого светорассеяния, что указывает на уменьшение размеров клеток и усложнение их внутренней структуры под действием антител к CD3 (рис. 1В, см. 2-ю стр. обложки; табл. 1).

Таким образом, стимуляция лимфоцитов крови крыс иммобилизованными на пластике антителами к CD3 клона G4.18 вызывает изменение их морфологии. Возможно, это связано с инициацией в этих клетках апоптоза, т. к. известно, что по мере развития апоптоза клетки уменьшаются в размерах.

Процент CD3<sup>+</sup> лимфоцитов от области I после инкубирования в ППС остается прежним, в то время как культивирование в присутствии антител к CD3 ведет к достоверному уменьшению процента CD3<sup>+</sup> лимфоцитов в области I и достоверному увеличению доли CD3<sup>+</sup> лимфоцитов от области II относительно исходного количества CD3<sup>+</sup> клеток в этой области, более значительно, чем увеличение доли CD3<sup>+</sup> лимфоцитов, ин-

**ТАБЛИЦА 1. ПРОЦЕНТНОЕ КОЛИЧЕСТВО ЛИМФОЦИТОВ И ИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ДО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ПОСЛЕ 2,5 ДНЕВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ПРИСУТСТВИИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ АНТИТЕЛ К CD3 КЛОНА G4.18 И БЕЗ НИХ, СРЕДНЕЕ  $\pm$  S D, n = 13**

TABLE 1. PERCENTAGE OF LYMPHOCYTES AND LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS BEFORE CULTIVATION AND AFTER 2.5 DAYS OF CULTIVATION IN THE PRESENCE OF IMMOBILIZED G4.18 ANTI-CD3 ANTIBODIES AND WITHOUT THEM, MEAN  $\pm$  SD, n = 13

% клеток Percentage of cells	Интактные лимфоциты Intact lymphocytes	Лимфоциты, инкубированные в ППС Lymphocytes incubated in a complete culture medium	Лимфоциты, инкубированные в присутствии антител к CD3 Lymphocytes incubated in the presence of anti-CD3 antibodies
Лимфоциты от области I Lymphocytes from gate I	47,60 $\pm$ 17,43	37,69 $\pm$ 15,63	9,48 $\pm$ 11,41**
Лимфоциты от области II Lymphocytes from gate II	7,37 $\pm$ 2,47	35,04 $\pm$ 8,44*	56,22 $\pm$ 12,45**
CD3 <sup>+</sup> лимфоциты от области I CD3 <sup>+</sup> lymphocytes from gate I	66,60 $\pm$ 7,86	69,99 $\pm$ 8,02	25,08 $\pm$ 19,63**
CD3 <sup>+</sup> лимфоциты от области II CD3 <sup>+</sup> lymphocytes from gate II	14,13 $\pm$ 10,03	44,99 $\pm$ 9,24*	23,04 $\pm$ 8,97**
PD-1 <sup>+</sup> лимфоциты среди CD3 лимфоцитов области I PD-1 <sup>+</sup> lymphocytes from CD3 lymphocytes of gate I	0,24 $\pm$ 0,19	0,32 $\pm$ 0,26	0,64 $\pm$ 0,76
PD-1 <sup>+</sup> лимфоциты среди CD3 лимфоцитов области II PD-1 <sup>+</sup> lymphocytes from CD3 lymphocytes of gate II	2,60 $\pm$ 2,62	4,59 $\pm$ 5,81	12,05 $\pm$ 6,04**

Примечание. \* – достоверно, по сравнению с данными интактных лимфоцитов ( $p < 0,01$ , ANOVA), \*\* – достоверно, по сравнению с данными двух других групп ( $p < 0,01$ , ANOVA).

Note. \*, significantly, compared with the data of intact lymphocytes ( $p < 0,01$ , ANOVA); \*\*, significantly, compared with the data of the other two groups ( $p < 0.01$ , ANOVA).

кубированных в ППС, доля которых в области II тоже достоверно увеличивается (табл. 1).

Исследование экспонирования PD-1 на мембране лимфоцитов показало, что в области I PD-1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> лимфоциты отсутствуют (табл. 1). PD-1<sup>+</sup> лимфоциты найдены в области II (табл. 1). В области II доля PD-1<sup>+</sup> лимфоцитов среди CD3<sup>+</sup> лимфоцитов достоверно выше в образцах лимфоцитов, инкубированных в присутствии антител к CD3, чем в образцах, инкубированных в ППС без антител (табл. 1; рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). Таким образом, антитела к CD3 кло-

на G4.18 индуцируют экспрессию PD1<sup>+</sup> в CD3<sup>+</sup> лимфоцитах и вызывают изменение их морфологии.

## Выводы

Культивирование лимфоцитов крови крыс Wistar в присутствии иммобилизованных в лунках планшета антител к CD3 клона G4.18 приводит к увеличению числа PD1<sup>+</sup> экспрессирующих клеток среди Т-лимфоцитов и изменению их морфологии.

