

Том 27, № 1. С. 1-124

2024

Официальный журнал
Российского Научного Общества Иммунологов

**РОССИЙСКИЙ
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ**



**RUSSIAN JOURNAL
OF IMMUNOLOGY**

Official Journal
of Russian Society of Immunology

Volume 27
Number 1

2024

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ПОЛУЧЕНИЕ ДОНОРСКОГО ГАММА-ГЛОБУЛИНА ОТ МНОГОРОЖАВШИХ ЖЕНЩИН И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ЭКСПРЕССИЮ МОЛЕКУЛ HLA-G И HLA-DR ЛИМФОЦИТОВ ЖЕНЩИН, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С СЕПТАЛЬНЫМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА» (АВТОРЫ: ШАБАЛДИН А.В., СИНИЦКАЯ А.В., ШМУЛЕВИЧ С.А., ГРИШАЧЕВА Е.О., ШАБАЛДИНА Е.В., ДЕЕВА Н.С. [с. 71-84])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "ISOLATION OF DONOR GAMMA GLOBULIN OBTAINED FROM MULTIPAROUS WOMEN AND ITS EFFECTS UPON EXPRESSION OF HLA-G AND HLA-DR MOLECULES ON LYMPHOCYTES FROM MOTHERS OF CHILDREN WITH SEPTAL CONGENITAL HEART DEFECTS" (AUTHORS: SHABALDIN A.V., SINITSKAYA A.V., SHMULEVICH S.A., GRISHACHEVA E.O., SHABALDINA E.V., DEEVA N.S. [pp. 71-84])



Рисунок 2. Электрофорез хроматографического смыва в 1,5%-ном агарозном геле, окраска Суданом черным

Figure 2. Electrophoresis of chromatographic wash in 1.5% agarose gel, stained with Sudan black

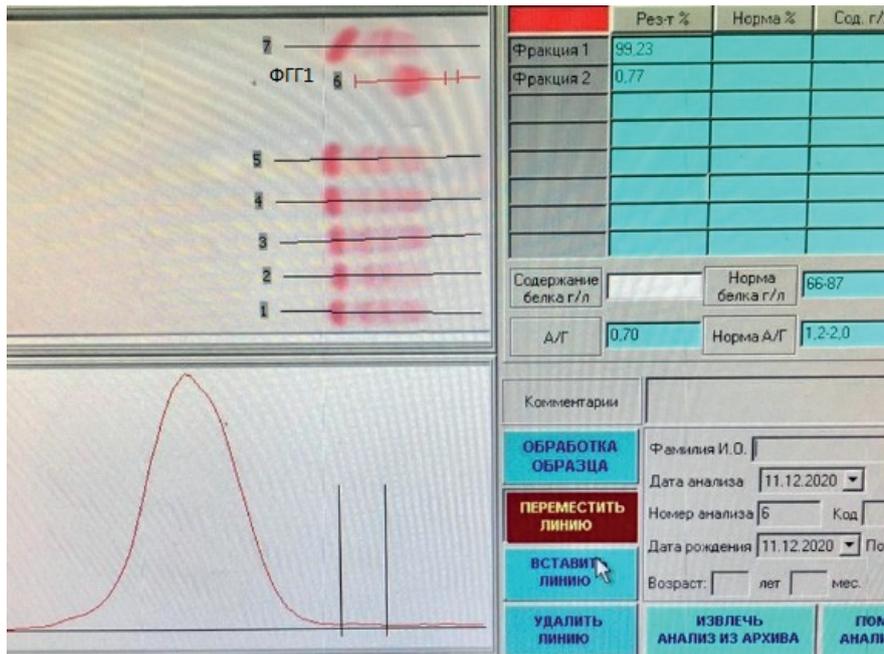


Рисунок 3. Электрофоретическое разделение белковой фракции сыворотки крови на мембранах ацетилцеллюлозы («КлиниТест-ЭФ», Россия)

Примечание. Дорожка № 6, ФГГ1 является анализируемым образцом.

Figure 3. Electrophoretic separation of the protein fraction of blood serum on cellulose acetate membranes (CliniTest-EF, Russia)

Note. Lane No. 6, FGG1 is the analyzed sample.

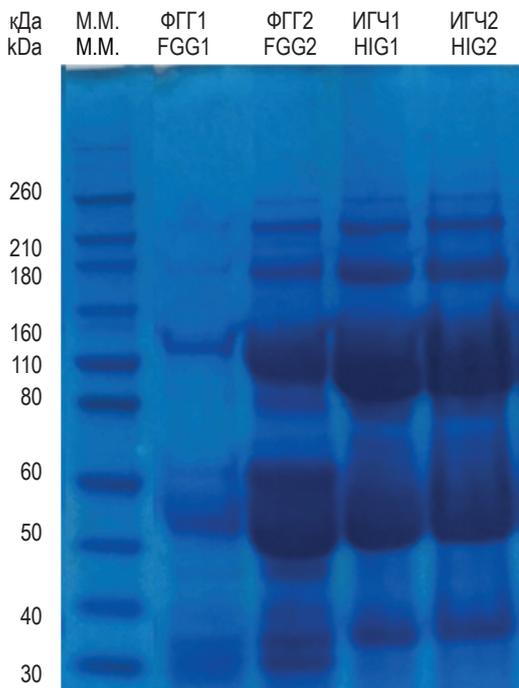


Рисунок 4. ДСН-ПААГ электрофорез

Примечание. М.М. – молекулярная масса; кДа – кило Дальтоны.

Сокращения (ФГГ1, ФГГ2, ИГЧ1, ИГЧ2) расшифрованы в тексте. Окраска Кумасси.

Figure 4. SDS-PAGE electrophoresis

Note. M.M., molecular mass; kda, kilo Daltons.

Abbreviations (FGG1, FGG2, HIG1, HIG2) are deciphered in the text. Coomassie coloring.

РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИММУНОЛОГОВ
(РНОИ)

РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

январь-март

2024, том 27

№. 1

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 Михаль – профессор, Институт наук Вейцмана, Реховот, Израиль

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

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

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

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

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

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

Ответственные секретари:

Ризопулу А.П., д.б.н. (Москва)

Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)

E-mail: rusimmun@gmail.com

Редактор перевода:

Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)

Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

Редакция журнала «Российский иммунологический журнал»

197101, Санкт-Петербург, а/я 130

Электронная версия: www.rusimmun.ru

© Российский иммунологический журнал

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

Данный материал распространяется по лицензии

Creative Commons Attribution 4.0 License.

Хайдуков Сергей Валерьевич – доктор биологических наук, ФГБУН Институт 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

Свищ 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 18.04.2024 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 15,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.)

Заказ № 018

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

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

Тел.: (812) 950-10-99.

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

RUSSIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY
(RSI)

RUSSIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY

ROSSIYSKIY IMMUNOLOGICHESKIY ZHURNAL

January-March

2024, volume 27

No. 1

Published since 1996

Editor-in-chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

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

Editorial board

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

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

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

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

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

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

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

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

Musa R. Khaitov – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, State Scientific Center "Institute of Immunology", FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

Elena A. Korneva – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Experimental Medicine, Department of Pathology and Pathophysiology, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Andrey A. Kruglov – PhD, Chief, Laboratory of Chronic Inflammation, German Rheumatism Research Centre (DRFZ), Berlin, Germany

Dmitry V. Kuprash – PhD, Professor, RAS Corresponding Member, Department of Immunology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Mariya A. Lagarkova – PhD, Professor of Lomonosov Moscow State University, RAS Corresponding Member, Chief, Laboratory of Cellular Biology, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Irina V. Lyadova – PhD, MD, Professor, Central Institute of Tuberculosis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

Sergei A. Nedospasov – PhD, Professor, RAS full member, Lomonosov State University, Department of Immunology, chief, Institute of Physico-Chemical Biology, Belozersky, Department of Molecular Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

Georgiy A. Nevinny – Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

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

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

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

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

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

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

Managing Editors:

Anna Rizopulu, PhD (Biology) (Moscow)

Natalia Rakitianskaia, (St. Petersburg)

E-mail: rusimmun@gmail.com

Translation editor:

Dmitrii V. Isakov, PhD (Medicine) (St. Petersburg)

Online version editorial manager:

Vera S. Erofeeva (St. Petersburg)

Editorial Office: phone/fax (812) 233-08-58

Address for correspondence:

Editorial Office of the "Russian Journal of Immunology"

197101, St.Petersburg, post box 130

Electronic version: www.rusimmun.ru

© Russian Journal of Immunology

Journal registered with the Ministry of the Russian Federation for Press,

Broadcasting and Mass Media (certificate of registration of mass media

PI No. 77-11525 of January 4, 2002)

This material is distributed under

the Creative Commons Attribution 4.0 License.

Nataliya Yu. Sotnikova – MD, PhD, Prof., Ivanovo State Medical Academy, Head of the Department of Scientific and Practical Clinical Immunology, Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood (Ivanovo, Russia) Russian Federation

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

Editorial Council

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

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

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

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

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

Igor S. Gushchin – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Natural Sciences, Head of the Department of Clinical Immunology and Allergology №80, State Scientific Center "Institute of Immunology", FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 18.04.2024. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 15.5. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

83/1-A

Phone: (812) 950-10-99

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

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные статьи

Гейн С.В., Шаравьева И.Л.

РОЛЬ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФАГОЦИТОЗА И ПРОДУКЦИИ Th1/Th2 ЦИТОКИНОВ ПРИ ОСТРОМ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ У НЕИММУНИЗИРОВАННЫХ МЫШЕЙ..... 7

Сорокина Е.В., Ахматова Э.А., Столпникова В.Н., Калиниченко Е.О., Бишева И.В., Сходова С.А.

СПОНТАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, ЛИМФОУЗЛОВ, СЕЛЕЗЕНКИ, ТИМУСА И КОЖИ В МОДЕЛИ ОСТРОГО ПСОРИАЗОПОДОБНОГО ДЕРМАТИТА У МЫШЕЙ..... 15

Самойликов П.В., Васильева Г.В., Конаныхина С.Ю., Поддубиков А.В.

КАРТИРОВАНИЕ IgE-ПЕРЕКРЕСТНОЙ АКТИВНОСТИ АЛЛЕРГЕНОВ СОИ Gly m 4, Gly m 5 И Gly m 6 У БОЛЬНЫХ С АТОПИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ..... 23

Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Антонов А.В., Байрамов П.В., Вержбицкая Н.Е., Колпинский Г.И.

ИММУНО-ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ..... 33

Мамаева Т.А., Рубальская Т.С., Жердева П.Е., Метельская В.А., Топтыгина А.П.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИПА ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ КОРЬЮ РАЗНОГО ВОЗРАСТА НА ТЕРРИТОРИИ С ВЫСОКОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬЮ..... 49

Савченко А.А., Мартынова Г.П., Иккес Л.А., Беленюк В.Д., Борисов А.Г.

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ У ДЕТЕЙ..... 59

Шабалдин А.В., Синицкая А.В., Шмудевич С.А., Гришачева Е.О., Шабалдина Е.В., Деева Н.С.

ПОЛУЧЕНИЕ ДОНОРСКОГО ГАММА-ГЛОБУЛИНА ОТ МНОГОРОЖАВШИХ ЖЕНЩИН И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ЭКСПРЕССИЮ МОЛЕКУЛ nLA-G И nLA-DR ЛИМФОЦИТОВ ЖЕНЩИН, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С СЕПТАЛЬНЫМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА..... 71

Долгополов И.С., Рыков М.Ю.

ИММУНОТЕРАПИЯ ДЕТЕЙ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА..... 85

Краткие сообщения

Иванова О.Н., Иванова И.С.

ВЫСОКОГОРНАЯ СПЕЛЕОТЕРАПИЯ В ЛЕЧЕНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ..... 95

Трубачева О.А., Гусакова А.М., Шнайдер О.Л., Бирулина Ю.Г., Чумакова С.П., Петрова И.В.

ВЗАИМОСВЯЗЬ БИОМАРКЕРОВ И АГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ НА ФОНЕ СЕРОВОДОРОДА У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА..... 101

Невежжина Т.А., Маркелова Е.В., Кныш С.В., Тулупова М.С., Матюшкина Л.С.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ЖЕНЩИН С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ..... 109

Некролог..... 119

Правила для авторов..... 121

Авторский указатель..... 124

Предметный указатель..... 124

CONTENTS

Original articles

Gein S.V., Sharavieva I.L.

ROLE OF OPIOID RECEPTORS IN PHAGOCYTOSIS REGULATION AND PRODUCTION OF Th1/Th2 CYTOKINES UNDER ACUTE COLD STRESS IN NON-IMMUNE MICE7

Sorokina E.V., Akhmatova E.A., Stolpnikova V.N., Kalinichenko E.O., Bisheva I.V., Skhodova S.A.

SPONTANEOUS CYTOKINE PRODUCTION BY THE CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD, LYMPH NODES, SPLEEN, THYMUS AND SKIN IN A MURINE MODEL OF ACUTE PSORIASIS-LIKE DERMATITIS..... 15

Samoylikov P.V., Vasilyeva G.V., Konanykhina S.Yu., Poddubikov A.V.

MAPPING OF IgE CROSS-REACTIVITY OF Gly m 4, Gly m 5 AND Gly m 6 SOYBEAN ALLERGENS IN PATIENTS WITH ATOPIC DISEASES23

Glushkov A.N., Polenok E.G., Gordeeva L.A., Antonov A.V., Bayramov P.V., Verzhbitskaya N.E., Kolpinskiy G.I.

IMMUNO-HORMONAL REGULATION OF TUMOR PROLIFERATION IN BREAST CANCER PATIENTS..... 33

Mamaeva T.A., Rubalskaya T.S., Zherdeva P.E., Metelskaya V.A., Toptygina A.P.

DETERMINATION OF THE IMMUNE RESPONSE TYPE IN MEASLES PATIENTS OF DIFFERENT AGES FROM A HIGH-INCIDENCE AREA..... 49

Savchenko A.A., Martynova G.P., Ikkes L.A., Belenyuk V.D., Borisov A.G.

FEATURES OF THE NEUTROPHIL GRANULOCYTE PHENOTYPE IN CHILDREN WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS 59

Shabaldin A.V., Sinitskaya A.V., Shmulevich S.A., Grishacheva E.O., Shabaldina E.V., Deeva N.S.

ISOLATION OF DONOR GAMMA GLOBULIN OBTAINED FROM MULTIPAROUS WOMEN AND ITS EFFECTS UPON EXPRESSION OF HLA-G AND HLA-DR MOLECULES ON LYMPHOCYTES FROM MOTHERS OF CHILDREN WITH SEPTAL CONGENITAL HEART DEFECTS..... 71

Dolgoplov I.S., Rykov M.Yu.

IMMUNOTHERAPY FOR CHILDREN WITH MALIGNANT BRAIN TUMORS 85

Short communications

Ivanova O.N., Ivanova I.S.

HIGH-ALTITUDE SPELEOTHERAPY IN THE TREATMENT OF BRONCHIAL ASTHMA..... 95

Trubacheva O.A., Guskova A.M., Schneider O.L., Birulina Yu.G., Chumakova S.P., Petrova I.V.

RELATIONSHIP BETWEEN BIOMARKERS AND PLATELET AGGREGATION ACTIVITY IN PRESENCE OF HYDROGEN SULFIDE IN PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE 101

Nevezhkina T.A., Markelova E.V., Knysh S.V., Tulupova M.S., Matyshkina L.S.

CHANGES IN SERUM LEVELS OF PRO- AND ANTIINFLAMMATORY CYTOKINES IN WOMEN WITH PAPILLOMAVIRUS INFECTION BEFORE AND AFTER THERAPY..... 109

Obituary..... 119

Instructions to Authors..... 121

Author index..... 124

Subject index..... 124

РОЛЬ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФАГОЦИТОЗА И ПРОДУКЦИИ Th1/Th2 ЦИТОКИНОВ ПРИ ОСТРОМ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ У НЕИММУНИЗИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

Гейн С.В.^{1,2}, Шаравьева И.Л.¹

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

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

Резюме. Эндогенная опиоидная система играет важную роль в регуляции функций организма при стрессе, оказывая стресс-протективный, обезболивающий и иммунорегуляторный эффекты. Холодовой стресс является одной из форм стресса и индуцируется действием низкой температуры окружающей среды (воздух, вода). Как и при других видах стрессорных воздействий, при холодовом стрессе имеет место активация симпатического отдела нервной системы и гипоталамо-гипофизарной оси. Цель данной работы – оценка влияния острого холодового стресса на продукцию цитокинов адаптивного иммунитета IL-2, IL-4, IFN γ , фагоцитоз и продукцию активных форм кислорода у неиммунизированных мышей на фоне блокады опиоидных рецепторов *in vivo*. Объектом исследования являлись белые мыши-самцы, которые подвергались острому холодовому стрессу при -20 °С на протяжении 10 или 60 мин. Для блокады опиоидных рецепторов использовали налоксона гидрохлорид, который вводили подкожно в дозе 0,2 мг/кг за 20 мин до стресса. После окончания стрессорного воздействия у животных выделяли селезенку и клетки перитонеальной полости. Концентрации цитокинов (IL-2, IL-4, IFN γ) в культурах спленоцитов определяли с помощью твердофазного ИФА. Поглонительную активность CD11⁺ клеток перитонеальной полости оценивали с помощью FITC-окрашенных *St. cohnii* на проточном цитометре, продукцию активных форм кислорода оценивали с помощью реакции ЛЗХЛ. Установлено, что выраженный эффект двух вариантов острого холодового стресса был выявлен в отношении продукции IFN γ , обе экспериментальные модели налоксоннезависимо угнетали спонтанную продукцию IFN γ . В стимулированных культурах угнетающее влияние на секрецию IFN γ было зарегистрировано у животных, подвергнутых только 60-минутному стрессу, также не зависящее от блокады опиоидных рецепторов. Продукция IL-2 снижалась в стимулирован-

Адрес для переписки:

Гейн Сергей Владимирович
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-74-42.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: gein@iegm.ru

Address for correspondence:

Sergey V. Gein
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-74-42.
Fax: +7 (342) 280-92-11.
E-mail: gein@iegm.ru

Образец цитирования:

С.В. Гейн, И.Л. Шаравьева «Роль опиоидных рецепторов в регуляции фагоцитоза и продукции Th1/Th2 цитокинов при остром холодовом стрессе у неиммунизированных мышей» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 1. С. 7-14. doi: 10.46235/1028-7221-14713-ROO

© Гейн С.В., Шаравьева И.Л., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.V. Gein, I.L. Sharavieva "Role of opioid receptors in phagocytosis regulation and production of Th1/Th2 cytokines under acute cold stress in non-immune mice", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 1, pp. 7-14. doi: 10.46235/1028-7221-14713-ROO

© Gein S.V., Sharavieva I.L., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-14713-ROO

ных культурах на фоне 60-минутного стресса налоксоннезависимо. На продукцию IL-4 оба варианта холодого стресса влияния не оказывали. У животных, подвернутых стрессу в течение 60 мин, наблюдалось угнетение поглотительной активности CD11⁺ клеток перитонеального смыва и активация продукции кислородных радикалов, которые отменялись введением налоксона. Таким образом, острый холодого стресс приводил к налоксоннезависимому угнетению продукции Th1-цитокинов спленоцитами, налоксонзависимым угнетению фагоцитоза и активации микробицидного потенциала клеток перитонеальной полости.