## Список литературы / References

1. Chikuma S. Basics of PD-1 in self-tolerance, infection, and cancer immunity. *Int. J. Clin. Oncol.*, 2016, Vol. 21, no. 3, pp. 448-455.
2. Francisco L.M., Sage P.T., Sharpe A.H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.*, 2010, Vol. 236, pp. 219-242.
3. Nicolls M.R., Aversa G.G., Pearce N.W., Spinelli A., Berger M.F., Gurley K.E., Hall B.M. Induction of long-term specific tolerance to allografts in rats by therapy with an anti-CD3-like monoclonal antibody. *Transplantation*, 1993, Vol. 55, no. 3, pp. 459-468.
4. Pauken K.E., Torchia J.A., Chaudhri A., Sharpe A.H., Freeman G.J. Emerging concepts in PD-1 checkpoint biology. *Semin. Immunol.*, 2021, Vol. 52, 101480. doi: 10.1016/j.smim.2021.101480.
5. Riella L.V., Paterson A.M., Sharpe A.H., Chandraker A. Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am. J. Transplant.*, 2012, Vol. 12, no. 10, pp. 2575-2587.
6. Sharpe A.H., Pauken K.E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 18, no. 3, pp. 153-167.
7. Thaventhiran T., Alhumeed N., Yeang H.X., Sethu S., Downey J.S., Alghanem A.F., Olayanju A., Smith E.L., Cross M.J., Webb S.D., Williams D.P., Bristow A., Ball C., Stebbings R., Sathish J.G. Failure to upregulate cell surface PD-1 is associated with dysregulated stimulation of T cells by TGN1412-like CD28 superagonist. *MAbs*, 2014, Vol. 6, no. 5, pp. 1290-1299.
8. Tran G.T., Carter N., He X.Y., Spicer T.S., Plain K.M., Nicolls M., Hall B.M., Hodgkinson S.J. Reversal of experimental allergic encephalomyelitis with non-mitogenic, non-depleting anti-CD3 mAb therapy with a preferential effect on T(h)1 cells that is augmented by IL-4. *Int. Immunol.*, 2001, Vol. 13, no. 9, pp. 1109-1120.

---

### Авторы:

**Храмова Т.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

**Бедулева Л.В.** — д.б.н., доцент, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; ведущий научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

### Authors:

**Khramova T.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

**Beduleva L.V.**, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Leading Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

**Фомина К.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; старший научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

**Абисева Н.Н.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия

**Fomina K.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Senior Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

**Abisheva N.N.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation

---

Поступила 15.05.2023  
Отправлена на доработку 29.06.2023  
Принята к печати 05.07.2023

---

Received 15.05.2023  
Revision received 29.06.2023  
Accepted 05.07.2023

## **СОДЕРЖАНИЕ УРОВНЕЙ ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ 1-го ТИПА, МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 7-го ТИПА И ПОКАЗАТЕЛИ АНТРОПОМЕТРИИ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И ЖЕНЩИН С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА**

**Чепурнова Н.С., Кныш С.В., Руднева А.В., Здор В.В., Маркелова Е.В.,  
Романюк П.В., Саяпин С.И.**

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

**Резюме.** В настоящее время многие исследования направлены на изучение механизмов развития основных возраст-зависимых патологий, к которым относится, в том числе, артериальная гипертензия (АГ). Нами не было найдено источников, отражающих наличие связи между уровнем матриксной металлопротеиназы 7-го типа (ММП-7), тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ типа (ТИМР-1) и антропометрическими данными, что важно учитывать при диагностике возраст-ассоциированных, социально-зависимых заболеваний и метаболических нарушений. В статье представлены данные состояния системы протеолиза и антропометрические данные 45 практически здоровых женщин и 45 женщин с артериальной гипертензией в возрасте от 59 до 74 лет. Уровни ММП-7 и ТИМР-1 в сыворотке крови исследовали методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Объем талии и шеи измеряли трижды сантиметровой лентой с точностью до 1 см. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью аналитического программного обеспечения IBM SPSS Statistics, V. 22.0. Результаты исследования отражают корреляционные связи между уровнем ММП-7 и ТИМР-1, а также объемом талии (ОТ) и шеи (ОШ). В группе практически здоровых женщин зафиксирован низкий уровень ММП-7 и ТИМР-1 в сравнении со второй исследуемой группой ( $p < 0,01$ ). Антропометрические данные не отличались выраженным разнообразием: объем талии в группе здоровых женщин был меньше ( $p < 0,05$ ), а значения объема шеи достоверно в группах не различались. При оценке связи в группе практически здоровых женщин нами зафиксирована пря-

### **Адрес для переписки:**

*Чепурнова Наталья Сергеевна  
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.  
Тел./факс: 8 (914) 960-60-06.  
E-mail: dr.cns@yandex.ru*

### **Address for correspondence:**

*Natalia S. Chepurnova  
Pacific State Medical University  
2 Ostryakov Ave  
Vladivostok  
690002 Russian Federation  
Phone/fax: +7 (914) 960-60-06.  
E-mail: dr.cns@yandex.ru*

### **Образец цитирования:**

*Н.С. Чепурнова, С.В. Кныш, А.В. Руднева, В.В. Здор,  
Е.В. Маркелова, П.В. Романюк, С.И. Саяпин  
«Содержание уровней тканевого ингибитора  
матриксных металлопротеиназ 1-го типа, матриксной  
металлопротеиназы 7-го типа и показатели  
антропометрии у практически здоровых женщин  
и женщин с артериальной гипертензией пожилого  
возраста» // Российский иммунологический журнал,  
2023. Т. 26, № 3. С. 421-426.  
doi: 10.46235/1028-7221-9637-LOT*

*© Чепурнова Н.С. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0*

### **For citation:**

*N.S. Chepurnova, S.V. Knysh, A.V. Rudneva, V.V. Zdor,  
E.V. Markelova, P.V. Romanyuk, S.I. Sayapin "Levels  
of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases type 1,  
matrix metalloproteinase type 7 and anthropometric  
parameters in practically healthy women and women  
with arterial hypertension in the older age group",  
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2023,  
Vol. 26, no. 3, pp. 421-426.  
doi: 10.46235/1028-7221-9637-LOT*

*© Chepurnova N.S. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License*

**DOI:** 10.46235/1028-7221-9637-LOT

мая высокая корреляция значительной силы между ОТ и ОШ ( $r = 0,754$ ,  $p < 0,0001$ ), в то время как в группе женщин с АГ эта связь была слабее ( $r = 0,5782$ ,  $p < 0,0001$ ). Кроме того, в обеих исследуемых группах была обнаружена идентичная направленность корреляции между уровнем MMP-7 и TIMP-1: в группе здоровых женщин эта связь была средней силы ( $r = 0,657$ ,  $p < 0,0001$ ), тогда как в группе женщин с АГ – сильная ( $r = 0,720$ ,  $p < 0,0001$ ). Полученные данные свидетельствуют о наличии метаболических нарушений в группе женщин с артериальной гипертензией и признаках нарушения системы протеолитических ферментов.

*Ключевые слова:* матриксные металлопротеиназы, возраст, практически здоровые женщины

## LEVELS OF TISSUE INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEINASES TYPE 1, MATRIX METALLOPROTEINASE TYPE 7 AND ANTHROPOMETRIC PARAMETERS IN PRACTICALLY HEALTHY WOMEN AND WOMEN WITH ARTERIAL HYPERTENSION IN THE OLDER AGE GROUP

**Chepurnova N.S., Knysh S.V., Rudneva A.V., Zdor V.V., Markelova E.V., Romanyuk P.V., Sayapin S.I.**

*Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation*

**Abstract.** Multiple studies are currently, aimed at studying the mechanisms of the development of basic age-related pathologies, e.g., arterial hypertension (AH). We found no literature sources concerning associations between the levels of matrix metalloproteinase type 7 (MMP-7), tissue inhibitor of matrix metalloproteinases type (TIMP-1) and anthropometric data which could be useful for diagnosing age-associated, socially dependent diseases and metabolic disorders. The article presents the data on the state of proteolysis system and anthropometric data of 45 almost healthy women and 45 women with arterial hypertension (AH) aged from 59 to 74 years old. The levels of MMP-7 and TIMP-1 in blood serum were studied by sandwich-variant of ELISA test. The waist and neck volume were measured three times with a centimeter tape at an accuracy of 1 cm. Statistical processing of the obtained data was performed using analytical software IBM SPSS Statistics, v. 22.0. The results show some correlations between the levels of MMP-7 and TIMP-1, and the waist and neck sizes (WC). Lower levels of MMP-7 and TIMP-1 were registered in the group of practically healthy women as compared to the second (AH) study group ( $p < 0.01$ ). Anthropometric data were not markedly diverse: the waist size in the group of healthy women was less than in AH group ( $p < 0.05$ ), and values of neck volume did not differ significantly between the groups. When assessing the relationships in the group of practically healthy women, we recorded a direct significant correlation between the waist size and neck volume ( $r = 0.754$ ,  $p < 0.0001$ ), while in the group of women with AH this relationship was weaker ( $r = 0.5782$ ,  $p < 0.0001$ ). In addition, a similar correlation was found between MMP-7 and TIMP-1 levels in the both groups studied. In the group of healthy women this relationship was of medium strength ( $r = 0.657$ ,  $p < 0.0001$ ), whereas in the group of women with AH it was stronger ( $r = 0.720$ ,  $p < 0.0001$ ). The data obtained suggest the presence of metabolic disorders in the women with arterial hypertension and signs of proteolytic enzyme system disorders.

*Keywords:* matrix metalloproteinases, age, practically healthy women, arterial hypertension

### Введение

При артериальной гипертензии (АГ) особую роль отводят именно протеолитической системе как маркеру, отражающему интенсивность обмена внеклеточного матрикса. Поддержание его

постоянства зависит от координации синтеза и деградации его белков, осуществляемых матриксными металлопротеиназами. Снижение или увеличение скорости деградации компонентов межклеточного матрикса является основой патогенеза многих заболеваний. В настоящее время

изменение уровней матриксной металлопротеиназы-7 (MMP-7) и ее тканевого ингибитора-1 (TIMP-1) рассматривают как один из наиболее ранних биохимических маркеров ремоделирования эндотелия [1]. По свидетельствам многочисленных исследований, индекс массы тела не может быть достоверным прогностическим фактором риска развития сердечно-сосудистых катастроф [2]. Именно величина окружности талии (ОТ), шеи (ОШ), плеча и запястья имеют более существенное значение в определении кардиоваскулярного риска и неблагоприятных кардиоваскулярных исходов [2, 3]. Проанализировав имеющийся научный задел об уровне MMP-7 и TIMP-1 у здоровых женщин и женщин с АГ, нами был обнаружен дефицит информации, опубликованные статьи не давали полного представления изучаемой проблемы по возможной связи с антропометрическими данными.

**Цель исследования** – проанализировать некоторые показатели протеолиза и значения объема талии и шеи у практически здоровых женщин и женщин с артериальной гипертензией.