Ключевые слова: мыши, холодого стресс, IL-4, IL-2, IFN γ , спленоциты, опиоидные рецепторы, фагоцитоз

ROLE OF OPIOID RECEPTORS IN PHAGOCYTOSIS REGULATION AND PRODUCTION OF Th1/Th2 CYTOKINES UNDER ACUTE COLD STRESS IN NON-IMMUNE MICE

Gein S.V.^{a, b}, Sharavieva I.L.^a

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

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

Abstract. Endogenous opioid system plays an important role in the regulation of body functions under stress, providing stress-protective, analgesic and immunoregulatory effects. The aim of this work was to assess the effect of acute cold stress on the *in vivo* production of adaptive immunity cytokines IL-2, IL-4, IFN γ , phagocytosis, and production of reactive oxygen species in non-immunized mice with induced blockage of opioid receptors. The object of the study were male white mice subjected to acute cold stress at -20 °C for 10 or 60 minutes. To block opioid receptors, naloxone hydrochloride was used, which was administered subcutaneously at a dose of 0.2 mg/kg 20 min before inducing the stress. After the cold exposure, spleen and peritoneal lavage were obtained from the animals. The cytokine concentrations were determined using ELISA technique. The absorption activity of CD11⁺ cells of the peritoneal cavity was assessed using FITC-stained *St.cohnii* with a flow cytometer; the production of reactive oxygen species was assessed using the reaction of luminol-dependent chemiluminescence.

It was found that the both cold stress regimens caused naloxone-independent inhibition of spontaneous IFN γ production. In stimulated cultures, an inhibitory effect on IFN γ secretion was registered in animals subjected to stress for only 60 min, being also independent on the opioid receptor blockade. IL-2 production decreased in stimulated cultures against the background of 60 min stress naloxone independently. Both variants of cold stress had no effect on IL-4 production. Stress for 60 min inhibited absorption activity of CD11⁺ cells from the peritoneal lavage and activated production of oxygen radicals, being, however, canceled by naloxone administration. Hence, acute cold stress led to naloxone-independent inhibition of Th1 cytokine production by splenocytes, naloxone-dependent inhibition of phagocytosis and activation of the microbicidal potential of peritoneal cavity cells.

Keywords: mice, cold stress, IL-4, IL-12, IFN γ , splenocytes, opioid receptors, phagocytosis

Исследования проведены в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы № 124020500027-7.

Введение

В настоящее время стресс — это общий профессиональный термин, используемый для опи-

сания любого физического, эмоционального, поведенческого ответа на угрожающие и провоцирующие факторы. Фактически стрессовый фактор представляет собой физический или психологический раздражитель, который может создавать психическое напряжение или физиологические реакции, вызывающие патологическое состояние [7]. Различные экстремальные

факторы внутренней и внешней среды приводят к выраженной нейроэндокринной реакции, активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и, как следствие, существенным изменениям в функционировании целого ряда органов и систем, в том числе и иммунитета [11]. Холодовой стресс является одной из форм стресса и индуцируется действием низкой температуры окружающей среды (воздух, вода). При воздействии на организм данной стрессорной модели, как и при других видах стрессорных воздействий, имеет место активация симпатического отдела нервной системы и гипоталамо-гипофизарной оси [13].

Известно, что различные по характеру варианты стресса оказывают широкий спектр иммуномодулирующих эффектов, и холодовой стресс здесь не исключение. Показано, что воздействие низких температур приводит к существенным колебаниям в работе врожденного и адаптивного звеньев иммунитета [18], однако направленность эффектов может зависеть от целого ряда сопутствующих факторов, таких как условия, время воздействия и объект исследования [5, 6, 9]. В литературе есть данные, указывающие на то, что кратковременный повторяющийся холодовой стресс может оказывать стимулирующее действие на клеточно-опосредованное звено иммунитета [8], увеличивать активность и количество периферических естественных киллеров (NK) и CD8⁺T-лимфоцитов [17].

Эндогенная опиоидная система играет важную роль в регуляции функций организма при стрессе, оказывает стресс-протективный, обезболивающий и иммунорегуляторный эффекты. Показано, холодовой стресс модулирует уровни опиоидных пептидов в ЦНС и периферических тканях [13, 15], в то же время роль опиоидных рецепторов в регуляции функций клеток иммунной системы при холодовом стрессе изучена недостаточно. Ранее нами было показано, что острый холодовой стресс усиливает секрецию макрофагами активных форм кислорода, IL-10, не влияет на продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α [4] и модулирует секрецию Th1/Th2-цитокинов у иммунизированных мышей в зависимости от времени введения антигена [2].

В настоящей работе мы оценили влияние острого холодового стресса на продукцию цитокинов адаптивного иммунитета IL-2, IL-4, IFN γ , фагоцитоз и продукцию активных форм кислорода у неиммунизированных мышей на фоне блокады опиоидных рецепторов *in vivo*.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на белых мышах-самцах массой тела 20-22 г. Животные содержались в условиях лабораторного вивария, при естественном освещении, неограниченном доступе к воде и кормам. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Мыши подвергались острому холодовому стрессу при -20°C в течение 10 или 60 мин. Налоксона гидрохлорид (Московский эндокринный завод, Россия) вводили подкожно в дозе 0,2 мг/кг за 20 мин до стрессорного воздействия. Все животные были разбиты на следующие группы: 1-я – контрольная, 2-я – холодовой стресс 10 или 60 мин, 3-я – холодовой стресс 10 или 60 мин + налоксон, 4-я – один налоксон. Через 1 ч после окончания экспериментальных воздействий животных выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом и выделяли селезенку.

Для определения концентрации цитокинов в культурах спленоциты культивировали в среде RPMI (Gibco, Великобритания) 1640 с добавлением 10% инактивированной фетальной сыворотки (Calticorn Scientific, Германия), 100 ЕД/мл гентамицина (KRK), в 24-луночных планшетах, содержащих $2,5 \times 10^6$ кл/мл. В качестве индуктора использовали конконовалин А (Кон А, Sigma; 20 мкг/мл). Супернатанты 48 ч культур собирали в пробирки «Эппендорфф», замораживали и хранили при -20°C . Определение концентрации цитокинов (IL-2, IL-4, IFN γ) проводили с использованием иммуноферментных тест-систем (R&D, США).

Для оценки поглотительной активности клеток перитонеальной полости инактивированные нагреванием клетки *St. cohnii* окрашивали изоционатом флюоресцина (FITC). Объем 100 мкл FITC-меченых бактерий (10^9 клеток/мл) смешивали с равным объемом клеток перитонеального смыва (1×10^6), инкубировали в течение 30 мин при 37°C и промывали центрифугированием в фосфатно-солевом буфере. После чего окрашивали CD11b anti-mouse PE-окрашенными антителами (BioLegend, США). Результат оценивали с помощью проточного цитофлуориметра (Cytotflex, Beckman Coulter, США, программное обеспечение CytExpert). Гейт клеточной популяции определяли путем оценки фронтального и

бокового светорассеивания и размера клеток; в каждом гейте оценивали 50 000 клеток. Результаты представили, как процент CD11b позитивных клеток, захвативших FITC-меченые бактериальные клетки.

Генерацию активных форм кислорода перитонеальными макрофагами оценивали с помощью спонтанной и индуцированной реакции люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛХЗЛ). В 96-луночные непрозрачные белые плоскодонные планшеты вносили 10^5 клеток в 100 мкл раствора Хенкса. В качестве индуктора ЛХЗЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛХЗЛ использовался люминол 10^{-5} М. Регистрация результатов проводилась в течение часа с интервалом в 5 мин с помощью многофункционального спектрофотометра TECAN (Австрия).

Статистическая обработка результатов проведена с использованием факторного анализа и LSD-критерия для межгруппового сравнения. Все данные на рисунках представлены в виде средней и ее стандартной ошибки ($M \pm m$).

Результаты

Установлено, что выраженный эффект двух вариантов острого холодового стресса был выявлен в отношении продукции $IFN\gamma$. Как видно из

рисунка 1, обе экспериментальные модели угнетали спонтанную продукцию $IFN\gamma$. В стимулированных культурах угнетающее влияние на секрецию $IFN\gamma$ было зарегистрировано у животных, подвергнутых только 60-минутному стрессу. Более короткий 10-минутный стресс на стимулированную продукцию $IFN\gamma$ значимого влияния не оказывал, однако можно отметить имеющую место выраженную тенденцию к угнетению данного показателя. В группах животных, подвергнутых стрессу на фоне введения налоксона, угнетение продукции $IFN\gamma$ сохранялось. Оценка участия опиоидных рецепторов в регуляции продукции $IL-2$ и $IL-4$ при холодовом стрессе показала, что 60-минутный холодовой стресс угнетал стимулированную продукцию спленоцитами $IL-2$ (рис. 2). Как и в случае с $IFN\gamma$, этот эффект никак не зависел от введения мышам на фоне стресса налоксона гидрохлорида, на продукцию $IL-4$ оба варианта холодового стресса влияния не оказывали (рис. 3).

При оценке влияния обоих вариантов холодового стресса на поглотительную активность клеток перитонеальной полости мышей было установлено, что у животных, подвергнутых стрессу в течение 60 мин, наблюдалось снижение процента фагоцитоза $CD11^+$ клеток перитонеального смыва, которая отменялась введением мышам налоксона. Экспозиция мышей при -20° в течение

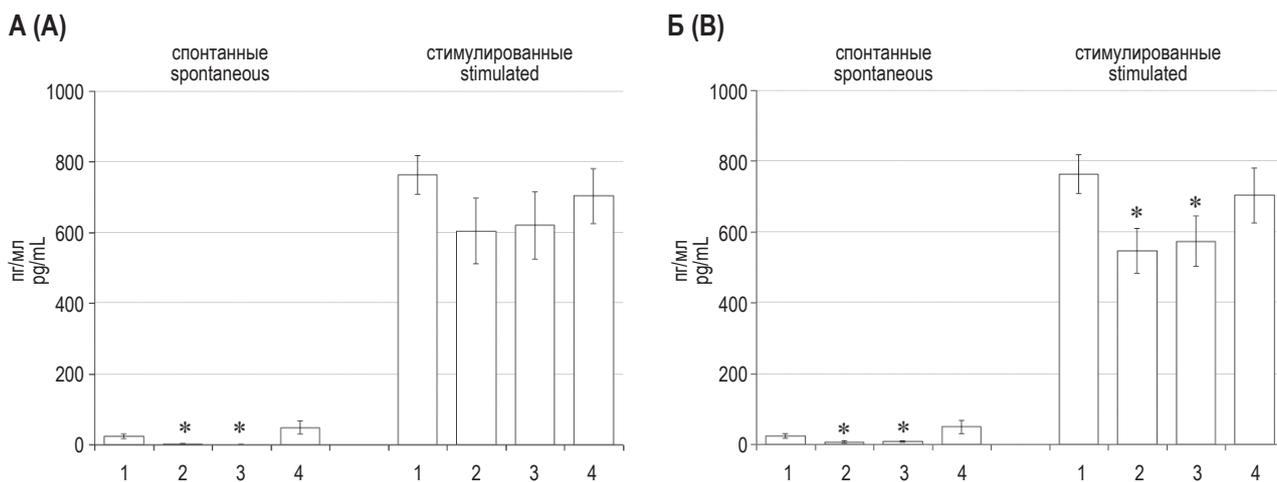


Рисунок 1. Влияние 10 мин (А) и 60 мин (Б) холодового стресса на спонтанную и стимулированную продукцию $IFN\gamma$ спленоцитами мыши в условиях блокады опиатных рецепторов

Примечание. По оси абсцисс: 1 – контроль, 2 – стресс, 3 – стресс на фоне введения налоксона, 4 – налоксон. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю, ($n = 9$).

Figure 1. Effect of 10 min (A) and 60 min (B) cold stress on spontaneous and stimulated production of $IFN\gamma$ by mouse splenocytes under conditions of blockade of opiate receptors

Note. On the abscissa: 1, control; 2, stress; 3, stress and naloxone; 4, naloxone. *, $p < 0.05$ in relation to observation, ($n = 9$).

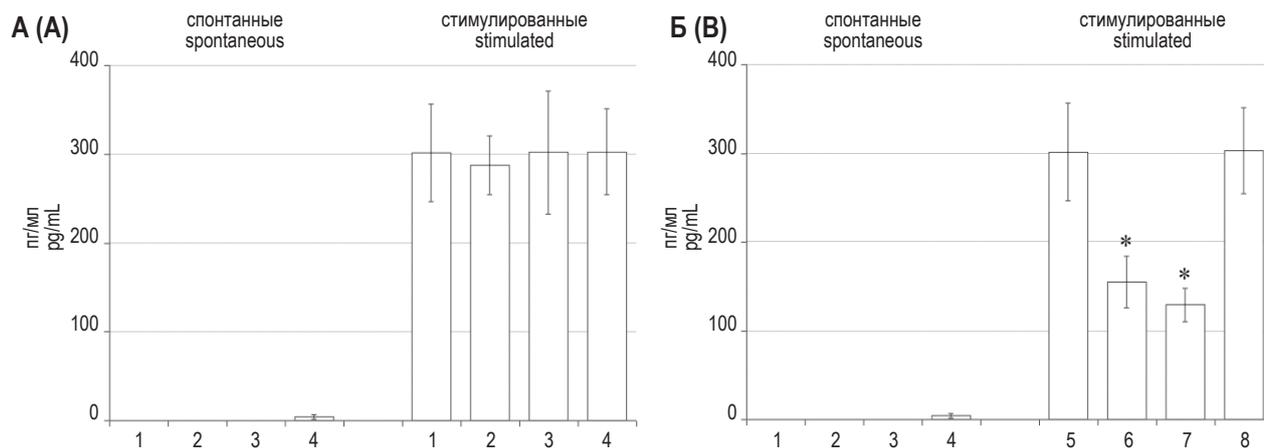


Рисунок 2. Влияние 10 мин (А) и 60 мин (Б) холодого стресса на спонтанную и стимулированную продукцию IL-2 спленоцитами мыши в условиях блокады опиатных рецепторов

Примечание. По оси абсцисс: 1 – контроль, 2 – стресс, 3 – стресс на фоне введения налоксона, 4 – налоксон. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю, (n = 9).

Figure 2. Effect of 10 min (A) and 60 min (B) cold stress on spontaneous and stimulated production of IL-2 by mouse splenocytes under conditions of blockade of opiate receptors

Note. On the abscissa: 1, control; 2, stress; 3, stress and naloxone; 4, naloxone. *, $p < 0.05$ in relation to observation, (n = 9).

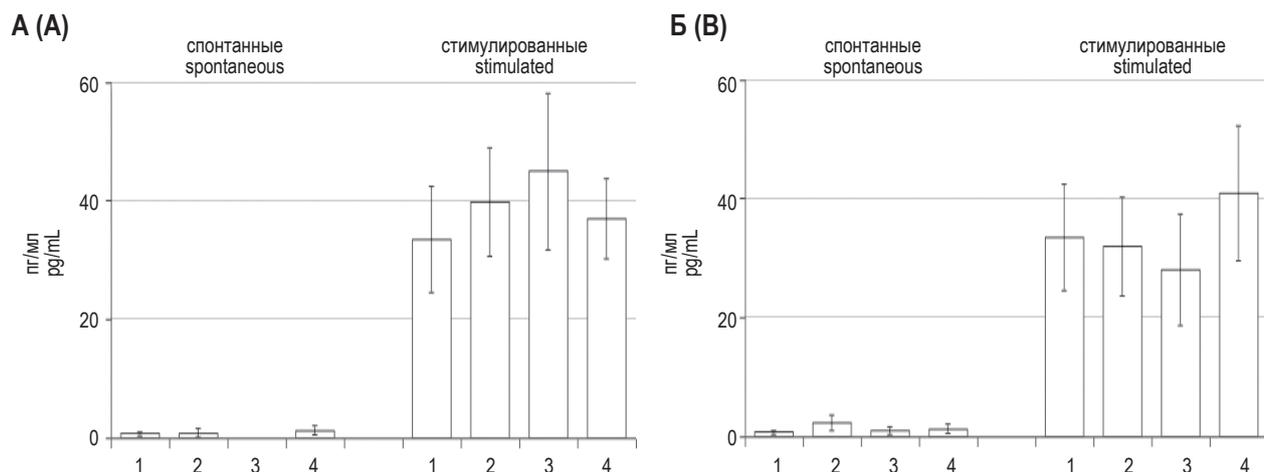


Рисунок 3. Влияние 10 мин (А) и 60 мин (Б) холодого стресса на спонтанную и стимулированную продукцию IL-4 спленоцитами мыши в условиях блокады опиатных рецепторов

Примечание. По оси абсцисс: 1 – контроль, 2 – стресс, 3 – стресс на фоне введения налоксона, 4 – налоксон. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю, (n = 9).

Figure 3. Effect of 10 min (A) and 60 min (B) cold stress on spontaneous and stimulated production of IL-4 by mouse splenocytes under conditions of blockade of opiate receptors

Note. On the abscissa: 1, control; 2, stress; 3, stress and naloxone; 4, naloxone. *, $p < 0.05$ in relation to observation, (n = 9).

10 мин также приводила к снижению фагоцитарной активности клеток перитонеальной полости, однако данное снижение носило характер тенденции, статистически недостоверной (рис. 4). Также сразу после окончания стресса мы проводили оценку продукции АФК клетками перитонеальной полости мышей. Установлено, что в стимулированных зимозаном культурах (рис. 5)

10-минутный холодовой стресс не влиял на продукцию АФК и стимулировал данный показатель в группе животных, подвергнутых стрессу на фоне введения налоксона. В группе животных, подвергнутых 60-минутному стрессу, напротив, наблюдалась стимуляция продукции АФК с 5 по 55 мин наблюдения, которая отменялась на фоне введения животным налоксона.

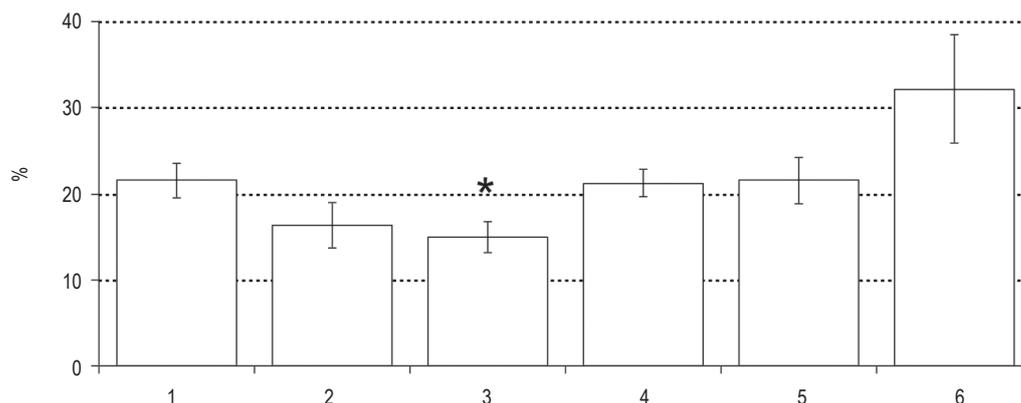


Рисунок 4. Влияние 10 мин и 60 мин холодого стресса на поглотительную активность CD11⁺ клеток перитонеального смыва мыши в условиях блокады опиатных рецепторов

Примечание. По оси ординат: процент CD11⁺ клеток, поглотивших микроорганизмы. По оси абсцисс: 1 – контроль, 2 – стресс 10 мин, 3 – стресс 60 мин, 4 – стресс 10 мин на фоне введения налоксона, 5 – стресс 60 мин на фоне введения налоксона, 6 – налоксон. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю, (n = 9).

Figure 4. Influence of 10 min and 60 min cold stress on the phagocytosis of CD11⁺ mouse peritoneal lavage cells under conditions of blockade of opiate receptors

Note. Abscissa axis: 1, control; 2, 10 min stress; 3, 60 min stress; 4, 10 min stress against the background of naloxone administration; 5-60 min stress against the background of naloxone administration; 6, naloxone. *, $p < 0.05$ in relation to the control, (n = 9).

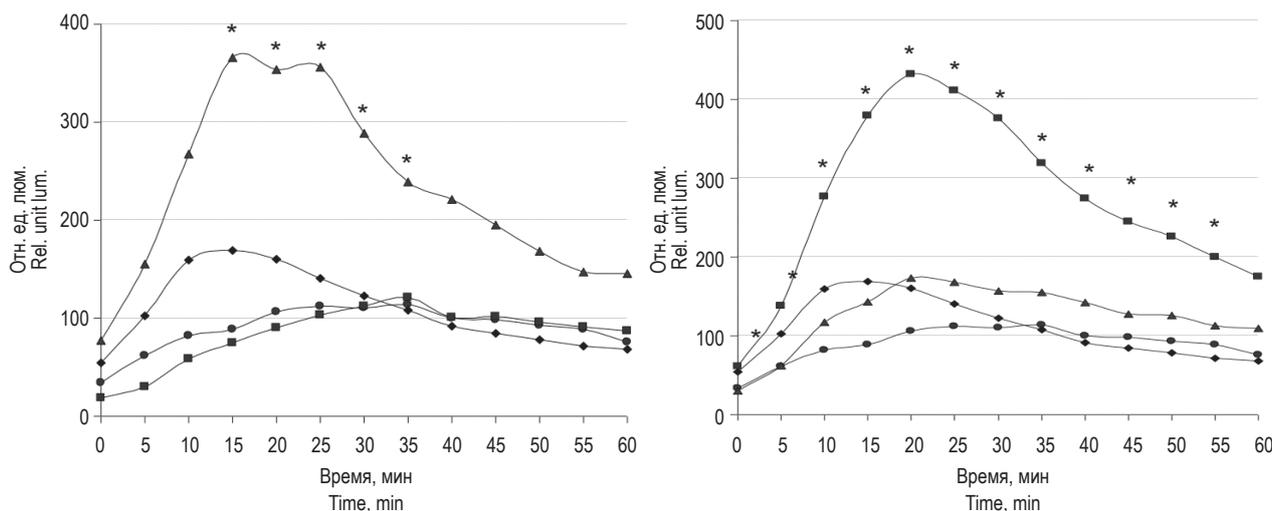


Рисунок 5. Влияние 10 мин (А) и 60 мин (Б) холодого стресса на стимулированную продукцию АФК перитонеальными клетками мыши в условиях блокады опиатных рецепторов

Примечание. ● – контроль, ■ – стресс 10 или 60 мин, ▲ – стресс на фоне блокады опиатных рецепторов, ◆ – налоксон. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю, (n = 9).

Figure 5. Effects of 10 min (A) and 60 min (B) cold stress on stimulated ROS production by mouse peritoneal cells under conditions of blockade of opiate receptors

Note. ●, контроль; ■, стресс 10 или 60 мин; ▲, стресс на фоне блокады опиатных рецепторов; ◆, налоксон. *, $p < 0.05$ по отношению к контролю, (n = 9).

Обсуждение

Подводя общий итог, можно сказать, что острый холодовой стресс угнетает продукцию цитокинов, ответственных за процесс Th1-поляризации Т-клеток и, как следствие, тормозит реакции клеточного звена иммунитета у неиммунизированных (интактных) мышей. Параллельно с этим, холодовой стресс угнетает такой важный

показатель, как фагоцитоз, и активирует продукцию кислородных радикалов, которые, наряду с микробицидным, обладают выраженным повреждающим эффектом, в том числе по отношению к клеткам иммунной системы [12].

Накопленные в литературе данные об иммуномодулирующих эффектах холодого стресса достаточно противоречивы и неоднозначны [2, 13]. Результаты настоящей работы указывают на по-

давление реакций клеточного иммунитета и фагоцитоза, что делает холодовой стресс, даже кратковременный, крайне негативным воздействием, которое способствует увеличению риска развития вирусных инфекций и опухолей. В ряде исследований установлено, что содержание мышей при субоптимальных температурах повышает риск развития опухолей, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных расстройств [16]. В то же время в литературе присутствуют данные, указывающие на возможность стимуляции фагоцитоза, цитолитической активности NK и CD8⁺ клеток, продукции IL-2 и IFN γ [13, 19], а также высказывается предположение, что умеренный холодовой стресс может быть полезен, в частности для усиления противоопухолевого иммунитета. Ранее нами было показано, что острый холодовой стресс может оказывать стимулирующее действие на антителогенез, продукцию IL-2 и IL-4, но только через сутки после введения антигена. Если стрессорное воздействие производилось до иммунизации, стимулирующего действия не наблюдалось [2].

Интерпретация роли эндогенной опиоидной системы в иммуномодулирующих эффектах стресса является не простой задачей. Ранее нами было показано, что отдельные модулирующие эффекты стресса, а также опиоидных пептидов не отменялись налоксоном как *in vitro*, так и *in vivo* [1, 2, 3]. Динамика различных иммунологических показателей на фоне блокады опиоидных рецепторов в различных моделях стресса может меняться разнонаправлено, показывая зависимость от целого ряда факторов, таких как модель стресса, время

действия, наличие антигенной стимуляции, доза антагониста и т. д. В настоящее время известно, что все три типа рецепторов (μ , δ , κ) имеют схожую структуру и с высокой степенью аффинности связывают представителей одного из семейств эндогенных опиоидных пептидов (эндорфины, эндоморфины, энкефалины, динорфины), однако с более низким сродством могут связывать и «не свои» лиганды. Интересным является тот факт, что, в отличие от эндогенных пептидов, их синтетические аналоги взаимодействуют со всем спектром опиоидных рецепторов беспорядочно [14]. Известно, что в пределах опиоидных рецепторов могут существовать отдельные сайты для связывания пептидных и непептидных агонистов [10], помимо этого специфичность рецепторов может постоянно претерпевать некоторые изменения из-за процесса альтернативного сплайсинга. Как показано в настоящей работе, если продукция Th1-цитокинов (IL-2, IFN γ) угнеталась налоксоном-независимо, то изменение показателей врожденного иммунитета отменялось блокадой опиоидных рецепторов.

Заключение

Таким образом, по нашему мнению, при остром холодовом стрессе блокада опиоидных рецепторов модифицирует только отдельные показатели и в большей степени со стороны врожденного иммунитета, в регуляции реакций адаптивного иммунитета опиоидная система при холодовом стрессе принимает довольно скромное участие.

Список литературы / References

1. Гейн С.В., Баева Т.А., Гейн О.Н., Черешнев В.А. Роль моноцитов в реализации эффектов β -эндорфина и селективных агонистов μ - и δ -опиатных рецепторов на пролиферативную активность лимфоцитов периферической крови // Физиология человека, 2006. Т. 32, № 3. С 111-116. [Gein S.V., Baeva T.A., Gein O.N., Chereshev V.A. The role of monocytes in the effects of beta-endorphin and selective agonists of mu- and delta-Opiate receptors on the proliferative activity of peripheral blood lymphocytes. *Fiziologiya cheloveka = Human Physiology*, 2006, Vol. 32, no. 3, pp. 111-116. (In Russ.)]
2. Гейн С.В., Брагина Н.А., Шаравьева И.Л. Влияние стресса на антителогенез, продукцию IL-2, IL-4, IFN- γ в зависимости от времени введения антигена и оценка роли опиоидных рецепторов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2023. Т. 175. № 3. С. 298-304. [Gein S.V., Bragina N.A., Sharav'eva I.L. Effect of stress on the production of antibodies and IL-2, IL-4, IFN γ depending on the time of antigen administration and evaluation of the role of opioid receptors. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2023, Vol. 175, no. 3, pp. 298-304. (In Russ.)]
3. Гейн С.В., Кадочникова Я.А. Влияние эндоморфинов-1,2 на функциональную активность нейтрофилов и моноцитов периферической крови *in vitro* // Физиология человека, 2021. Т. 47, № 6. С. 65-71. [Gein S.V., Kadochnikova Y.A. Effect of endomorphins-1, 2 on functional activity of neutrophils and peripheral blood monocytes *in vitro*. *Fiziologiya cheloveka = Human Physiology*, 2021, Vol. 47, no. 6, pp. 65-71. (In Russ.)]
4. Гейн С.В., Шаравьева И.Л. Влияние холодового стресса на функциональную активность перитонеальных макрофагов мыши в условиях блокады опиатных рецепторов // Российский физиологический журнал им. Сеченова, 2016. Т. 102, № 2. С. 188-194. [Gein S.V., and Sharav'eva I.L. Effects of cold stress on the functional activity of mouse peritoneal macrophages in conditions of opiate receptor. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova = I. Sechenov Russian Physiological Journal*, 2016, Vol. 102, no. 2, pp. 188-194. (In Russ.)]

5. Макарова О.В., Трунова Г.В., Диатроптов М.Е., Серебряков С.Н., Кондашевская М.В., Малайцев В.В. Сравнительная характеристика продукции цитокинов активированными конканавалином А спленоцитами мышей BALB/C и C57B1/6 при холодовом воздействии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2005. Т. 139, № 2. С. 188-190. [Makarova O.V., Trunova G.V., Diatroptov M.E., Serebryakov S.N., Kondashevskaya M.V., Malaitsev V.V. Comparative characterization of cytokine production by concanavalin A-activated splenocytes from BALB/c and C57BL/6 mice after cold exposure. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2005, Vol. 139, no. 2, pp. 188-190. (In Russ.)]
6. Aviles H., Johnson M.T., Monroy F.P. Effects of cold stress on spleen cell proliferation and cytokine production during chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroimmunomodulation*, 2004, Vol. 11, pp. 93-102.
7. Bali A., Randhawa P. K., Jaggi A. S. Stress and opioids: Role of opioids in modulating stress-related behavior and effect of stress on morphine conditioned place preference. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2015, Vol. 51, pp. 138-150.
8. Banerjee S.K., Aviles H., Fox M.T., Monroy F.P. Cold stress-induced modulation of cell immunity during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Parasitol.*, 1999, Vol. 85, no. 3, pp. 442-447.
9. Hangalapura B.N., Kaiser M.G., Poel J.J., Parmentier H.K., Lamont S. Cold stress equally enhances in vivo pro-inflammatory cytokine gene expression in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Dev. Comp. Immunol.*, 2006, Vol. 30, pp. 503-511.
10. Manglik A., Kruse A.C., Kobilka T.S., Thian F.S., Mathiesen J.M., Sunahara R.K., Pardo L., Weis W.I., Kobilka B.K., Granier S. Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 2012, Vol. 485, pp. 321-326.
11. McEwen B.S., Biron C.A., Brunson K.W., Bulloch K., Chambers W.H., Dhabhar F.S., Goldfarb R.H., Kitson R.P., Miller A.H., Spencer R.L., Weiss J.M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 1997, Vol. 23, pp. 79-133.
12. Palermo-Neto J., de Oliveira Massoco C., Robespierre de Souza W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav. Immun.*, 2003, Vol. 17 no. 1, pp. 43-54.
13. Shevchuk N.A., Radoja S. Possible stimulation of anti-tumor immunity using repeated cold stress: a hypothesis. *Infect. Agent Cancer*, 2007, Vol. 2, no. 20, pp. 1-9.
14. Smith E.M. Neuropeptides as signal molecules in common with leukocytes and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Behav. Immun.*, 2008, Vol. 22, no. 1, pp. 3-14.
15. Vaswani K.K., Richard C.W., Tejwani G.A. Cold swim stress-induced changes in the levels of opioid peptides in the rat CNS and peripheral tissues. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1988, Vol. 29, no. 1, pp. 163-168.
16. Vialard F., Olivier M. Thermoneutrality and immunity: how does cold stress affect disease? *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 588387. doi: 10.3389/fimmu.2020.588387.
17. Willemsen G., Carroll D., Ring C., Drayson M. Cellular and mucosal immune reactions to mental and cold stress: associations with gender and cardiovascular reactivity. *Psychophysiology*, 2002, Vol. 39, no. 3, pp. 222-228.
18. Zhang Z., Chen B., Yuan L., Niu C. Acute cold stress improved the transcription of pro-inflammatory cytokines of Chinese soft-shelled turtle against *Aeromonas hydrophila*. *Dev. Comp. Immunol.*, 2015, Vol. 49, no. 1, pp. 127-137.
19. Zhao F.Q., Zhang Z.W., Qu J.P., Yao H.D., Li M., Li S., Xu S.W. Cold stress induces antioxidants and Hsps in chicken immune organs. *Cell Stress Chaperones*, 2014, Vol. 19, pp. 635-648.

Авторы:

Гейн С.В. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»; директор Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Шаравьева И.Л. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Authors:

Gein S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University; Director, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Sharavieva I.L., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Developmental Biochemistry of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 13.08.2023
Принята к печати 03.10.2023

Received 13.08.2023
Accepted 03.10.2023

СПОНТАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, ЛИМФОУЗЛОВ, СЕЛЕЗЕНКИ, ТИМУСА И КОЖИ В МОДЕЛИ ОСТРОГО ПСОРИАЗОПОДОБНОГО ДЕРМАТИТА У МЫШЕЙ

Сорокина Е.В.^{1,2}, Ахматова Э.А.¹, Столпникова В.Н.¹,
Калиниченко Е.О.¹, Бишева И.В.¹, Сходова С.А.¹

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

² Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» России, Москва, Россия

Резюме. Для изучения патогенетических механизмов псориаза и применения новых терапевтических средств для его лечения широко применяется имиквимод-индуцированная модель псориаза на мышах. Имиквимод в виде кожных аппликаций, являясь модификатором иммунного ответа, запускает сложный многостадийный процесс, имитирующий псориазическое воспаление кожных покровов, сопровождающееся изменением продукции цитокинов. Целью данной работы стало комплексное изучение спонтанной продукции цитокинов в супернатантах клеток, выделенных не только из кожи и крови, но и из центральных и периферических лимфоидных органов и влияние на него имиквимода. 46 мышей линии C57BL/6 были распределены в две группы – контрольную (n = 22) и опытную (n = 24). Формирование экспериментальной патологии было проведено по методу L. van der Fits и соавт. Мышам опытной группы в течение 7 дней наносили крем, содержащий 5%-ный имиквимод (62,5 мг/см²/сутки/мышь). Интенсивность кожного воспаления оценивали по балльной шкале. На 7-й день эксперимента были взяты пробы крови, извлекали селезенку, лимфатические узлы, тимус, а также получали биоптат кожи размерами 2/2 см. Для получения клеточной суспензии биоптата селезенки, лимфатических узлов, тимуса измельчали в гомогенизаторе, а затем пропускали через клеточные фильтры с диаметром пор 50 мкм. Для изоляции клеток из кожи применяли метод спонтанной миграции. Культуру клеток периферической крови, селезенки, лимфатических узлов, тимуса, кожи инкубировали 24 часа в RPMI-1640, затем исследовали спонтанную продукцию цитокинов. Уровень

Адрес для переписки:

Сорокина Екатерина Вячеславовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»,
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел./факс: 8 (495) 917-49-00.
E-mail: sorokina-cathrine@yandex.ru

Address for correspondence:

Ekaterina V. Sorokina
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera,
5a Maly Kazenny Lane
Moscow
105064 Russian Federation
Phone/fax: +7 (495) 917-49-00.
E-mail: sorokina-cathrine@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.В. Сорокина, Э.А. Ахматова, В.Н. Столпникова,
Е.О. Калиниченко, И.В. Бишева, С.А. Сходова
«Спонтанная продукция цитокинов в супернатантах
культур клеток, выделенных из периферической крови,
лимфоузлов, селезенки, тимуса и кожи в модели
острого псориазоподобного дерматита у мышей»
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,
№ 1. С. 15-22.
doi: 10.46235/1028-7221-15879-SCP

© Сорокина Е.В. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.V. Sorokina, E.A. Akhmatova, V.N. Stolpnikova,
E.O. Kalinichenko, I.V. Bisheva, S.A. Skhodova
“Spontaneous cytokine production by the cells from peripheral
blood, lymph nodes, spleen, thymus and skin in a murine
model of acute psoriasis-like dermatitis”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2024,
Vol. 27, no. 1, pp. 15-22.
doi: 10.46235/1028-7221-15879-SCP

© Sorokina E.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-15879-SCP

цитокинов определяли при помощи тест-системы Mouse Th1/Th2/Th17 Panel (Antigenix America) с использованием шариков, сенсibilизированных моноклональными антителами к цитокинам IFN γ (интерферон гамма), интерлейкинам IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α (фактор некроза опухоли альфа), IL-10. Проведенное исследование выявило, что клетки, выделенные из крови и других лимфоидных органов, в процессе культивирования синтезируют повышенные количества цитокинов, обладающих провоспалительным потенциалом, в первую очередь IL-1 и IL-17. Наиболее выраженные изменения цитокинового профиля наблюдаются в супернатантах культивируемых клеток крови, кожи и селезенки.