## Материалы и методы

Проведено обследование 90 женщин в возрасте от 60 до 74 лет: из них 45 практически здоровых женщин и 45 женщин с артериальной гипертензией. Уровни MMP-7 и TIMP-1 в сыворотке крови исследовали методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа, результаты представили в нг/мл. ОТ измеряли трижды на середине расстояния между краем нижнего ребра и верхнем гребнем подвздошной кости сантиметровой лентой с точностью до 1 см (стоя без обуви, на выдохе, при упоре на обе стопы и с руками,

свободно висящими вдоль туловища). ОШ измеряли трижды, накладывая измерительную ленту под щитовидным хрящом, выражали в см. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью аналитического программного обеспечения IBM SPSS Statistics, 22.0. Для выявления взаимосвязи между переменными был использован коэффициент корреляции рангов Спирмена.

## Результаты и обсуждение

В группе практически здоровых женщин нами зафиксирован достоверно более низкий уровень MMP-7 в сравнении со второй исследуемой группой ( $p < 0,05$ , табл. 1). Похожая тенденция наблюдалась при анализе уровня TIMP-1: в группе женщин, неотягощенных соматическими патологиями, его уровень был ниже ( $p < 0,05$ ). Антропометрические данные не отличались выраженным разнообразием: объем талии и объем шеи достоверно в группах не различались (табл. 1).

При оценке корреляционной связи в группе практически здоровых женщин нами зафиксирована прямая сильная связь между ОТ и ОШ ( $r = 0,754$ ;  $p < 0,0001$ ). В то время как в группе женщин с АГ эта связь между ОТ и ОШ была менее выраженной ( $r = 0,578$ ;  $p < 0,0001$ ). Кроме того, в обеих исследуемых группах была обнаружена идентичная особенность взаимосвязи между уровнем MMP-7 и TIMP-1: в группе здоровых женщин эта связь была средней силы ( $r = 0,657$ ;  $p < 0,0001$ ), нежели в группе женщин с АГ ( $r = 0,720$ ;  $p < 0,0001$ ), где определена сильная связь.

В норме функция MMP регулируется их ингибиторами – белками, регулирующими метабо-

**ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЯ MMP-7, TIMP-1 И АНТРОПОМЕТРИИ У ОБСЛЕДУЕМЫХ ЖЕНЩИН ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. MMP-7, TIMP-1 VALUES AND ANTHROPOMETRY IN ELDERLY WOMEN EXAMINED, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

№	Показатели Indicators	Практически здоровые женщины Practically healthy women n = 45	Женщины с АГ Women with AH n = 45
1	MMP-7, нг/мл MMP-7, ng/mL	1,83 (1,06-3,08) $p_{1,2} < 0,05$	2,16 (1,00-3,16)
2	TIMP-1, нг/мл TIMP-1, ng/mL	138,47 (99,43-35,95) $p_{1,2} < 0,05$	166,132 (139,210-243,414)
3	Объем талии, см Waist size, cm	88,5 (83,5-97,5) $p_{1,2} < 0,05$	91,0 (88,0-98,0)
4	Объем шеи, см Neck volume, cm	35,3 (34,0-38,8)	36,0 (35,0-37,0)

лизм соединительной ткани [3, 4]. В механизме развития АГ ключевое значение имеет активация систем нейрогуморальной регуляции кровотока, реализация эффектов которой осуществляется с помощью системы матриксных металлопротеиназ. Как АГ, так и избыточный вес приводят к структурно-функциональной перестройке интимы сосудов. Применительно к сосудам у больных АГ, снижение активности MMP и накопление ВКМ в сосудистой стенке на начальной стадии является компенсаторным, и направлено на укрепление ее каркаса в условиях повышенного внутрисосудистого давления и гемодинамического стресса [4, 5]. Необходимо отметить, что MMP-7 имеет особую значимость для сосудистого ремоделирования, поскольку она в избытке представлена в артериальной сосудистой сети [4, 7]. При этом исследования указанного эффекта MMP практически отсутствуют. В нашей работе прослеживалась четкая тенденция сопровождения повышения уровня MMP-7 и ее ингибитора – TIMP-1, что рассматривается нами как компенсаторный механизм. Михин В.П. с соавт. (2022) обнаружили у пациентов с АГ и метаболическим синдромом (МС) среднюю концентрацию TIMP-1, которая составила  $277,8 \pm 23,66$  нг/мл и имела тенденцию к снижению по сравнению с контролем ( $p > 0,05$ ). Авторами было зафиксировано, что нормальный уровень TIMP-1 увеличивался с возрастом. Кроме того, отмечена прямая корреляция TIMP-1 с индексом массы тела [6]. Они предположили, что развитие абдоминального ожирения у пациенток с АГ и МС взаимосвязано с дисбалансом в системе протеолиз/антипротеолиз.

Ранее уже сообщалось о многих факторах, влияющих на выработку и активность плазменных MMP. Было обнаружено, что высокие концентрации циркулирующего MMP-7 связаны с воспалением эндотелия в ответ на факторы, включая стресс, окисленные липопротеины низкой плотности (ЛПНП) и провоспалительные цитокины. Повышенные уровни MMP-7 в крови женщин, страдающих висцеральным ожирением, объясняются увеличением продукции его адипоцитами. Однако исследования, в ко-