Ключевые слова: псориаз, имиквимод, воспаление, цитокины, Toll-like рецепторы

SPONTANEOUS CYTOKINE PRODUCTION BY THE CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD, LYMPH NODES, SPLEEN, THYMUS AND SKIN IN A MURINE MODEL OF ACUTE PSORIASIS-LIKE DERMATITIS

Sorokina E.V.^{a,b}, Akhmatova E.A.^a, Stolpnikova V.N.^a, Kalinichenko E.O.^a, Bisheva I.V.^a, Skhodova S.A.^a

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

^b Academy of Postgraduate Training FMBA, Moscow, Russian Federation

Abstract. Imiquimod-induced model of psoriasis in mice is used for the studies in psoriasis. Imiquimod administered as skin application triggers a complex multi-stage process simulating psoriatic inflammation of the skin, accompanied by changes in production of cytokines. The aim of this work was a comprehensive study of their contents in cell supernatants isolated from skin, blood, from central and peripheral lymphoid organs and the effect of imiquimod on these parameters. Forty-six C57BL/6 mice were divided into two groups: (1) control (n = 22), and (2) experimental (n = 24). Development of experimental pathology was evaluated by van de Fits et al. The mice from experimental group were treated with a cream containing 5% imiquimod (62.5 mg/cm²/day/mouse) for 7 days. On the 7th day of experiment, the animals were subject to blood sampling, extraction of spleen, lymph nodes, thymus, and skin biopsies were also made. To obtain cell suspensions, the tissues of spleen, lymph nodes, and thymus were crushed in a homogenizer, and then passed through cell filters (50 μ m pore size). The method of spontaneous migration was used to isolate skin cells. The cultures of blood, spleen, lymph nodes, thymus, and skin cells were incubated for 24 hours in RPMI-1640 followed by assessment of spontaneous cytokine production in supernatants. The cytokine level (IFN γ , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α , IL-10) was determined using the murine Th1/Th2/Th17 Panel test system. Our study revealed that the cells isolated from blood and lymphoid organs synthesize increased amounts of pro-inflammatory cytokines: IL-1 and IL-17. The most pronounced changes in the cytokine profile are observed in cell supernatants from blood, skin and spleen cultures.

Keywords: psoriasis, imiquimod, inflammation, cytokines, Toll-like receptors

Введение

Для исследования патогенетических механизмов развития псориаза и изучения новых терапевтических средств успешно применяется мышинная имиквимод-индуцированная модель псориаза [2, 12, 14]. Многочисленными исследованиями установлено, что псориаз относится к аутоиммунным заболеваниям, и в его течении важное участие принимают клеточные механизмы [6, 7, 8]. Поэтому получение сведений о

субпопуляционном составе клеток крови и способности их продуцировать широкий спектр цитокинов (провоспалительных, противовоспалительных, регуляторных) на разных стадиях патологического процесса несет важную информацию для иммунологов и дерматологов [5, 7, 9]. Применение имиквимод-индуцированной модели псориаза дает исследователям дополнительные возможности в виде изучения продукции цитокинов не только клетками крови, но и клетками, выделенными из кожи, а также селезенки,

лимфатических узлов и тимуса. При изучении опубликованных работ по данной теме нами встречались разрозненные данные по продукции отдельных цитокинов, клетками, выделенными из отдельных органов. Нами была поставлена задача комплексно изучить цитокиновые профили клеток не только крови, но и центральных и периферических лимфоидных органов экспериментальных животных.

Материалы и методы

Исследование проводилось на самках мышей линии C57BL/6, массой 18-20 г, полученных из питомника «Столбовая» Московской области. Животные были ранжированы путем случайного распределения на 2 группы. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. Опытная и контрольная группы животных содержались в соответствии с этическим требованиям фармакологического комитета (1999). На мышах группы 1 (опытная, n = 24) воспроизвели модель псориазоподобного дерматита с помощью индуктора патологии (имиквимод); группа 2, контрольная, (n = 22), не получала препаратов. За один день до начала исследования всем животным удаляли шерсть площадью примерно равной 6 см² (2 × 3 см) с помощью гипоаллергенного эпилирующего крема. Формирование экспериментальной патологии было проведено по методу L. van der Fits и соавт. (2009) [15], с дозой индуктора патологии (крем, содержащий 5%-ный имиквимод) 62,5 мг/см² в день на животное (ежедневная доза 3,125 мг активного соединения) в течение 7 дней. Кровь для иммунологических исследований отбирали в пробирки с гепарином в объеме 200 мкл на 7-й день исследования. У лабораторных животных извлекали селезенку,

лимфатические узлы (подмышечные, паховые), тимус, а также получали биоптат кожи размерами 2 × 2 см (в месте формирования патологии, у здоровых мышей — в этой же локализации). Для изоляции клеток из кожи применяли метод спонтанной миграции [13].

Определение концентрации свободных цитокинов в супернатантах мононуклеарных лейкоцитов (МНЛ) периферической крови, селезенки, лимфоузлов, тимуса и кожи мышей

Культуру МНЛ периферической крови, селезенки, лимфатических узлов, тимуса, кожи инкубировали 24 часа в ростовой среде RPMI-1640, затем исследовали спонтанную продукцию цитокинов в супернатантах МНЛ. Уровень цитокинов определяли при помощи тест-системы Mouse Th1/Th2/Th17 Panel (Antigenix America, каталожный номер MMX171, США) с использованием шариков, сенсibiliзированных моноклональными антителами к цитокинам: IFN γ (интерферон гамма), IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α (фактор некроза опухоли альфа), IL-10. Уровень цитокинов определяли согласно инструкции производителя с использованием проточного цитометра FC-500 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку материала проводили при помощи программного пакета WINMDI 2.8.

Результаты

При изучении спонтанной продукции отдельных цитокинов в супернатантах культур клеток, взятых из разных биологических систем, выявлены следующие особенности.

От мышей были получены кожные биоптаты, которые дезинтегрировали с получением отдельных клеток. Данные о цитокинах, продуцируемых клетками, изолированными из кожи, приведены в таблице 1. В процессе культивирования, МНЛ,

ТАБЛИЦА 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОНТАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР КЛЕТОК, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ КОЖИ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 (M \pm σ), пкг/мл

TABLE 1. DETERMINATION OF SPONTANEOUS CYTOKINE PRODUCTION IN CELL CULTURE SUPERNATANTS ISOLATED FROM THE SKIN OF C57BL/6 MICE (M \pm σ), pg/mL

Продукция цитокинов Cytokine production	IFN γ	IL-6	IL-5	IL-17A	IL-1A	TNF α	IL-10
Имиквимод IMQ	261,6 \pm 9,0*	46,5 \pm 4,6	121,5 \pm 64,5*	286,9 \pm 8,5*	195,6 \pm 8,8*	182,8 \pm 10,5	19,0 \pm 2,7
Контроль Control	204,8 \pm 16,3	49,0 \pm 4,1	59,9 \pm 6,6	116,6 \pm 9,7	62,8 \pm 6,2	172,4 \pm 7,9	15,2 \pm 4,8

Примечание. M – средняя арифметическая; σ – стандартное отклонение; * p < 0,05 – достоверность различий между группами мышей (Mann-Whitney U test).

Note. M, the arithmetic mean; σ , the standard deviation; * p < 0.05, the reliability of differences between groups of mice (Mann-Whitney U test).

ТАБЛИЦА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОНТАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 ($M \pm \sigma$), пкг/мл

TABLE 2. DETERMINATION OF SPONTANEOUS CYTOKINE PRODUCTION IN THE SUPERNATANTS OF MONONUCLEAR CELLS ISOLATED FROM THE PERIPHERAL BLOOD OF C57BL/6 MICE ($M \pm \sigma$), pg/mL

Продукция цитокинов Cytokine production	IFN γ	IL-6	IL-5	IL-17A	IL-1A	TNF α	IL-10
Имиквимод IMQ	261,3 \pm 12,7*	72,2 \pm 10,3*	164,8 \pm 13,1*	228,2 \pm 9,2*	201,8 \pm 20,0*	195,2 \pm 15,6	26,8 \pm 4,4*
Контроль Control	172,7 \pm 7,2	20,8 \pm 2,9	51,6 \pm 6,6	101,1 \pm 8,1	22,0 \pm 3,5 [#]	181,1 \pm 8,3	17,7 \pm 4,1

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОНТАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ КЛЕТОК, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 ($M \pm \sigma$), пкг/мл

TABLE 3. DETERMINATION OF SPONTANEOUS CYTOKINE PRODUCTION IN CELL SUPERNATANTS ISOLATED FROM LYMPH NODES OF C57BL/6 MICE ($M \pm \sigma$), pg/mL

Продукция цитокинов Cytokine production	IFN γ	IL-6	IL-5	IL-17A	IL-1A	TNF α	IL-10
Имиквимод IMQ	268,0 \pm 10,7*	83,1 \pm 8,4	146,5 \pm 8,9*	171,7 \pm 10,9*	152,6 \pm 9,6*	183,7 \pm 12,1	24,5 \pm 4,5
Контроль Control	226,6 \pm 6,1	81,6 \pm 5,3	147,1 \pm 6,1	137,3 \pm 5,9	13,2 \pm 3,5	188,2 \pm 12,1	24,0 \pm 4,1

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОНТАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР КЛЕТОК, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 ($M \pm \sigma$), пкг/мл

TABLE 4. DETERMINATION OF SPONTANEOUS CYTOKINE PRODUCTION IN CELL CULTURE SUPERNATANTS ISOLATED FROM THE SPLEEN OF C57BL/6 MICE ($M \pm \sigma$), pg/mL

Продукция цитокинов в супернатантах клеток селезенки Cytokine production in the supernatants of spleen cells	IFN γ	IL-6	IL-5	IL-17A	IL-1A	TNF α	IL-10
Имиквимод IMQ	257,4 \pm 9,7*	76,8 \pm 4,7*	169,2 \pm 7,5	209,9 \pm 11,5*	214,8 \pm 10,6*	195,9 \pm 11,9	22,9 \pm 3,5
Контроль Control	356,6 \pm 6,9	108,4 \pm 10,6	163,6 \pm 7,5	137,9 \pm 5,9	13,2 \pm 3,5	188,2 \pm 12,1	24,02 \pm 4,1

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОНТАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР КЛЕТОК, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ТИМУСА МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 ($M \pm \sigma$), пкг/мл

TABLE 5. DETERMINATION OF SPONTANEOUS CYTOKINE PRODUCTION IN CELL CULTURE SUPERNATANTS ISOLATED FROM THE THYMUS OF C57BL/6 MICE ($M \pm \sigma$), pg/mL

Продукция цитокинов Cytokine production	IFN γ	IL-6	IL-5	IL-17A	IL-1A	TNF α	IL-10
Имиквимод IMQ	310,1 \pm 8,6*	124,9 \pm 6,4*	165,6 \pm 9,1*	202,4 \pm 8,7*	295,1 \pm 7,9*	196,9 \pm 8,9*	25,9 \pm 4,1
Контроль Control	667,3 \pm 11,4	304,1 \pm 7,6	116,4 \pm 8,2	137,1 \pm 6,2	198,8 \pm 6,3	23,12 \pm 4,50	25,7 \pm 5,7

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

выделенные из воспаленного очага, продуцировали повышенные уровни таких цитокинов, как IL-1A (повышение в 3,1 раза), IL-17 (в 2,4 раза), IL-5 (в 2,1 раза), IFN γ (в 1,3 раза). Содержание IL-6, TNF α и IL-10 было сопоставимо с контрольной группой. Так как продукция IL-10 достоверно не повышалась, баланс провоспалительных/противовоспалительных цитокинов был сдвинут в сторону преобладания воспалительных процессов. В связи с этим местное воспаление кожных покровов перерастало в системное.

Оценивая спонтанную продукцию цитокинов в супернатантах мононуклеаров периферической крови мышей (табл. 2), обращает на себя внимание, что у мышей с острым воспалением достоверно повышенными оказались почти все изучаемые цитокины (за исключением TNF α). Более всего была повышена продукция IL-1A (201,8 \pm 20,0 по сравнению с контролем 22,0 \pm 3,5) – в 9,1 раза; IL-6 (72,0 \pm 10,3 по сравнению с контролем 20,9 \pm 2,6) – повышение концентрации в 3,6 раза, IL-5 (164,8 \pm 13,1 по сравнению с контролем 51,6 \pm 6,6) – повышение в 3,2 раза, IL-17A (228,2 \pm 9,2 по сравнению с контролем 101,1 \pm 8,1) – выше в 2,3 раза по сравнению с контрольными мышами.

Спонтанная продукция цитокинов в супернатантах клеток, выделенных из лимфоузлов мышей (табл. 3), характеризуется несколько меньшей интенсивностью по сравнению с клетками крови. Однако и в этом исследуемом биоматериале были выявлены достоверные изменения. Максимально повышенным – в 1,9 раза, оказался синтез IL-1A (152,6 \pm 9,6 против 79,1 \pm 5,8), затем IFN γ в 1,6 раза (268,0 \pm 10,7 против 167,0 \pm 4,5). Уровень IL-6, IL-5 и IL-17 был выше по сравнению с интактными мышами в 1,3-1,2 раза. Продукция TNF α и IL-10 была сопоставима со значениями контрольной группы.

Спонтанная продукция цитокинов в супернатантах спленоцитов носит разнонаправленный характер (табл. 4). Уровень двух цитокинов – IL-1A (214,8 \pm 10,6 против 13,2 \pm 3,5) и IL-17A (209,9 \pm 11,5 против 137,9 \pm 5,9) был повышен по сравнению с контрольной группой в 16,1 и 1,5 раза. В то же время продукция IL-6 (76,8 \pm 4,7 против 108,4 \pm 10,6) и IFN γ (257,4 \pm 9,7 против 356,6 \pm 6,9) была ниже, чем в супернатантах МНЛ селезенки контрольных мышей. Значения концентрации IL-5, TNF α и IL-10 были сопоставимы с контрольной группой.

При анализе цитокинов, продуцируемых культурами клеток, выделенных из тимуса (табл. 5), в группе воспроизводимой модели воспаления по сравнению с контролем было выявлено угнетение продукции части цитокинов – IL-6 (99,0 \pm 28,0 против 460,3 \pm 52,6), IFN γ (267,0 \pm 47,0 против 517,1 \pm 70,4), IL-5 (157,0 \pm 12,0 против 291,9 \pm 28,9), IL-10 (24,0 \pm 5,0 против 39,7 \pm 5,1) в 4,6, 1,9, 1,9 и 1,6 раза соответственно. Однако уровень IL-1A (266,0 \pm 31,0 против 194,5 \pm 23,9) был выше в 1,4 раза по сравнению с контролем. Уровень продукции IL-10 был схожим в сравниваемых группах.

Мониторинг концентрации цитокинов показал изменение уровня провоспалительных цитокинов (IL-1 α , IL-6, IL-17, IFN γ), продукция противовоспалительного цитокина IL-10 была повышена только в супернатантах культуры МНЛ крови.

Обсуждение

Имиквимод, нанесенный на интактную кожу, путем связывания с TLR 7-го типа на дендритных клетках, в частности клетках Лангерганса, непосредственно вмешиваясь в процесс цитокиновой регуляции и запуская выраженную гиперпродукцию целого ряда провоспалительных цитокинов, запускает патологический процесс [1, 10, 11]. Как

видно из представленных данных, несмотря на то, что индуктор патологии — имиквимод поступал в организм мышей через кожу, его введение оказало системное воздействие — воспалительная реакция не ограничилась кожными покровами, а протекала в центральных и периферических иммунных органах.

Сравнивая спонтанную продукцию цитокинов в супернатантах клеток, выделенных из разных биолокусов, обращает на себя внимание, что максимально заметные изменения в интенсивности синтеза медиаторов иммунного ответа наблюдаются в крови мышей.

Наиболее выраженная реакция на поступление имиквимода в организм мышей наблюдался в отношении провоспалительного цитокина интерлейкина-1. Анализируя спонтанную продукцию этого цитокина у интактных мышей, видно, что в отсутствие воздействия индуктора патологии (имиквимода) у мышей наблюдается некий базовый уровень синтеза IL-1 (13-22 пкг), при этом в коже и тимусе синтез данного цитокина протекает более интенсивно (62 и 198 пкг), что можно объяснить тем, что даже здоровая кожа испытывает значительное антигенное воздействие. У мышей опытной группы, обработанных имиквимодом, в культурах клеток из всех изучаемых биолокусов наблюдалось повышенное накопление IL-1 в супернатантах. В крови, лимфоузлах и селезенке оно было очень выраженным. Наибольший рост концентрации IL-1 (16-кратный) был выявлен в супернатантах селезенки, а в коже и тимусе он был менее интенсивным, что связано с изначально более высокими концентрациями этого цитокина у интактных мышей.

Интересными были полученные данные по содержанию IL-6. У интактных мышей спонтанная продукция данного провоспалительного цитокина в отсутствие стимуляции имиквимодом была довольно значительной в культуре МНЛ крови, тимуса (304 пкг), а в культурах МНЛ селезенки, кожи и лимфоузлов синтез протекал менее интенсивно (108, 49 пкг). А в процессе воспроизведения модели острого псориазического воспаления наблюдалось угнетение синтеза данного цитокина в культурах МНЛ крови, тимуса и селезенки в 2,4 и 1,4 раза, а в культурах МНЛ лимфоузлов и кожи продукция IL-6 не различалась у мышей контрольной и экспериментальной групп.

Спонтанная продукция IL-17 у мышей контрольной группы находилась приблизительно на одном уровне во всех исследуемых биолокусах и колебалась в пределах 101,0-137,0 пкг. По современным представлениям, IL-17A вызывает пролиферацию кератиноцитов и является одним из главных эффекторов при псориазе [3, 4]. При

воздействии имиквимода на организм мышей наблюдалось усиление продукции данного провоспалительного цитокина в 1,2-2,4 раза, наиболее ошутимое в культуре МНЛ крови и кожи (в 2,2 и 2,4 раза).

Продукция TNF α в культуре МНЛ тимуса была незначительной и составляла 23 пкг, в то время как в культивируемых МНЛ из остальных биолокусов продукция была более интенсивной и варьировала в пределах от 172 пкг до 188 пкг. Имиквимод оказал свое воздействие на интенсивность продукции фактора некроза опухоли α только в культуре МНЛ тимуса, где наблюдалось усиление продукции в 8,5 раза, а в остальных исследуемых биолокусах не наблюдалось изменения продукции данного цитокина.

Культура МНЛ крови и кожи интактных мышей продуцировала в культуральную жидкость незначительные количества IL-5 (51 и 59 пкг), уровень продукции в культурах клеток из других биолокусов был более высоким в диапазоне от 116 пкг до 169 пкг. Под влиянием имиквимода синтез IL-5 усиливался в 1,4-3,2 раза в культурах МНЛ тимуса, кожи и крови, а в культурах МНЛ лимфоузлов и селезенки изменений продукции не наблюдалось.

Спонтанная продукция регуляторного цитокина IFN γ была достаточно интенсивной у мышей контрольной группы, особенно высоким этот синтез был в культуре МНЛ тимуса. Влияние имиквимода на продукцию IFN γ было разнонаправленным — в культуральных жидкостях селезенки и тимуса наблюдалось подавление синтеза цитокина в 1,4-2,1 раза, а в супернатантах МНЛ крови, лимфоузлов и кожи была замечена незначительная активизация продукции в 1,2-1,5 раза.

Заключение

Проведенное исследование свидетельствует о том, что при воспроизведении первичного имиквимод-индуцированного воспаления кожи мышей линии C57BL/6, клетки, выделенные из крови и других лимфоидных органов в процессе культивирования, синтезируют повышенные количества цитокинов, обладающих провоспалительным потенциалом. в первую очередь, IL-1 и IL-17, а также IFN γ , IL-6, которые поддерживают псориазоподобное воспаление. При этом роста продукции противовоспалительного цитокина — IL-10 не наблюдалось (кроме супернатантов МНЛ крови), что способствовало прогрессированию воспалительной реакции.

Список литературы / References

1. Бозрова С.В., Левицкий В.А., Недоспасов С.А., Друцкая М.С. Имиквимод: биохимические механизмы иммуномодулирующей и противовоспалительной активности // Биомедицинская химия, 2013. Т. 59, вып. 3. С. 249-266. [Bozrova S.V., Levitsky V.A., Nedospasov S.A., Drutskaya M.S. Imiquimod: The biochemical mechanisms of immunomodulatory and anti-inflammatory activity. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2013, Vol. 3, pp. 249-266. (In Russ.)]
2. Жуков А.С., Лавров Н.В., Хайрутдинов В.Р., Самцов А.В. Модели псориаза на лабораторных животных: современное состояние проблемы // Иммунология, 2019. Т. 40, № 2. С. 64-69. [Zhukov A.S., Lavrov N.V., Khairutdinov V.R., Samtsov A.V. Models of psoriasis on laboratory animals: current status of the problem. *Immunologiya = Immunology*, 2019, Vol. 40, no. 2, pp. 64-69. (In Russ.)]
3. Камиллов Ф.Х., Муфазалова Н.А., Капулер О.М., Разумная Ф.Г., Муфазалова Л.Ф. Цитокиновый дисбаланс в иммунопатогенезе псориаза // Фундаментальные исследования, 2015. №1 (ч. 5). С. 1065-1071. [Kamilov F.Kh., Mufazalova N.A., Kapuler O.M., Razumnaya F.G., Mufazalova L.F. Cytokine imbalance in the immunopathogenesis of psoriasis. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2015, no. 1, pp. 1065-1071. (In Russ.)]
4. Круглова Л.С., Моисеев С.В. Блокада интерлейкина-17 – новые горизонты эффективности и безопасности в лечении псориаза // Клиническая фармакология и терапия, 2017. № 26 (2). С. 5-12. [Kruglova L.S., Moiseev S.V. Inhibition of interleukin-17 – new horizons of efficacy and safety in the treatment of psoriasis. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya = Clinical Pharmacology and Therapy* 2017, no. 26 (2), pp. 5-12. (In Russ.)]
5. Меркушова Е.Д., Хасанова Е.М., Ганковская Л.В. Механизмы врожденного иммунитета в патогенезе псориаза: подходы к таргетной терапии // Медицинская иммунология, 2020. Т.22, № 3. С. 449-458. [Merkushova E.D., Khasanova E.M., Gankovskaya L.V. Mechanisms of innate immunity in pathogenesis of psoriasis: approaches to targeted therapy. *Medsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 449-458. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-MOI-1949.
6. Патрушев А.В., Самцов А.В., Никитин В.Ю., Сухарев А.В., Иванов А.М., Гумилевская О.П., Сухина И.А. Влияние очагов хронической инфекции на иммунный статус больных псориазом // Вестник дерматологии и венерологии, 2019. Т. 95, № 3. С. 16-24. [Patrushev A.V., Sukharev A.V., Nikitin V.Yu., Ivanov A.M., Sukhina I.A., Gumilevskaya O.P. Influence of focal infection on the cytokine profile in patients with chronic dermatosis. *Vestnik dermatologii i venerologii = Bulletin of Dermatology and Venereology*, 2019, Vol. 95, no. 3, pp. 16-24. (In Russ.)]
7. Пинегин Б.В., Иванов О.Л., Пинегин В.Б. Роль клеток иммунной системы и цитокинов в развитии псориаза // Российский журнал кожных и венерических болезней, 2013. № 3. С. 19-25. [Pinegin B.V., Ivanov O.L., Pinegin V.B. The role of immune cells and cytokines in the development of psoriasis. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney = Russian Journal of Skin and Venereal Diseases*, 2013, no. 3, pp. 19-25. (In Russ.)]
8. Сенникова С.В., Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Закиров Р.Ш., Акулова С.С. Субпопуляционный состав мононуклеаров и цитокиновый профиль венозной и капиллярной крови больных псориазом и здоровых людей // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1333-1346. [Sennikova S.V., Toptygina A.P., Semikina E.L., Zakirov R.Sh., Akulova S.S. Mononuclear subsets and cytokine profile of venous and capillary blood in patients with psoriasis and healthy people. *Medsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1333-1346. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-MSA-2391.
9. Симбирцев А.С., Тотолян А.А. Цитокины в лабораторной диагностике // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение, 2015. № 2. С. 82-98. [Simbirtsev A.S., Totolyan A.A. Cytokines in laboratory diagnostics. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2015, no. 2, pp. 82-98. (In Russ.)]
10. Смирнов В.С., Кудрявцева Т.А. Вартоцид (имиквимод). СПб.: Гиппократ, 2017. 144 с. [Smirnov V.S., Kudryavtseva T.A. Vartocid (imiquimod)]. St. Petersburg: Hippocrates, 2017. 144 p.
11. Bubna A.K. Imiquimod – its role in the treatment of cutaneous malignancies. *Ind. J. Pharmacol.*, 2015, Vol. 47, no. 4, pp. 354-363.
12. Conn M.P. Animal models for the study of human disease. London: Academic Press, 2017. 1200 p.
13. Richters C.D., Hoekstra M.J., du Pont J.S., Kreis R.W., Kamperdijk E.W. Isolation of human skin dendritic cells by in vitro migration. *Methods Mol. Med.*, 2001, Vol. 64, pp. 145-153.

14. Zhang S., Liu X., Mei L., Wang H. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation of BALB/c mice. *BMC Complement. Altern. Med.*, 2016, Vol. 16, no. 1, 334. doi: 10.1186/s12906-016-1325-4.

15. van der Fits L., Mourits S., Voerman J.S.A., Kant M., Boon L., Laman J.D., Cornelissen F., Mus A.-M., Florencia E., Prens E.P., Lubberts E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 9, pp. 5836-5845.

Авторы:

Сорокина Е.В. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии Академии постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» России, Москва, Россия

Ахматова Э.А. — младший научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Стопникова В.Н. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Калиниченко Е.О. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Бишева И.В. — научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Сходова С.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Sorokina E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Mechanisms of Regulation of Immunity, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Department of Dermatovenereology and Cosmetology, Academy of Postgraduate Education of the Federal State Budgetary Institution "Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency" of Russia, Moscow, Russia

Akhmatova E.A., Junior Research Associate, Laboratory of Therapeutic Vaccines, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Stolpnikova V.N., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Mechanisms of Regulation of Immunity, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Kalinichenko E.O., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Mechanisms of Regulation of Immunity, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Bisheva I.V., Research Associate, Laboratory of Mechanisms of Regulation of Immunity, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Skhodova S.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Mechanisms of Regulation of Immunity, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

КАРТИРОВАНИЕ IgE-ПЕРЕКРЕСТНОЙ АКТИВНОСТИ АЛЛЕРГЕНОВ СОИ Gly m 4, Gly m 5 И Gly m 6 У БОЛЬНЫХ С АТОПИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Самойликов П.В., Васильева Г.В., Конаныхина С.Ю.,
Поддубиков А.В.

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

Резюме. На сегодняшний день значительная часть потребляемой пищи состоит из множества различных ингредиентов. Белки соевых бобов стали активно использовать для производства таких комбинированных продуктов питания. Между тем белки сои могут содержать широкий спектр аллергенов, каждый из которых, присутствуя в небольшом количестве, способен провоцировать тяжелые аллергические реакции вследствие перекрестной реактивности.

Цель исследования – оценить распространенность сенсибилизации к алергокомпонентам сои Gly m 4, Gly m 5 и Gly m 6 и составить карту их IgE-перекрестной реактивности с гомологичными белками суперсемейств Bet v 1-подобных белков и белков-купинов у больных с атопическими заболеваниями.

Было проанализировано 54 образца сыворотки крови больных с подозрением на аллергические заболевания. В этих сыворотках определяли специфические IgE к 112 алергокомпонентам растительного и животного происхождения методом ImmunoCap ISAC (Phadia, Швеция). Статистическую обработку данных проводили при помощи программы MS Excel с использованием параметрических методов исследования.

У больных с атопическими заболеваниями sIgE к белкам сои были выявлены преимущественно к алергокомпоненту rGly m 4 (5 пациентов из 29; 17,24%). Среднее значение уровня этих антител по группе было выше нормы и составило $0,43 \pm 0,13$ ISU-E. Сенсибилизация к rGly m 5 (3 пациента из 29; 10,24%) и rGly m 6 (1 пациент из 29; 3,44%) была не такая значимая. Перекрестно-реагирующие sIgE выявлялись только к алергенам суперсемейства Bet v 1-подобных белков. Наиболее сильная зависимость была выявлена между уровнем sIgE к rGly m 4 и rBet v 1 ($R = 0,68$; $p = 0,001$). Еще одна IgE перекрестная реакция была найдена между rGly m 4 сои и rAln g 1 пыльцы ольхи ($R = 0,681$; $p = 0,000$). IgE-АТ к rGly m 4 могут также перекрестно связываться с rAct d 8 киви ($R = 0,59$; $p = 0,001$). Мы также выявили слабую достоверную корреляцию между уровнем sIgE к rGly m 4 сои и двум изоформам rCor a 1 фундука: rCor a 1.01 ($R = 0,42$; $p = 0,023$) и rCor a 1.04 ($R = 0,39$; $p = 0,036$). Изученный

Адрес для переписки:

Самойликов Павел Владимирович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (926) 707-41-52.
E-mail: samoilikov@mail.ru

Address for correspondence:

Pavel V. Samoylikov
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
5a Maly Kasenny Lane
Moscow
105064 Russian Federation
Phone: +7 (926) 707-41-52.
E-mail: samoilikov@mail.ru

Образец цитирования:

П.В. Самойликов, Г.В. Васильева, С.Ю. Конаныхина,
А.В. Поддубиков «Картирование IgE-перекрестной
активности аллергенов сои Gly m 4, Gly m 5
и Gly m 6 у больных с атопическими заболеваниями»
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,
№ 1. С. 23-32.
doi: 10.46235/1028-7221-16576-MOI

doi: 10.46235/1028-7221-16576-MOI

© Самойликов П.В. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

P.V. Samoylikov, G.V. Vasilyeva, S.Yu. Konanykhina,
A.V. Poddubikov "Mapping of IgE cross-reactivity of Gly m 4,
Gly m 5 and Gly m 6 soybean allergens in patients with
atopic diseases", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 1, pp. 23-32.
doi: 10.46235/1028-7221-16576-MOI

© Samoylikov P.V. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16576-MOI

нами профиль IgE-перекрестной активности аллергенов сои имеет важное значение для наилучшей стратегии тестирования на наличие причинно значимых аллергенов, что позволит избежать развитие скрытых перекрестных реакций, запускающих как оральные, так и респираторные аллергические процессы у людей с алергопатологией. Кроме того, это позволит назначать оптимальные диеты и разрабатывать технологические решения для создания гипоаллергенных продуктов питания.

Ключевые слова: IgE, соя, Gly m 4, Gly m 5, Gly m 6, перекрестная реакция

MAPPING OF IgE CROSS-REACTIVITY OF Gly m 4, Gly m 5 AND Gly m 6 SOYBEAN ALLERGENS IN PATIENTS WITH ATOPIC DISEASES

Samoylikov P.V., Vasilyeva G.V., Konanykhina S.Yu., Poddubikov A.V.

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

Abstract. Currently, a significant portion of the food consists of multiple different ingredients. Soybean proteins have been widely used for production of these combined foodstuffs. Meanwhile, soy proteins may contain a wide range of allergens, and even, if present in small amounts, they can cause severe allergic reactions due to cross-reactivity. The aims of our study were to evaluate the prevalence of sensitization to soybean allergen components Gly m 4, Gly m 5 and Gly m 6, and to map their IgE cross-reactivity with homologous proteins of Bet v1-like proteins and cupin proteins in patients with atopic disorders. We have studied IgE's to 112 allergenic components of plant and animal origin in blood sera from 54 patients with history of allergy, using the ImmunoCap ISAC method. The results were analyzed by means of MS Excel program using parametric statistical criteria. Results: In patients with atopic diseases, we have detected serum IgE to the rGly m 4 allergic component (5 patients out of 29; 17.24%). Frequency of sIgE detection to rGly m 5 (3 patients of 29; 10.24%) and rGly m 6 (1 patient of 29; 3.44%) was less pronounced. Cross-reactive sIgE was detected only to allergens of the Bet v1 superfamily. The strongest relationship was found between sIgE level to rGly m 4 and rBet v1 ($R = 0.68$; $p = 0.001$). Another IgE cross-reaction was found between soybean rGly m 4 and alder pollen rAln g1 ($R = 0.681$; $p = 0.000$). IgE antibodies to rGly m 4 may also cross-react with kiwi rAct d8 ($R = 0.59$; $p = 0.001$). We have also found a weak correlation between sIgE to soybean rGly m 4 and two hazelnut rCor a1 isoforms: rCor a 1.01 ($R = 0.42$; $p = 0.023$), and rCor a 1.04 ($R = 0.39$; $p = 0.036$). The IgE cross-reactivity profile of the soy allergens revealed in this study is important for improvement of testing strategy for the presence of causally significant allergens. This finding will help to avoid the development of hidden cross-reactions that trigger both oral and respiratory allergic processes in subjects with allergic pathology. Moreover, this will enable administration of optimal diets and develop technologies for development of hypoallergenic food products.

Keywords: IgE, soybeans, allergens, Gly m 4, Gly m 5, Gly m 6, cross-reactivity

Введение

В современном обществе питание становится все более разнообразным. Значительная часть потребляемой пищи готовится вне дома, а блюда часто состоят из множества различных ингредиентов. Начиная с прошлого века, белки соевых бобов (семян) стали активно использовать для производства комбинированных продуктов [3, 9]. Причем такие продукты могут содержать широкий спектр аллергенных белков, каждый из которых, присутствуя в небольшом количестве, не требует маркировки [11]. Такие «скрытые ал-

лергены» сои способны спровоцировать тяжелые аллергические реакции вследствие выраженной перекрестной реактивности [2].

В настоящее время идентифицировано 16 белковых молекул сои, которые могут вызывать сенсibilизацию у больных с atopическими заболеваниями. Эти аллергены выполняют разные биологические функции в клетках сои: метаболические, накопительные, рецепторные и защитные. Они принадлежат к 5 суперсемействам белков (проламины, дефензины, профилины, купины, а также Bet v 1-подобные белки) [8]. Белковые молекулы, входящие в состав одно-

го суперсемейства, характеризуются консервативными трехмерными структурами, что может привести к многочисленным перекрестным реакциям между паналлергенами растений. Однако наличие клинически значимых перекрестных реакций показано только между аллергенами с высокой гомологией в аминокислотной последовательности [10]. Например, суперсемейство белков проламинов содержит наибольшее количество аллергенов растительного происхождения. К этому суперсемейству принадлежат два аллергена сои Gly m 1 (семейство белков nsLTP) и Gly m 8 (семейство белков 2S альбумины), которые содержат характерную консервативную трехмерную структуру, но имеют низкую гомологию в аминокислотной последовательности или почти ее не имеют с аллергенами суперсемейства проламинов других растений. Наиболее часто IgE-перекрестные реакции с аллергенами сои могут возникать на белки, входящие только в два суперсемейства белков – Bet v 1-подобные белки (Gly m 4) и купины (Gly m 5 и Gly m 6).