торых проанализирован уровень MMP-7 у людей, страдающих избыточным весом, единичны. Grzechoci ska В. и соавт. (2019) в своей работе отметили средние положительные корреляционные связи между индексом массы тела и MMP-7 ( $p < 0,05$ ), MMP-8 ( $p < 0,001$ ), MMP-9 ( $p < 0,01$ ) и MMP-12 ( $p < 0,05$ ). Субстратами для MMP-7 являются: аполипопротеин С-II, который является кофактором липопротеинлипазы и компонентом липопротеинов очень низкой плотности и хиломикрон; аполипопротеин А-IV [8]. Расщепление аполипопротеина С-II значительно снижает активность липопротеинлипазы, что приводит к гидролизу триглицеридов в крови и переносу жирных кислот в ткани. Расщепление аполипопротеина А-IV, опосредованное MMP-7, приводит к потере внутренней антиоксидантной активности и имеет патологические последствия в развитии гиперлипидемии и атеросклероза [6]. Известно, что значения объема талии являются одним из главных диагностических признаков метаболических нарушений [8]. Описание взаимосвязей между антропометрическими данными и системой протеолитических ферментов, как ключевого фактора патогенеза АГ и МС, может послужить толчком к дальнейшим исследованиям сосудистой стабильности и патомеханизма нематричных нарушений, связанных с концентрациями MMP.

## Выводы

1. Значения MMP-7 и TIMP-1 в группе женщин с артериальной гипертензией превышали одноименные показатели группы практически здоровых женщин, что свидетельствует о более активных процессах ремоделирования эндотелия.
2. Не отмечено значительной разницы в антропометрических данных между исследованными группами.
3. Выявлены корреляционные взаимосвязи в группе практически здоровых женщин между ОТ и ОШ, а также между MMP-7 и TIMP-1. Именно в группе женщин с АГ наблюдалась самая сильная прямая связь между уровнями MMP-7 и TIMP-1.

## Список литературы / References

1. Гюева З.М., Богданов А.Р., Залетова Т.С., Богданова А.А. Ожирение как фактор риска развития хронической сердечной недостаточности // Доктор.ру, 2017. № 10 (139). С. 21-25. [Gioeva Z.M., Bogdanov A.R., Zaletova T.S., Bogdanova A.A. Obesity as a risk factor for the development of chronic heart failure. *Doctor.ru = Doctor.ru*, 2017, no. 10 (139), pp. 21-25. (In Russ.)]
2. Грачев Н.И., Красников В.Е., Турмова Е.П., Маркелова Е.В., Рублев В.Ю., Назаренко С.А. Анализ показателей матриксной металлопротеиназы-9, тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 1-го типа и их комплекса у пациентов с острым инфарктом миокарда, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам // Тихоокеанский медицинский журнал, 2018. № 4 (74). С. 45-48. [Grachev N.I.,

Krasnikov V.E., Turmova E.P., Markelova E.V., Rublev V.Yu., Nazarenko S.A. Analysis of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase type 1 and their complex in patients with acute myocardial infarction who have exposed high coronary interventions. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2018, no. 4 (74), pp. 45-48. (In Russ.)

3. Закирова А.Н., Фаткуллина Е.З., Закирова Н.Э. Роль матриксных металлопротеиназ в развитии гипертрофии левого желудочка у пациенток с артериальной гипертензией и метаболическим синдромом // Рациональная фармакотерапия в кардиологии, 2014. № 10 (1). С. 37-42. [Zakirova A.N., Fatkullina E.Z., Zakirova N.E. Role of matrix metalloproteinase in the development of left ventricle hypertrophy in patients with arterial hypertension and metabolic syndrome. *Ratsionalnaya farmakoterapiya v kardiologii = Rational Pharmacotherapy in Cardiology*, 2014, no. 10 (1), pp. 37-42. (In Russ.)]

4. Зюбанова И.В., Мордовин В.Ф., Фальковская А.Ю., Пекарский С.Е., Рипп Т.М., Личикаки В.А., Гусакова А.М., Баев А.Е. Динамика биохимических показателей сосудистого фиброза под влиянием ренальной денервации у больных резистентной артериальной гипертензией И.В. // Сибирский медицинский журнал, 2016. Т. 31, № 2. С. 18-22. [Zyubanova I.V., Mordovin V.F., Falkovskaya A.Yu., Pekarsky S.E., Ripp T.M., Lichikaki V.A., Gusakova A.M., Baev A.E. Dynamics of biochemical indicators of vascular fibrosis under the impact of renal denervation in i.v. resistant arterial hypertensives. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2016, Vol. 31, no. 2, pp. 18-22. (In Russ.)]

5. Казакова Т.С., Нурмамедова Е. Э. Методы проведения антропометрических исследований с целью определения состояния физического здоровья // Медицина и здравоохранение: материалы V Междунар. науч. конф. (г. Казань, май 2017 г.). Казань: БуК, 2017. С. 1-4. [Kazakova T.S., Nurmamedova E.E. Methods of anthropometric studies to determine the state of physical health. *Medicine and Public Health: materials of the V Intern. scientific conf. (Kazan, May 2017)*. Kazan: Buk, 2017, pp. 1-4. (In Russ.)]

6. Михин В.П., Осипова О.А., Воротынцева В.В., Перуцкий Д.Н., Головина Н.И. Содержание матриксных металлопротеиназ в крови больных артериальной гипертензией с высоким сердечно-сосудистым риском на фоне терапии статинами // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2022. Т. 21, № 10, 3422. [Mikhin V.P., Osipova O.A., Vorotyntseva V.V., Perutsky D.N., Golovina N.I. Content of matrix metalloproteinases in the blood of hypertensive patients with a high cardiovascular risk receiving statin therapy. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2022, Vol. 21, no. 10, 3422. (In Russ.)] doi:10.15829/1728-8800-2022-3422.