Таким образом, **целью работы** является оценка распространенности сенсибилизации к аллергокомпонентам сои Gly m 4, Gly m 5 и Gly m 6 и составление карты их IgE-перекрестной реактивности с гомологичными белками суперсемейств Bet v 1-подобных белков и белков-купинов у больных с atopическими заболеваниями.

Материалы и методы

В общей сложности было проанализировано 54 образца сыворотки крови больных с подозрением на аллергические заболевания. В этих сыворотках определяли sIgE к 112 аллергокомпонентам растительного и животного происхождения методом ImmunoCap ISAC (Phadia, Швеция). Далее были отобраны 29 образцов сывороток больных atopическими заболеваниями (бронхиальная астма, риноконъюнктивит и atopический дерматит) с пищевой и ингаляционной сенсибилизацией, из них 14 мужчин (48%) и 15 женщин (52%). Средний возраст пациентов – 18 ± 15 лет (от 1 года до 55 лет). У этих больных определяли уровень sIgE к аллергокомпонентам суперсемейства Bet v 1-подобных белков (rBet v 1, rCor a 1.01, rAln g 1, rGly m 4, rAra h 8, rCor a 1.04, rAct d 8, rApi g 1, rMal d 1, rPru p 1, nCyn d 1, rPhl p 1, rPhl p 2, nPhl p 4, rPhl p 5), а также к аллергокомпонентам суперсемейства купинов (rAna o 2, rBer e 1, nCor a 9, rJug r 1, nJug r 2, nSes i 1, rAra h 1, rAra h 2, rAra h 3, nAra h 6, nGly m 5, nGly m 6, nFag e 2, rTri a 19.0101). Все исследования были проведены в соответствии с методическими рекомендациями производителя [5]. Повышенный уровень sIgE к изучаемым аллергенным молекулам находился в диапазоне от 0,3 ISU-E и выше

ТАБЛИЦА 1. ШКАЛА ЧЕДДОКА

TABLE 1. CHADDOCK SCALE

Коэффициент корреляции Пирсона Pearson's correlation coefficient	Сила связи Correlation strength
(0,0-0,3)	очень слабая very weak
(0,3-0,5)	слабая weak
(0,5-0,7)	средняя middle
(0,7-0,9)	высокая high
(0,9-1,0)	очень высокая very high

(0,3-1) ISU-E – 1-й класс аллергической реакции; (1-15) ISU-E – 2-й класс аллергической реакции; от 15 ISU-E включительно и выше – 3-й класс аллергической реакции. Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова» – при финансовой поддержке проекта Российской Федерации в лице Минобразования России, Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

Статистическую обработку данных проводили при помощи программы MS Excel с использованием параметрических методов исследования. Для описательной статистики использовали среднее значение и двойную стандартную ошибку. Корреляционный анализ проводили методом Пирсона. Силу связи коэффициента корреляции (R) определяли при помощи шкалы Чеддока (табл. 1). Критическую величину уровня значимости (p) приняли 0,05.

Результаты

Мы выявили повышенный уровень sIgE ко всем изучаемым аллергокомпонентам сои. При этом наиболее часто выявляли sIgE к rGly m 4 (5 пациентов из 29, 17,24%). Уровень этих антител составил $0,43 \pm 0,13$ ISU-E. Повышенный уровень sIgE к nGly m 5 ($0,34 \pm 0,07$ ISU-E) выявляли у 3 пациентов (10,34%). Уровень sIgE к Gly m 6 ($0,31 \pm 0,02$ ISU-E) был повышен только в сыворотке одного пациента (3,44%). Мы также определили уровень sIgE к другим представителям семейств Bet v 1-подобных белков и белков-купинов, чтобы оценить их IgE-перекрестную реактивность с аллергокомпонентами сои.

У всех больных был выявлен повышенный уровень sIgE к аллергокомпонентам суперсемейства Bet v 1-подобных белков (табл. 2), ко-

торый находился в диапазоне между 0,3 ISU-E и 61 ISU-E. Среди представителей этого суперсемейства наиболее часто выявляли sIgE к rBet v 1 и rMal d 1 (17 пациентов из 29; 58,62%), уровень которых составил $9,93 \pm 5,89$ ISU-E и $3,62 \pm 2,04$ ISU-E соответственно. Минимальная частота выявления sIgE к белкам данного семейства была к rApi g 1, rPhl p 2 и nPhl p 4 (4 пациента из 29;

13,79%), их уровень составил $0,43 \pm 0,14$ ISU-E; $1,2 \pm 0,9$ ISU-E и $0,49 \pm 0,21$ ISU-E соответственно.

Сенсибилизация к молекулам аллергенов купинов была менее выражена по сравнению с суперсемейством Bet v 1-подобных белков (табл. 2). Только в сыворотках 6 больных (20,68%) определялись sIgE к алергокомпонентам белков-купинов, их уровень варьировал от 0,3 ISU-E до 10

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ sIgE К АЛЛЕРГОКОМПОНЕНТАМ СУПЕРСЕМЕЙСТВ Bet v 1-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ И КУПИНОВ

TABLE 2. CONTENT OF sIgE TO ALLERGENS OF SUPERFAMILIES OF Bet v 1 LIKE PROTEINS AND CUPIN

Аллерген Allergen		Частота выявления повышенного уровня sIgE (%) High sIgE levels frequency (%)	Количество больных с повышенным уровнем sIgE Amount of patients with high sIgE levels	Среднее значение уровня sIgE (ISU-E) Mean of sIgE levels (ISU-E)	Удвоенная стандартная ошибка (ISU-E) Twice the Standard error (ISU-E)
суперсемейства Bet v 1 подобных белков superfamily Bet v 1 like proteins	rBet v 1	58,62	17	9,93	5,89
	rCor a 1.01	31,03	9	0,86	0,50
	rAln g 1	24,13	7	0,94	0,61
	rGly m 4	17,24	5	0,43	0,13
	rAra h 8	55,17	16	0,92	0,39
	rCor a 1.04	37,93	11	2,71	1,46
	rAct d 8	27,58	8	0,41	0,12
	rApi g 1	13,79	4	0,43	0,14
	rMal d 1	58,62	17	3,62	2,04
	rPru p 1	31,03	9	1,27	0,79
	nCyn d 1	20,68	6	1,27	1,48
	rPhl p 1	41,37	12	3,27	2,60
	rPhl p 2	13,79	4	1,20	0,9
	nPhl p 4	13,79	4	0,49	0,21
rPhl p 5	20,68	6	2,31	2,68	
суперсемейство белков купинов superfamily cupin proteins	rAna o 2	3,44	1	0,32	0,03
	rBer e 1	0	0	0,30	0,00
	nCor a 9	6,89	2	0,50	0,32
	rJug r 1	3,44	1	0,46	0,32
	nJug r 2	3,44	1	0,31	0,02
	nSes i 1	6,89	2	0,46	0,23
	rAra h 1	0	0	0,30	0,00
	rAra h 2	6,89	2	0,67	0,65
	rAra h 3	0	0	0,30	0,00
	nAra h 6	6,89	2	0,48	0,29
	nGly m 5	10,34	3	0,34	0,07
	nGly m 6	3,44	1	0,31	0,02
	nFag e 2	0	0	0,30	0,00
	rTri a 19.01	3,44	1	0,42	0,23
n = 29					

ISU-E. Частота выявления sIgE к rAna o 2, rJug r 1, nJug r 2, nGly m 6 и rTri a 19.01 была минимальна (1 пациент из 29, 3,44%). Уровень этих антител составил $0,32 \pm 0,03$ ISU-E; $0,46 \pm 0,32$ ISU-E; $0,31 \pm 0,02$ ISU-E; $0,31 \pm 0,02$ ISU-E и $0,42 \pm 0,23$ ISU-E соответственно. Стоит также отметить, что не были выявлены повышенные уровни sIgE к rBet e 1, rAra h 1, rAra h 3 и nFag e 2.

Далее мы провели корреляционный анализ значений уровня sIgE к алергокомпонентам суперсемейства Bet v 1-подобных белков, для того чтобы выявить перекрестную сенсибилизацию к гомологичным молекулам аллергенов этого суперсемейства. Силу связи коэффициента корреляции Пирсона оценивали в соответствии со шкалой Чеддока (табл. 1). Результаты представлены в таблице 3.

Была выявлена прямая достоверная взаимосвязь между уровнем sIgE к алергокомпоненту сои rGly m 4 и другими членами суперсемейства Bet v 1-подобных белков.

Коэффициент корреляции между уровнем sIgE к Gly m 4 и rBet v 1 составил 0,68 ($p = 0,001$), что соответствует средней силе связи этих двух параметров. Точечные значения уровня этих антител представлены на рисунке 1. Их значения находились в диапазоне до 1,5 ISU-E для Gly m 4 и до 61,0 ISU-E для rBet v 1.

Сила связи значений уровня sIgE к rGly m 4 и rAln g 1 была примерно такой же, как и для rBet v 1 ($R = 0,681$; $p = 0,000$). Результаты корреляционного анализа представлены на рисунке 2.

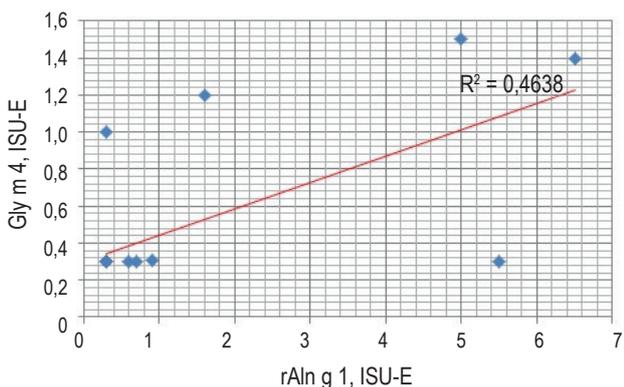


Рисунок 2. Корреляция между уровнем sIgE к rGly m 4 и rAln g 1

Примечание. Красной линией обозначена линейная аппроксимация. Коэффициент корреляции Пирсона (R) = 0,681. Коэффициент детерминации (R^2) = 0,4638, $n = 29$.

Figure 2. Correlation between the level of sIgE to rGly m 4 and rAln g 1

Note. The red line indicates the linear approximation. Pearson's correlation coefficient (R) = 0.681. Coefficient of determination (R^2) = 0.4638, $n = 29$.

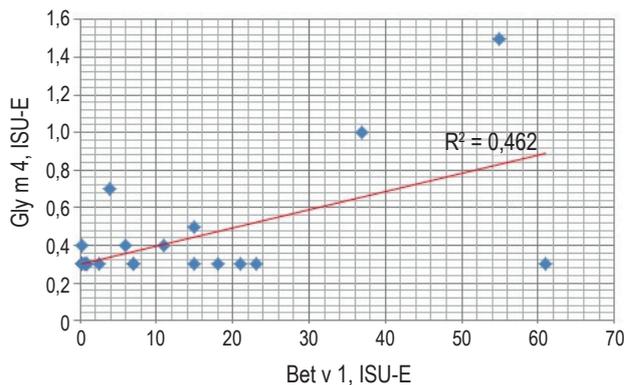


Рисунок 1. Корреляция между уровнем sIgE к rGly m 4 и rBet v 1

Примечание. Красной линией обозначена линейная аппроксимация. Коэффициент корреляции Пирсона (R) = 0,68. Коэффициент детерминации (R^2) = 0,462, $n = 29$.

Figure 1. Correlation between the level of sIgE to rGly m 4 and rBet v 1

Note. The red line indicates the linear approximation. Pearson's correlation coefficient (R) = 0.68. Coefficient of determination (R^2) = 0.462, $n = 29$.

Уровень sIgE к rAln g 1 находился в диапазоне до 6,5 ISU-E.

При дальнейшем изучении корреляционных взаимоотношений уровня sIgE к rGly m 4 была найдена прямая достоверная взаимосвязь с уровнем sIgE к rAct d 8 ($R = 0,59$; $p = 0,001$). Линейная диаграмма разброса значений уровня этих антител представлена на рисунке 3. Коэффициент корреляции соответствовал средней силе связи

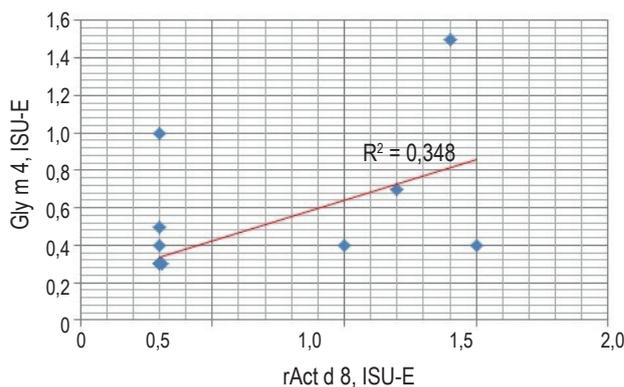


Рисунок 3. Корреляция между уровнем sIgE к Gly m 4 и rAct d 8

Примечание. Красной линией обозначена линейная аппроксимация. Коэффициент корреляции Пирсона (R) = 0,59. Коэффициент детерминации (R^2) = 0,348, $n = 29$.

Figure 3. Correlation between the level of sIgE to Gly m 4 and rAct d 8

Note. The red line indicates the linear approximation. Pearson's correlation coefficient (R) = 0.59. Coefficient of determination (R^2) = 0.348, $n = 29$.

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЯ sigE К АЛЛЕРГОКОМПОНЕНТАМ СУПЕРСЕМЕЙСТВА Bet v 1-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ
TABLE 3. sigE CORRELATION ANALYSIS BETWEEN ALLERGENS OF THE Bet v 1 SUPERFAMILY OF SIMILAR PROTEINS

	rCor a 1.01	rAln g 1	rGly m 4	rAra h 8	rCor a 1.04	rAct d 8	rApi g 1	rMal d 1	rPru p 1	nCyn d 1	rPhi p 1	rPhi p 2	nPhi p 4	rPhi p 5
R	0,78⁴	0,36²	0,68³	0,18	0,71⁴	0,61³	0,17	0,49²	0,15	-0,12	-0,10	0,31	-0,14	-0,16
p	0,000	0,05	0,001	0,337	0,000	0,001	0,392	0,007	0,434	0,522	0,619	0,100	0,466	0,409
R		0,69³	0,42²	0,11	0,80⁴	0,89⁴	-0,03	0,66³	0,36²	-0,10	-0,12	0,02	-0,08	-0,11
p		0,000	0,023	0,587	0,000	0,000	0,876	0,000	0,05	0,623	0,537	0,907	0,693	0,554
R			0,68³	0,18	0,69³	0,59³	0,09	0,43²	0,38²	-0,10	-0,15	-0,11	-0,13	-0,11
p			0,000	0,346	0,000	0,001	0,655	0,021	0,041	0,621	0,434	0,569	0,504	0,572
R				0,20	0,39²	0,59³	0,12	0,30	0,30	-0,10	-0,16	-0,11	-0,13	-0,11
p				0,294	0,036	0,001	0,543	0,111	0,117	0,622	0,420	0,570	0,505	0,573
R					0,34	0,11	0,86⁴	0,58³	0,78⁴	-0,13	-0,12	0,04	-0,12	-0,16
p					0,074	0,555	0,000	0,001	0,000	0,487	0,519	0,842	0,537	0,416
R						0,68³	0,22	0,71⁴	0,56³	-0,15	-0,18	0,06	-0,20	-0,17
p						0,000	0,252	0,000	0,001	0,439	0,342	0,768	0,293	0,375
R							-0,07	0,69³	0,43²	-0,08	-0,12	-0,10	-0,07	-0,09
p							0,706	0,000	0,019	0,682	0,529	0,615	0,715	0,625
R								0,40²	0,66³	-0,08	0,00	0,25	-0,11	-0,09
p								0,031	0,000	0,679	0,983	0,191	0,575	0,635
R									0,82⁴	-0,13	-0,17	-0,15	-0,16	-0,16
p									0,000	0,489	0,373	0,433	0,410	0,392
R										-0,11	-0,12	-0,13	-0,10	-0,12
p										0,563	0,550	0,505	0,605	0,526
R											0,83⁴	0,73⁴	0,25	0,96⁵
p											0,000	0,000	0,182	0,000
R												0,65³	0,19	0,88⁴
p												0,000	0,313	0,000
R													0,19	0,71⁴
p													0,313	0,000
R														0,38²
p														0,042

Примечание. R – коэффициент корреляции Пирсона; p – уровень значимости. ¹ – очень слабая сила связи (0,0-0,3); ² – слабая сила связи (0,3-0,5); ³ – средняя сила связи (0,5-0,7); ⁴ – высокая сила связи (0,7-0,9); ⁵ – очень высокая сила связи (0,9-1), в соответствии со шкалой Чеддока.

Note. R, Pearson's correlation coefficient; p, significance level. ¹, very weak correlation strength (0.0-0.3); ², weak correlation strength (0.3-0.5); ³, middle correlation strength (0.5-0.7); ⁴, high correlation strength (0.7-0.9); ⁵, very high correlation strength (0.9-0.1).

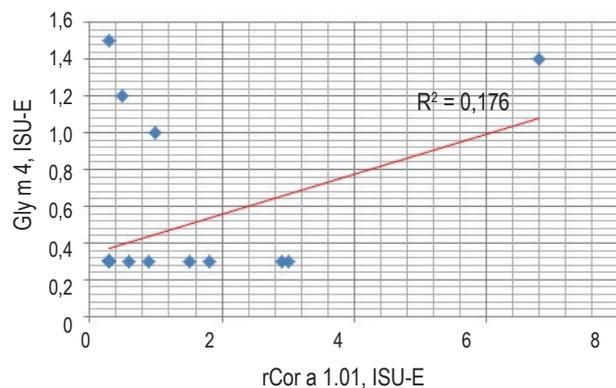


Рисунок 4. Корреляция между уровнем sIgE к Gly m 4 и rCor a 1.01

Примечание. Красной линией обозначена линейная аппроксимация. Коэффициент корреляции Пирсона (R) = 0,42. Коэффициент детерминации (R^2) = 0,176, $n = 29$.

Figure 4. Correlation between the level of sIgE to Gly m 4 and rCor a 1.01

Note. The red line indicates the linear approximation. Pearson's correlation coefficient (R) = 0.42. Coefficient of determination (R^2) = 0.176, $n = 29$.

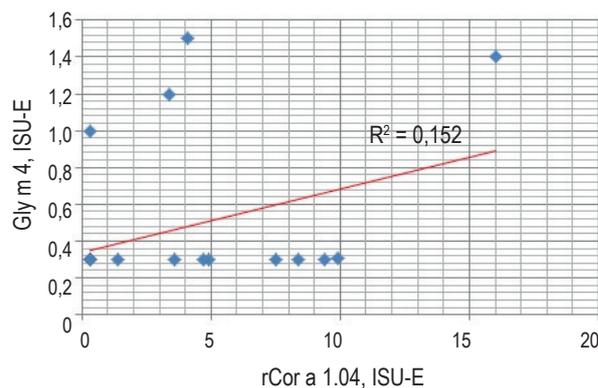


Рисунок 5. Корреляция между уровнем sIgE к rGly m 4 и rCor a 1.04

Примечание. Красной линией обозначена линейная аппроксимация. Коэффициент корреляции Пирсона (R) = 0,39. Коэффициент детерминации (R^2) = 0,152, $n = 29$.

Figure 5. Correlation between the level of sIgE to Gly m 4 and rCor a 1.04

Note. The red line indicates the linear approximation. Pearson's correlation coefficient (R) = 0.39. Coefficient of determination (R^2) = 0.152, $n = 29$.

в соответствии со шкалой Чеддока, как и у двух предыдущих корреляционных распределений. Максимальное значение уровня sIgE к rAct d 8 составило 1,5 ISU-E.

Слабая достоверная сила связи была найдена между уровнем sIgE к rGly m 4 и sIgE к rCor a 1.01. Коэффициент корреляции составил 0,42 с уровнем значимости 0,023. Корреляционный анализ этих двух параметров представлен на рисунке 4. Значение уровня sIgE к rCor a 1.01 находился в диапазоне до 6,8 ISU-E.

Минимальное значение коэффициента корреляции ($R = 0,39$; $p = 0,036$) было получено между уровнем sIgE к rGly m 4 и rCor a 1.04. При этом значение уровня sIgE к rCor a 1.04 находилось в диапазоне до 16 ISU-E. Результаты представлены на рисунке 5.

Кроме того, была выявлена прямая значимая ($p < 0,05$) взаимосвязь между уровнями sIgE к трем и более аллергокомпонентам данного семейства. Уровень sIgE к rAga h 8 коррелировал с уровнем sIgE к rApi g 1 ($R = 0,86$; $p = 0,00$), к rMal d 1 ($R = 0,58$; $p = 0,001$) и к rPru p 1 ($R = 0,78$; $p = 0,000$). Значение коэффициента корреляции Пирсона было минимальным ($R = 0,36$; $p < 0,05$; слабая сила связи) между уровнем sIgE к rBet v 1 (береза) и уровнем sIgE к rAln g 1 (ольха). С другой стороны, сила связи коэффициента корреляции Пирсона была максимальной ($R = 0,96$; $p < 0,05$; очень высокая) между уровнем sIgE к nSyn d 1 (свиной) и sIgE к rPhl p 5 (timoфеевка).

Сенсибилизация к аллергокомпонентам суперсемейства белков-купинов была выявлена

только у 5 пациентов. Значимой корреляции между уровнями sIgE к молекулам белков этого суперсемейства обнаружить не удалось.

Обсуждение

В нашем исследовании мы показали, что у больных с atopическими заболеваниями sIgE к белкам сои были выявлены преимущественно к аллергокомпоненту rGly m 4 (5 пациентов из 29; 17,24%). Среднее значение уровня этих антител по группе было выше нормы и составило $0,43 \pm 0,13$ ISU-E. Сенсибилизация к rGly m 5 (3 пациента из 29; 10,24%) и rGly m 6 (1 пациент из 29; 3,44%) была не такая значимая. Стоит также отметить, что rGly m 5 и rGly m 6 относятся к суперсемейству белков-купинов, IgE антитела к которым выявлялись редко по сравнению с аллергенами суперсемейства Bet v 1-подобных белков (см. табл. 2). В связи с этим провести значимый корреляционный анализ IgE-перекрестной активности аллергенов суперсемейства белков-купинов не представлялось возможным. Перекрестно-реагирующие sIgE выявлялись только к аллергенам суперсемейства Bet v 1-подобных белков.

Проведенный нами корреляционный анализ выявил достоверную прямую взаимосвязь между sIgE к аллергену сои rGly m 4 и аллергенам других таксономически разных растений (береза, ольха, киви и лещина).

Наиболее сильная зависимость была выявлена между уровнем sIgE к rGly m 4 и rBet v 1. Коэф-

фициент корреляции составил 0,68 ($p = 0,001$), что соответствует средней силе связи по шкале Чеддока. Gly m 4 и Bet v 1 относятся к семейству термоллабильных PR-10 белков, их биологическая функция обусловлена защитой растения от патогенов. У больных с аллергопатологией Gly m 4 вызывает, в основном, оральные симптомы аллергической реакции. Выявленная в нашем исследовании взаимосвязь объясняется структурной гомологией белка сои Gly m 4 с белком пыльцы березы Bet v 1. Полученные данные по перекрестным реакциям подтверждаются результатами других авторов. Например, в работе Kleine T.J. [7] у 17 из 20 больных с оральным синдромом и анафилаксией, возникшей в связи с приемом диетического соевого порошка, обнаружены sIgE к rBet v 1. В другом исследовании у 78,6% больных с аллергией к главному компоненту пыльцы березы Bet v 1 были выявлены sIgE к rGly m 4 [4]. При исследовании тех же сывороток методом иммуноблота установлена IgE связывающая активность рекомбинантных rGly m 4 (86,4%) и rGly m 3 (25%), а также других белков сои (64%).

Еще одна IgE перекрестная реакция была найдена между rGly m 4 сои и rAln g 1 пыльцы ольхи. Коэффициент корреляции между этими аллергенами был примерно такой же, как и для Bet v 1 и составил 0,681 ($p = 0,000$). Скорее всего, это связано с тем, что среди аллергенов семейства PR-10 белков аллерген Aln g 1 имеет высокую степень гомологии (86,8%) по аминокислотному составу с Gly m 4. Белок Aln g 1 также как и Bet v 1 экспрессирован в пыльце деревьев и вызывает респираторные симптомы.

IgE-АТ к rGly m 4 сои могут также перекрестно связываться с rAct d 8 киви. Причем коэффициент корреляции ($R = 0,59$; $p = 0,001$) был немного меньше, чем с rBet v 1 и rAln g 1, но тем не менее также соответствовал средней силе связи в соответствии со шкалой Чеддока (табл. 1).

Нами также была выявлена слабая достоверная корреляция между уровнем sIgE к rGly m 4 сои и rCor a 1 фундука, причем к двум его изоформам rCor a 1.01 ($R = 0,42$; $p = 0,023$) и rCor a 1.04 ($R = 0,39$; $p = 0,036$). Следует отметить, что Cor a 1.01 содержится в пыльце лещины и представляет собой ингаляционный аллерген, тогда как Cor a 1.04 экспрессирован в орехах и является пищевым аллергеном.

Насколько нам известно, исследований по изучению IgE перекрестной активности белков сои среди широкого спектра аллергокомпонентов растительного происхождения проводилось немного. В работе Westman M. [13] также показано наличие sIgE к Gly m 4 и перекрестных реакций с аллергокомпонентами PR-10 белков. Однако

это исследование проводилось только у детей до 16 лет с аллергическим ринитом, проживающих в странах западной Европы. В нашем исследовании принимали участия как дети, так и взрослые, проживающие в московском регионе. Кроме того, мы изучали IgE перекрестную активность белков сои среди широкого спектра аллергокомпонентов как суперсемейства Bet v 1-подобных белков, так и суперсемейства белков-купинов. Результаты нашего исследования представляют детальный профиль сенсibilизации к аллергенам семейства PR-10 белков у больных с atopическими заболеваниями и дополняют ранее проведенные научные работы по этому направлению (табл. 3).

Мы показали наличие IgE перекрестной активности между аллергеном сои Gly m 4 и аллергенами березы Bet v 1, ольхи Aln g 1, киви Act d 8 и двух изоформ фундука Cor a 1. Причем взаимосвязь между уровнями sIgE к Gly m 4 и аллергокомпонентами березы, ольхи и киви соответствовала средней силе связи, что может говорить о клинически значимой перекрестной реактивности. Наличие такой реактивности в патогенезе atopического заболевания зависит от многих факторов, например, индивидуальные особенности иммунной системы сенсibilизированного организма, степень экспозиции аллергена. Как правило, для запуска перекрестных аллергических реакций требуется многократное воздействие аллергена. Уровень sIgE и их аффинность также являются важным фактором для возникновения подобных реакций [1].

Индукция иммунной системы к продукции высокоаффинных иммуноглобулинов класса E к гомологичным белкам таксономически разных видов растений и животных рассматривается как важный компонент патогенеза аллергического заболевания. Данный феномен довольно широко обсуждается в научной литературе и представляет собой один из эндогенных механизмов поддержания иммунопатологических процессов при развитии atopических реакций [6, 12].

Заключение

Изученный нами профиль IgE-перекрестной активности аллергенов сои имеет важное значение для наилучшей стратегии тестирования на наличие причинно-значимых аллергенов, что позволит избежать развития скрытых перекрестных реакций, запускающих как оральные, так и респираторные аллергические процессы у людей с аллергопатологией. Кроме того, это позволит назначать оптимальные диеты и разрабатывать технологические решения для создания гипоаллергенных продуктов питания.

Список литературы / References

1. Andorf S., Borres M.P., Block W., Tupa D., Bollyky J.B., Sampath V., Elizur A., Lidholm J., Jones J., Galli S., Chinthrajah R., Nadeau K. Association of clinical reactivity with sensitization to allergen components in multifood-allergic children. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2017, Vol. 5, no. 5, pp. 1325-1334.
2. Asero R., Ariano R., Aruanno A., Barzaghi C., Borrelli P., Busa M., Celi G., Cinquini M., Cortellini G., D'Auria F., de Carli M., di Paolo C., Garzi G., Rizzini F.L., Magnani M., Manzotti G., Marra A., Sopo S.M., Murzilli F., Nucera E., Pinter E., Pravettoni V., Rivolta F., Rizzi A., Saporiti N., Scala E., Villalta D., Yacoub M.-R., Zisa G. Systemic allergic reactions induced by labile plant-food allergens: Seeking potential cofactors. A multicenter study. *Allergy*, 2021, Vol. 76, no. 5, pp. 1473-1479.
3. Bohrer B.M. An investigation of the formulation and nutritional composition of modern meat analogue products. *Food Sci. Hum. Well.*, 2019, Vol. 8, no. 4, pp. 320-329.
4. Hao G.D., Zheng Y.W., Wang Z.X., Kong X.A., Song Z.J., Lai X.X., Spangfort M. High correlation of specific IgE sensitization between birch pollen, soy and apple allergens indicates pollen-food allergy syndrome among birch pollen allergic patients in northern China. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 2016, Vol. 17, no. 5, pp. 399-404.
5. ImmunoCAP ISAC sIgE 112 Directions for Use 81 0002 – 62/02. Available at: www.thermofisher.com.
6. Kamath S.D., Bublin M., Kitamura K., Matsui T., Ito K., Lopata A.L. Cross-reactive epitopes and their role in food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2023, Vol. 151, no. 5, pp. 1178-1190.
7. Kleine-Tebbe J., Wangorsch A., Vogel L., Crowell D.N., Hausteil U.-F., Vieths S. Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1 related PR 10 protein in soybean, SAM22. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, Vol. 110, no. 5, pp. 797-804.
8. Matricardi P.M., Kleine-Tebbe J., Hoffmann H.J., Valenta R., Hilger C., Hofmaier S., Aalberse R.C., Agache I., Asero R., Ballmer-Weber B., Barber D., Beyer K., Biedermann T., Bilò M.B., Blank S., Bohle B., Bosshard P.P., Breiteneder H., Brough H.A., Caraballo L., Caubet J.C., Cramer R., Davies J.M., Douladiris N., Ebisawa M., Eigenmann P.A., Fernandez-Rivas M., Ferreira F., Gadermaier G., Glatz M., Hamilton R.G., Hawranek T., Hellings P., Hoffmann-Sommergruber K., Jakob T., Jappe U., Jutel M., Kamath S.D., Knol E.F., Korosec P., Kuehn A., Lack G., Lopata A.L., Mäkelä M., Morisset M., Niederberger V., Nowak-Węgrzyn A.H., Papadopoulos N.G., Pastorello E.A., Pauli G., Platts-Mills T., Posa D., Poulsen L.K., Raulf M., Sastre J., Scala E., Schmid J.M., Schmid-Grendelmeier P., van Hage M., van Ree R., Vieths S., Weber R., Wickman M., Muraro A., Ollert M. EAACI molecular allergology user's guide. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2016, Vol. 27, no. S23, pp. 1-250.
9. Polak R., Phillips E.M., Campbell A. Legumes: health benefits and culinary approaches to increase intake. *Clin. Diabetes*, 2015, Vol. 33, no. 4, pp. 198-205.
10. Radlović N., Leković Z., Radlović V., Simić D., Ristić D., Vuletić B. Food allergy in children. *Srp. Arh. Celok. Lek.*, 2016, Vol. 144, no. 1-2, pp. 99-103.
11. Rahaman T., Vasiljević T., Ramchandran L. Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. *Trends Food Sci. Technol.*, 2016, Vol. 49, pp. 24-34.
12. Smits M., Verhoeckx K., Knulst A., Welsing P., de Jong A., Gaspari M., Ehlers A., Verhoeff P., Houben G., Le Th. Co-sensitization between legumes is frequently seen, but variable and not always clinically relevant. *Front. Allergy*, 2023, Vol. 4, 1115022. doi: 10.3389/falgy.2023.1115022.
13. Westman M., Lupinek C., Bousquet J., Andersson N., Pahr S., Baar A., Bergström A., Holmström M., Stjärne P., Carlsen K.C.L., Carlsen K.H., Antó J.M., Valenta R., Hage M., Wickman M. Early childhood IgE reactivity to pathogenesis-related class 10 proteins predicts allergic rhinitis in adolescence. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 135, no. 5, pp. 1199-1206.

Авторы:

Самойликов П.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории аллергодиагностики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия;

Васильева Г.В. — младший научный сотрудник лаборатории аллергодиагностики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Samoylikov P.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Allergodiagnosics, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Vasilyeva G.V., Junior Research Associate, Laboratory of Allergodiagnosics, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Конаныхина С.Ю. — ведущий научный сотрудник
лаборатории иммунологических методов исследования
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин
и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Поддубиков А.В. — к.м.н., заведующий лабораторией
микробиологии условно-патогенных бактерий ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт вакцин и
сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Konanykhina S. Yu., Leading Research Associate, Laboratory
of Immunological Research Methods, I. Mechnikov Research
Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Poddubikov A. V., PhD (Medicine), Head, Laboratory
of Microbiology of Opportunistic Bacteria, I. Mechnikov
Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian
Federation

Поступила 21.02.2024
Принята к печати 13.03.2024

Received 21.02.2024
Accepted 13.03.2024

ИММУНО-ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Глушков А.Н.¹, Поленок Е.Г.¹, Гордеева Л.А.¹, Антонов А.В.²,
Байрамов П.В.², Вержбицкая Н.Е.², Колпинский Г.И.^{3,4}

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

² ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

³ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

⁴ ГАУЗ «Клинический консультативно-диагностический центр имени И.А. Колпинского», г. Кемерово, Россия

Резюме. Известно, что пролиферация опухолевых клеток у больных раком молочной железы (РМЖ) регулируется половыми гормонами – эстрадиолом и прогестероном (Е2 и Рg). Кроме того, в сыворотке больных РМЖ были обнаружены аутоантитела, специфичные к эстрогеновому рецептору (ER α), уровень которых прямо коррелировал с удельным весом клеток, экспрессирующих протеин Ki-67 – маркер пролиферации опухоли. Предположили, что роль аутоантител против мембранных стероидных рецепторов могут выполнять антиидиотипические антитела к Е2 и Рg (IgG₂-Е2 и IgG₂-Рg). Цель – исследовать ассоциации экспрессии Ki-67 в опухоли и содержания в сыворотке IgG₂-Е2 и IgG₂-Рg, а также стероидных гормонов Е2 и Рg у больных РМЖ. IgG₂-Е2 и IgG₂-Рg исследовали с помощью ELISA, используя в качестве адсорбированных антигенов моноклональные антитела против Е2 и Рg в сыворотке крови 373 больных ER⁺ РМЖ I стадии и 379 – II-IV стадий. Концентрацию Е2 и Рg в сыворотке определяли с помощью тест-систем «ИммуноФА-Эстрадиол» и «ИммуноФА-Прогестерон» (ЗАО «НВО ИммуноТех», Россия). Содержание в опухоли Ki-67 анализировали стандартным иммуно-гистохимическим методом в Кемеровском онкологическом диспансере. Удельный вес опухолей с большим количеством клеток, экспрессирующих Ki-67 (Ki-67 > 30), у больных РМЖ II-IV стадий был выше, чем у больных I стадии (50,7% против 29,8%, p < 0,001). Эта закономерность была характерна для больных с одновременно низкими уровнями IgG₂-Е2 и IgG₂-Рg: 1) при низком содержании в сыворотке Е2 < 200 пмоль/л (50,9% против 21,3%, p < 0,001); 2) при высоком Е2 > 200 пмоль/л (74,2% против 34,1%, p = 0,003); 3) при низком Рg ≤ 600 пмоль/л (60,6% против 22,2%, p < 0,001); 4) при высоком Рg > 600 пмоль/л (58,5% против 30,8%, p = 0,02). Такого возрастания удельного веса Ki-67 > 30 опухолей не обнаружили у больных с одновременно высокими уровнями IgG₂-Е2 и IgG₂-Рg. Соответствующие показатели составили: 1) 36,9% против 22,0% (p = 0,14); 2) 48,4% против 34,5% (p = 0,08); 3) 34,0% против 27,7% (p = 0,75). Только у больных с Рg > 600 пмоль/л и одновременно

Адрес для переписки:

Мун Стелла Андреевна
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
угля и углехимии Сибирского отделения Российской
академии наук»
650065, Россия, г. Кемерово, Ленинградский пр., 10.
Тел.: 8 (3842) 57-50-79.
E-mail: stellamun@yandex.ru

Address for correspondence:

Stella A. Mun
Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry
10 Leningradsky Ave
Kemerovo
650065 Russian Federation
Phone: +7 (3842) 57-50-79.
E-mail: stellamun@yandex.ru

Образец цитирования:

А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, Л.А. Гордеева,
А.В. Антонов, П.В. Байрамов, Н.Е. Вержбицкая,
Г.И. Колпинский «Иммуно-гормональная регуляция
пролиферации опухоли у больных раком молочной
железы» // Российский иммунологический журнал,
2024. Т. 27, № 1. С. 33-48.
doi: 10.46235/1028-7221-13990-IHR

© Глушков А.Н. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.N. Glushkov, E.G. Polenok, L.A. Gordeeva, A.V. Antonov,
P.V. Bayramov, N.E. Verzhbitskaya, G.I. Kolpinskiy
“Immuno-hormonal regulation of tumor proliferation in breast
cancer patients”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 1, pp. 33-48.
doi: 10.46235/1028-7221-13990-IHR

© Glushkov A.N. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-13990-IHR

высокими уровнями IgG₂-E2 и IgG₂-Pg различия оказались статистически значимыми (48,1% против 26,6%, $p = 0,01$). Антиидиотипические антитела к стероидным гормонам принимают участие регуляции пролиферации опухоли у больных РМЖ. Иммуноанализ IgG₂-E2 и IgG₂-Pg может быть использован в оценке прогноза пролиферативной активности РМЖ при его росте.