7. Фальковская А.Ю., Мордовин В.Ф., Пекарский С.Е., Рипп Т.М., Зюбанова И.В., Ситкова Е.С., Личикаки В.А., Манукян М.А., Суслова Т.Е., Гусакова А.М., Рябова Т.Р. Система матриксных металлопротеиназ у больных резистентной артериальной гипертензией, ассоциированной с сахарным диабетом 2 го типа: связь с состоянием почечного кровотока и функцией почек // Артериальная гипертензия, 2019. Т. 25, № 1. С. 34-45. [Falkovskaya A.Yu., Mordovin V.F., Pekarsky S.E., Ripp T.M., Zyubanova I.V., Sitkova E.S., Lichikaki V.A., Manukyan M.A., Suslova T.E., Gusakova A.M., Ryabova T.R. Matrix metalloproteinase system in patients with resistant arterial hypertension associated with type 2 diabetes mellitus: relationship with the state of renal blood flow and renal function. *Arterialnaya gipertenziya = Arterial Hypertension*, 2019, Vol. 25, no. 1, pp. 34-45. (In Russ.)]

8. Grzechocińska B., Dąbrowski F.A., Sierdzinski J., Cyganek A., Wielgoś M.. The association between serum metalloproteinase concentration, obesity, and hormone levels in reproductive-aged women. *Endokrynol. Pol.*, 2019, Vol. 70, no. 1, pp. 49-56.

---

**Авторы:**

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

**Здор В.В.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

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

**Authors:**

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

**Zdor V.V.**, PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

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

**Руднева А.В.** — старший лаборант кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Rudneva A.V.**, Senior Laboratory Assistant, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

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

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

**Романюк П.В.** — студентка лечебного факультета ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Romanyuk P.V.**, Student, Medical Faculty, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

**Саяпин С.И.** — студент лечебного факультета ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Sayapin S.I.**, Student, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

---

Поступила 14.05.2023

Received 14.05.2023

Отправлена на доработку 29.06.2023

Revision received 29.06.2023

Принята к печати 05.07.2023

Accepted 05.07.2023

Абдуллаева Л.М. ....	381	Пашинина О.А. ....	373
Абишева Н.Н. ....	415	Пашкина Е.А. ....	377
Актанова А.А. ....	377	Пашкова Т.М. ....	373
Анушенко А.О. ....	337	Перунова Н.Б. ....	281
Атажахова М.Г. ....	363	Петричук С.В. ....	251, 337, 381
Ахметьянов Р.Р. ....	211	Пиктурно С.Н. ....	287
Баландина С.Э. ....	217	Пиотрович А.В. ....	345
Бедулева Л.В. ....	415	Пирогова А.И. ....	287
Бекпергенова А.В. ....	281	Поздняков П.А. ....	397
Беляева С.В. ....	217	Потапов А.С. ....	337, 381
Бердюгина О.В. ....	223	Просолупова Н.С. ....	287
Бережная Е.С. ....	345	Радыгина Т.В. ....	337, 381
Бондаренко Т.А. ....	281	Раев М.Б. ....	313
Борода А.В. ....	233	Романюго Г.Д. ....	295
Бочкова М.С. ....	313	Романюк П.В. ....	421
Бражников А.Ю. ....	273	Руднева А.В. ....	421
Бухарин О.В. ....	281	Рябова Л.В. ....	389
Бушуева Д.С. ....	397	Сабирьянов А.Р. ....	211
Валикова О.В. ....	233	Сайдакова Е.В. ....	307
Власова В.В. ....	307	Сарапульцев А.П. ....	241
Вялова Т.А. ....	397	Сафронова Э.А. ....	389
Габова Е.В. ....	397	Саяпин С.И. ....	421
Грачева А.М. ....	233	Семикина Е.Л. ....	337
Гриценко В.А. ....	373	Смолягин А.И. ....	321
Гусев Е.Ю. ....	223, 273	Сновская М.А. ....	251
Гутина Е.В. ....	403	Солодовник А.В. ....	397
Давыдова Е.В. ....	211	Соломатина Л.В. ....	273
Добрынина М.А. ....	241	Сташкевич Д.С. ....	217
Дубинец И.Д. ....	301	Суслова Т.А. ....	217
Жужула А.А. ....	251	Тетерин Ю.В. ....	287
Журавлёва Ю.А. ....	273	Тимганова В.П. ....	403
Забокрицкий Н.А. ....	259	Тихонов Я.Н. ....	233
Заморина С.А. ....	409	Тряпочкина А.С. ....	251
Здвижкова И.А. ....	281	Тулупова М.С. ....	355
Здор В.В. ....	233, 421	Ужвиюк С.В. ....	409
Зотова Н.В. ....	273	Усанина Д.И. ....	409
Зурочка А.В. ....	241	Федянина Л.Н. ....	355
Зурочка В.А. ....	241	Филиппова Ю.В. ....	321
Иванова Е.В. ....	281	Фомина К.В. ....	415
Карташова О.Л. ....	373	Фролова В.Д. ....	295
Киселева Е.О. ....	295	Храмова Т.В. ....	415
Клепиков С.В. ....	301	Храмцов П.В. ....	313
Кныш С.В. ....	421	Цветкова В.С. ....	381
Ковалева С.В. ....	287, 363	Чайникова И.Н. ....	281
Коваленко Е.А. ....	377	Чапурина В.Н. ....	363
Козлов В.А. ....	377	Челпаченко О.Е. ....	281
Колбин К.Г. ....	233	Чепурнова Н.С. ....	421
Комелькова М.В. ....	241	Черникова М.А. ....	355
Комягина Т.М. ....	251	Чудилова Г.А. ....	287, 363
Коркмазов А.М. ....	295	Чулкова А.М. ....	287
Коркмазов М.Ю. ....	301	Шардина К.Ю. ....	403
Королевская Л.Б. ....	307	Шмагель Н.Г. ....	307
Костюшко А.В. ....	355	Щербакова И.Л. ....	211
Кравченко А.Ю. ....	301	Freidlin E.V. ....	265, 329
Кропанева М.Д. ....	313	Karaseva O.V. ....	265
Кузьмичева Н.А. ....	321	Kuptsova D.G. ....	265, 329
Купцова Д.Г. ....	337, 381	Kurbatova O.V. ....	329
Курбатова О.В. ....	251, 337, 381	Murashkin N.N. ....	329
Лаптева А.В. ....	345	Petrichuk S.V. ....	265, 329
Латюшина Л.С. ....	345	Radigina T.V. ....	329
Ленгина М.А. ....	301	Yanyushkina O.G. ....	265
Лившиц Н.М. ....	321	Zakirov R.Sh. ....	265
Ломтатидзе Л.В. ....	287		
Мальшева Л.Ю. ....	345		
Маркелова Е.В. ....	355, 421		
Маркова Н.Ю. ....	355		
Матушкина В.А. ....	363		
Милонченко М.С. ....	217		
Мирошниченко И.В. ....	321		
Михайлова И.В. ....	321		
Мовсисян Г.Б. ....	337		
Мурашкин Н.Н. ....	381		
Мякотина Д.Э. ....	217		
Невежкина Т.А. ....	355		
Нестерова И.В. ....	287, 363		

адаптивный иммунитет.....	288	пероксидаза хрена.....	314
ангилизицимная активность.....	373	повреждение связей.....	212
антинуклеарные антитела.....	252	полиморфизм генов.....	217
антитела к CD3.....	415	полиорганный недостаточность.....	274
апоптоз.....	409	полипозный риносинусит.....	295
аргиназа-1.....	330, 404	политравма.....	266
артрит.....	252	постковидные пациенты.....	242
бесклеточные супернатанты.....	282	постковидный синдром.....	364
биомаркеры COVID-19.....	217	практически здоровые женщины.....	422
биопрепараты.....	330	пробиотик.....	260
биохимические показатели.....	322	прогестерон.....	234
бифидобактерии.....	282	прогноз исхода.....	266
ВЗК.....	382	противовирусная терапия.....	356
вирус папилломы человека.....	356	проточная цитометрия.....	330, 338, 390, 415
ВИЧ-инфекция.....	308	профилактика.....	223
возраст.....	422	псориаз.....	330, 382
врожденный иммунитет.....	288	рекуррентные инфекции.....	295
гексапептид.....	288	риамилловир.....	223
геморрагический шок.....	274	РС.....	382
гепатопротектор.....	260	сепсис.....	274
герпесвирусные инфекции.....	364	септический шок.....	274
герпетическая инфекция.....	356	синдром поликистозных яичников.....	234
гипертрофия аденоидов.....	397	синдром полиорганной недостаточности.....	266
гликогеновая болезнь.....	338	синдром хронической усталости.....	364
гликолиз.....	308	синтетический аналог ГМ-КСФ – пептид ZP2.....	373
двуспиральная ДНК.....	252	синтетический тетрапептид КК1.....	322
дети.....	252, 266, 330, 338, 382	системная красная волчанка.....	252
иммунная система.....	242	системное воспаление.....	274
иммунобезопасность.....	377	стентирование коронарных артерий.....	390
иммунокомпрометированность.....	288	субпопуляции.....	364
иммунокоррекция.....	295	таргетная терапия.....	301
иммунологические неответчики.....	308	технология Seahorse technology.....	308
иммунологические показатели.....	322	тканевые ингибиторы.....	356
иммунопатогенез.....	301	топическая цитокинотерапия.....	346
иммуносупрессия.....	404	Триазавирин.....	223
иммунотерапия.....	288	трофобластический $\beta$ 1-гликопротеин.....	404
иммуотропная активность.....	260	тяжелая травма.....	266
иммуоферментный анализ.....	314	фенотип.....	364
иммунофлюоресценция.....	252	фиброз печени.....	338
иммунохемилюминесценция.....	252	физиолечение.....	397
индоламин-2,3-диоксигеназа.....	404	флегмоны.....	346
индукция PD-1.....	415	хронические воспалительные заболевания органов малого таза.....	288
интерферон.....	364	хронический аденоидит.....	397
инфекционные осложнения.....	266	хронический полипозный риносинусит.....	301
клетки крови.....	377	цитокины.....	212, 274, 282, 295, 301, 397
клеточный иммунитет.....	260	электромиография.....	212
коронавирусная инфекция COVID-19.....	314	электромиостимуляция.....	212
коронароангиография.....	390	V-лимфоциты.....	242
крысы.....	322	V1-лимфоциты.....	242
кукурбитурилы.....	377	<i>Bacillus subtilis</i> .....	260
кумуляционные клетки.....	234	<i>Candida</i> .....	373
лабораторная диагностика.....	314	CD4 <sup>+</sup> T-лимфоциты.....	308
лекарственная доставка.....	377	COVID-19.....	217, 223
лечение.....	223	HEp-2.....	252
лимфоциты.....	338, 390	IL-6.....	234
макрофаги.....	346	IL-10.....	234
матриксные металлопротеиназы.....	356, 422	IFN $\gamma$ .....	234
межклеточный матрикс.....	356	Jurkat.....	409
метаболиты.....	260	MDSCs.....	330
метотрексат.....	282	NK-клетки.....	390
миелоидные клетки-супрессоры.....	382	“point-of-care” тест-системы.....	314
миелоидные супрессорные клетки.....	404	SARS-CoV-2.....	217, 223
миокины.....	212	SARS-CoV-2 инфекция.....	242
мононуклеары периферической крови человека.....	282	T-лимфоциты.....	242, 409, 415
наночастицы оксида графена.....	409	Treg-лимфоциты.....	242
нейтрофилы.....	346	Th17/Treg.....	338
нейтрофильные гранулоциты.....	364	Thact/Treg.....	338
общий анализ крови.....	242, 377	TLR-9 (-1237)*T/C.....	217
окислительное фосфорилирование.....	308		
острый коронарный синдром.....	390		
отношение субпопуляций T-хелперов.....	266		
пассивное табакокурение.....	322		
перелом челюсти.....	346		
периодонтит.....	346		

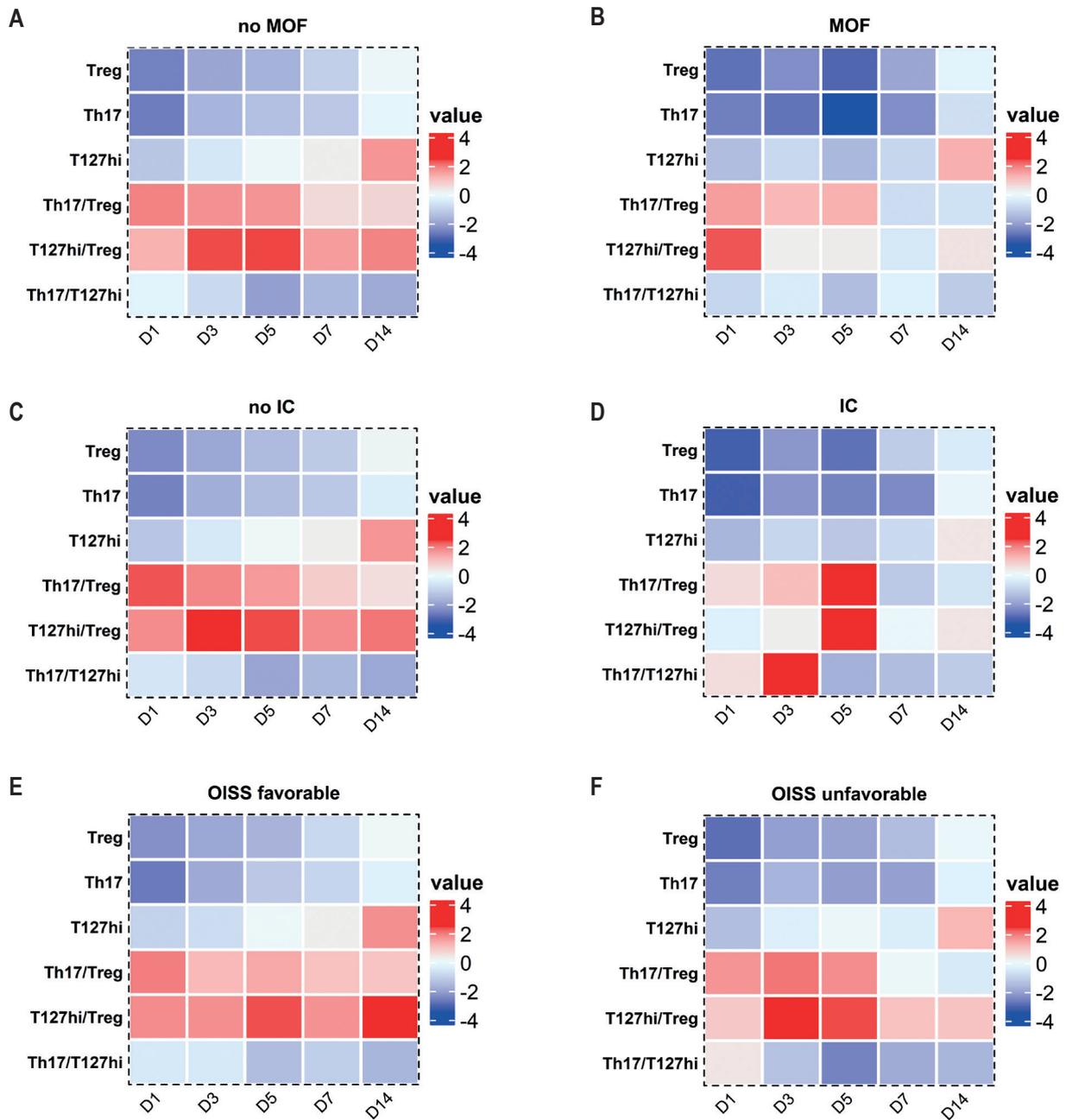


Figure 2. Heat maps show the kinetics of changes in peripheral blood T127hi, Treg, Th17 absolute cell count levels and Th17/Treg, T127hi/Treg, and Th17/T127hi ratio levels in the critical period of severe injury in children depending of MOF (A, B), infectious complication (C, D) development and outcome prediction of OISS (E, F)