Ключевые слова: рак молочной железы, эстрадиол, прогестерон, антитела, анти-антитела, стероидные рецепторы

IMMUNO-HORMONAL REGULATION OF TUMOR PROLIFERATION IN BREAST CANCER PATIENTS

Glushkov A.N.^a, Polenok E.G.^a, Gordeeva L.A.^a, Antonov A.V.^b,
Bayramov P.V.^b, Verzhbitskaya N.E.^b, Kolpinskiy G.I.^{c,d}

^a Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

^b Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^c Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

^d Kemerovo Clinical Diagnostic Center, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. It is well known that tumor cells proliferation is regulated by sex steroid hormones, estradiol and progesterone (E2 and Pg) in breast cancer patients (BCP). Moreover, specific auto-antibodies to estrogen receptor (ER α) were detected in blood serum of BCP. Their levels positively correlated with the percentage of Ki-67 expressing breast cancer cells. We proposed that antiidiotypic auto-antibodies to E2 and Pg (IgG₂-E2 and IgG₂-Pg) could act as antibodies against membrane ER and progesterone receptor (PR). Our study aimed for research of IgG₂-E2 and IgG₂-Pg according to E2 and Pg serum levels in association with Ki-67 positive tumors in BCP. Antiidiotypic antibodies were studied in ER-positive patients with breast cancer (stage I, $n = 374$, and stage II-IV, $n = 379$), using ELISA technique with monoclonal antibodies against E2 and Pg as adsorbed antigens. Blood serum concentrations of E2 and Pg were measured using “ImmunoEA-Estradiol” and “ImmunoEA-Progesterone” test-systems (“Immunotech”, Russia). Tumor Ki-67 was studied by standard immunohistochemical technique at the Kemerovo Oncological Hospital. Higher percentage of Ki-67 positive breast cancer cells (Ki-67 > 30) was increased in BCP II-IV stages compared with stage I patients (50.7% vs 29.8%, $p < 0,001$). Such increased values were detected for the BCP with low levels of both IgG₂-E2 and IgG₂-Pg antibodies in the following subgroups: 1) at low serum E2 concentration of ≤ 200 pmol/L (50.9% vs 21.3%, $p < 0,001$); 2) at the E2 exceeding 200 pmol/L (74.2% vs 34.1%, $p = 0,003$); 3) at the Pg levels under 600 pmol/L (60.6% vs 22.2%, $p < 0,001$); 4) at Pg values exceeding 600 pmol/L (58.5% vs 30.8%, $p = 0,02$). Similar differences were not revealed between stage II-IV and stage I BCP with low levels of both IgG₂-E2 and IgG₂-Pg. Corresponding Ki-67 > 30 indices were as follows: 1) 36.9% vs 22.0% ($p = 0,14$); 2) 48.4% vs 34.5% ($p = 0,08$); 3) 34.0% vs 27.7% ($p = 0,75$). Significant differences were detected in BCP with Pg > 600 pmol/L and high IgG₂-E2 and IgG₂-Pg levels only: 48.1% vs 26.6%, ($p = 0,01$). Hence, antiidiotypic auto-antibodies to steroid hormones may participate in regulation of tumor proliferation in BCP. Immunoassay of IgG₂-E2 and IgG₂-Pg may be used for prognosis of tumor proliferation upon breast cancer progression.

Keywords: breast cancer, estradiol, progesterone, antibodies, anti-antibodies, steroid receptors

Введение

Иммуногистохимический анализ маркера клеточной пролиферации протеина Ki-67, рецепторов эстрадиола и прогестерона (ER и PR) и рецептора эпидермального фактора роста (HER-2) широко применяется в диагностике молекулярно-биологического подтипа рака молочной железы (РМЖ) для выбора наиболее оптимальных

схем комбинированной терапии. Поэтому исследование внеклеточных факторов организма, регулирующих экспрессию указанных молекул в опухоли, представляет не только теоретический, но и сугубо практический интерес.

Общеизвестно участие половых стероидов в возникновении и росте РМЖ. В частности, показана стимуляция прогрессии РМЖ под действием эстрадиола (E2) и угнетение пролифера-

ции ER-экспрессирующих опухолевых клеток под действием прогестерона (Pg) [8, 11]. Наряду с хорошо изученными геномными эффектами известно и внегеномное действие стероидных гормонов, опосредованное мембранными ER и PR [5, 7].

Антитела против стероидных рецепторов также способны к внегеномному действию на клетки-мишени, как это было показано в ранее проведенных многочисленных экспериментах *in vitro* [9, 12]. Аутоантитела против ER обнаружены в сыворотке крови больных РМЖ [10]: они связывались с поверхностными ER и стимулировали пролиферацию опухолевых клеток мыши MCF-7 *in vitro*; их уровень превышал таковой у здоровых женщин и прямо коррелировал с количеством Ki-67 экспрессирующих клеток в опухоли. Однако функции аутоантител против PR, теоретически способных участвовать в регуляции пролиферативной активности опухоли, оставались неизвестными.

Роль антител против стероидных рецепторов могут выполнять антиидиотипические антитела к стероидным гормонам, как это было продемонстрировано в модельных экспериментальных *in vitro* [13]: антиидиотипические антитела к E2 действовали как агонисты E2 в культуре остеобластов. В нашей предыдущей статье были описаны особенности образования антиидиотипических антител, специфичных к моноклональным антителам против E2 и Pg (IgG₂-E2 и IgG₂-Pg), у здоровых женщин и больных РМЖ с ER⁺/PR⁺ опухолями на I стадии [3]. Настоящая работа является продолжением начатых исследований с учетом предполагаемого взаимного влияния стероидных гормонов и соответствующих антиидиотипических антител на пролиферативную активность опухоли у больных РМЖ в начале заболевания и при распространенных опухолях.

Цель – исследовать ассоциации экспрессии Ki-67 в опухоли и содержания в сыворотке крови антиидиотипических аутоантител IgG₂-E2 и IgG₂-Pg, а также стероидных гормонов E2 и Pg у больных РМЖ.

Материалы и методы

В настоящем исследовании приняли участие 898 женщин в постменопаузе. Все женщины впервые обратились в ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта» г. Кемерово. У всех женщин был первично установлен диагноз «инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа». Согласно TNM классификации у большинства женщин была выявлена I и II стадии заболевания (45,9% и 38,8% соответственно), III и IV стадии были выявлены у 14,2% и 1,1% женщин

соответственно. Наличие ER, PR и Ki-67 в опухолевых клетках определили с помощью стандартных иммуногистохимических методов в патологоанатомическом отделении онкодиспансера. Медиана возраста всех женщин составила 65 лет (интерквартильный размах 59-71).

Объектом для исследования послужила периферическая кровь, которую забирали в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации (2013) и согласно «Правилами клинической практики в Российской Федерации» (Приказ Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г.). Все женщины, принявшие участие в настоящем исследовании, дали письменное информированное согласие на участие в нем.

Иммуноанализ антиидиотипических антител, специфичных к E2 и Pg (IgG₂-E2, IgG₂-Pg), проводили с помощью неконкурентного полуколичественного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов «ИммуноФА-Эстрадиол» и «ИммуноФА-ПГ» (ЗАО «НВО Иммунотех», Россия) с иммобилизованными на пластике моноклональными антителами против E2 в Pg согласно методике [2]. IgG₂-E2 и IgG₂-Pg, связавшиеся с моноклональными антителами против E2 и Pg, выявляли с помощью козьих антител против IgG человека, меченных пероксидазой хрена (Invitrogen, США), с разведением 1/30000. Оптическую плотность ферментативной реакции измеряли на фотометре Multiscan FC (Thermo Scientific, Финляндия) при длине волны 450 нм. Уровни IgG₂-E2 и IgG₂-Pg выражали в условных единицах (у. е.) и рассчитывали по формуле:

$$\text{IgG}_2\text{-X} = (\text{OD}_{\text{X-МАТ}} - \text{OD}_{\text{фон}}) / \text{OD}_{\text{фон}},$$

где X = E2 или Pg; OD_{X-МАТ} – оптическая плотность связывания сывороточных антиидиотипических антител с моноклональными антителами (МАТ) против E2 или Pg, OD_{фон} – оптическая плотность фонового связывания меченных пероксидазой хрена козьих антител против IgG человека с моноклональными антителами против E2 или Pg без добавления сыворотки крови.

Концентрацию стероидных гормонов (E2, Pg) определяли с помощью коммерческих наборов «ИммуноФА-Эстрадиол», «ИммуноФА-ПГ» (ЗАО «НВО Иммунотех», Россия) согласно инструкции по применению.

Обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Тип распределения исследуемых показателей оценивали с помощью W-критерия Шапиро–Уилка. Так как распределение показателей имело ненормальный характер, в дальнейшем использовали непараметрический критерий χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность вариации. Критический уровень значимости принимался

$p < 0,05$. Пороги отсечения антител (cut-off value), по которым сравниваемые группы имели оптимальные различия, были рассчитаны с помощью ROC-анализа [6].

Результаты

Сначала исследовали взаимосвязи уровней экспрессии маркера клеточной пролиферации, протеина Ki-67, со статусом стероидных рецепторов в опухоли у больных РМЖ. Полученные результаты представлены в таблице 1. Искомые взаимосвязи выявлены как при I стадии заболевания, так и при II-IV стадиях. У больных с ER⁺/PR⁺ и ER⁺/PR⁻ опухолями на I стадии низкие уровни Ki-67 (содержание Ki-67 положительных клеток $\leq 14\%$) обнаружены в 41,6% и в 41,5% случаев, средние (15-30%) в 29,0% и 26,4%, высокие ($> 30\%$) – в 29,4% и в 32,1%. То есть больные с ER⁺/PR⁺ и ER⁺/PR⁻ опухолями практически не имели различий по экспрессии Ki-67 ($p = 0,89$).

В то же время каждая из этих подгрупп значительно различалась с больными с ER⁻/PR⁻ опухолями, соответствующие значения Ki-67 в которой составили 15,4%, 71,8% и 12,8% ($p = 0,001$).

Аналогичное отсутствие различий между больными ER⁺/PR⁺ и ER⁺/PR⁻ опухолями по уровням Ki-67 имело место при II-IV стадиях ($p = 0,17$), в то время как каждая из этих подгрупп значительно отличалась от больных с ER⁻/PR⁻ опухолями ($p < 0,001$ и $p = 0,03$ соответственно).

У женщин на II-IV стадиях заболевания, по сравнению с I стадией, удельный вес опухолей с низким уровнем Ki-67 ≤ 14 значительно снижался, а с высоким Ki-67 > 30 повышался. Эти разли-

чия были характерными для больных с ER⁺/PR⁺ опухолями ($p < 0,001$), с ER⁺/PR⁻ опухолями ($p = 0,01$) и с ER⁻/PR⁻ опухолями ($p < 0,001$).

Отсутствие различий между больными с ER⁺/PR⁺ и ER⁺/PR⁻ опухолями по распределению уровней Ki-67 как при I стадии, так и II-IV стадиях процесса послужило основанием объединить их в отдельную когорту (ER⁺), в которой и были проведены запланированные исследования антиидиотипических антител и гормонов.

С помощью ROC-анализа рассчитали пороговые значения (cut-off) уровней исследуемых антител и концентраций гормонов в сыворотке крови, по которым больные ER⁺ РМЖ с I стадией и низким уровнем Ki-67 ≤ 14 имели наибольшие различия с таковыми при высоком уровне Ki-67 > 30 в опухоли. Исследование взаимосвязей между ними показало следующее (табл. 2). У больных РМЖ I стадии искомые взаимосвязи обнаружены только между уровнями IgG₂-E2 и IgG₂-Pg ($p < 0,001$). Взаимосвязи между высокими и низкими уровнями IgG₂-E2 и IgG₂-Pg с высоким и низким содержанием E2 и Pg отсутствовали. Также не выявляли статистически достоверных связей между высоким и низким содержанием E2 и Pg.

У больных РМЖ на II-IV стадиях процесса также обнаружили искомые взаимосвязи между уровнями IgG₂-E2 и IgG₂-Pg ($p = 0,02$) и, кроме того (в отличие от больных I стадией РМЖ) – между E2 и Pg ($p = 0,009$).

Удельный вес больных с высокой концентрацией в сыворотке E2 > 200 пмоль/л при II-IV стадиях составлял 53,2%, а при I стадии – 40,6%, если уровень IgG₂-E2 был высоким ($p < 0,01$). Со-

ТАБЛИЦА 1. ЧИСЛО (n) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ УРОВНЯМИ Ki-67 ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I И II-IV СТАДИЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ER/PR СТАТУСА ОПУХОЛИ

TABLE 1. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF TUMORS WITH DIFFERENT LEVELS OF Ki-67 EXPRESSING CELLS IN THE BREAST CANCER PATIENTS (BCP) I AND II-IV STAGES DEPENDING ON TUMOR ER/PR STATUS

ER/PR	РМЖ I стадия BCP I stage (n = 412)			РМЖ II-IV стадии BCP II-IV stages (n = 486)			χ^2 (p), df = 2
	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	
1. ER ⁺ /PR ⁺	133/41,6	93/29,0	94/29,4	83/26,2	79/24,9	155/48,9	27,6 (< 0,001)
2. ER ⁺ /PR ⁻	22/41,5	14/26,4	17/32,1	16/25,8	9/14,5	37/59,7	8,8 (0,01)
3. ER ⁻ /PR ⁻	6/15,4	28/71,8	5/12,8	11/10,3	17/15,9	79/73,82	48,1 (< 0,001)
χ^2 (p), df = 4 1-2-3	30,0 (< 0,001)			23,0 (< 0,001)			–
χ^2 (p), df = 2 1-2	0,2 (0,89)			3,6 (0,17)			–
χ^2 (p), df = 2 1-3	28,4 (< 0,001)			21,0 (< 0,001)			–
χ^2 (p), df = 2 2-3	18,7 (< 0,001)			7,1 (0,03)			–

ответствующие показатели с E2 > 200 пмоль/л проявились и у больных с высоким уровнем IgG₂-Pg (49,5% против 36,3%, p < 0,01). При низких уровнях антител различия по E2 между стадиями отсутствовали.

В основном разделе настоящей работы исследовали взаимосвязи экспрессии Ki-67 в опухоли с одной стороны и уровнями E2, Pg, IgG₂-E2 и IgG₂-Pg – с другой. При этом учитывали особенности экспрессии Ki-67 у больных с II-IV стадиями РМЖ по сравнению с I стадией.

В таблице 3 показаны удельные веса больных с низкими, средними и высокими уровнями экспрессии Ki-67 в опухоли при низких и высоких концентрациях E2 и Pg, а также при их четырех

возможных индивидуальных комбинациях. Искомых взаимосвязей между Ki-67 и E2 не обнаружили ни у больных с I стадией РМЖ (p = 0,14), ни у больных с II-IV стадиями (p = 0,09). Низкий удельный вес больных с низким уровнем Ki-67 ≤ 14 и, соответственно, высокий удельный вес больных с высоким уровнем Ki-67 > 30 при II-IV стадиях по сравнению с I стадией имели место как при низком, так и при высоком содержании E2 в сыворотке крови (p < 0,001 и p = 0,003 соответственно).

У больных с I стадией РМЖ и низким уровнем Ki-67 ≤ 14 высокие концентрации Pg встречались реже, чем низкие (34,8% и 49,7%) и, наоборот, при высоких уровнях Ki-67 > 30 эти показатели соста-

ТАБЛИЦА 2. ЧИСЛО (n) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КОМБИНАЦИЙ НИЗКИХ (≤) И ВЫСОКИХ (>) УРОВНЕЙ ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ (IgG₂-E2 И IgG₂-Pg, у. е.) И ГОРМОНОВ (E2 И Pg, пмоль/л) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ER+ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I И II-IV СТАДИЙ

TABLE 2. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF PERSONAL COMBINATIONS OF LOW (≤) AND HIGH (>) LEVELS OF STUDIED ANTIIDOTYPIC ANTIBODIES (IgG₂-E2 AND IgG₂-Pg, c. u.) AND HORMONES (E2 AND Pg, pmol/L) IN THE BLOOD SERUM OF ER+ BREAST CANCER PATIENTS (BCP) I AND II-IV STAGES

Антитела, гормоны Antibodies, hormones	РМЖ ER+ I стадия BCP ER+ I stage (n = 373)						
	IgG ₂ -Pg		E2		Pg		
	≤ 2,5	> 2,5	≤ 200	> 200	≤ 600	> 600	
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	
1.1. IgG ₂ -E2 ≤ 3,5	88/61,1	56/38,9	88/61,1	56/38,9	60/41,7	84/58,3	
1.2. IgG ₂ -E2 > 3,5	92/40,2	137/59,8	136/58,4	93/40,6	109/47,6	120/52,4	
χ ² (p), df = 1	14,7 (< 0,001)		0,1 (0,82)		1,0 (0,31)		
2.1. IgG ₂ -Pg ≤ 2,5	–	–	101/56,1	79/43,9	80/44,4	100/55,6	
2.2. IgG ₂ -Pg > 2,5	–	–	123/63,7	70/36,3	89/46,1	104/53,9	
χ ² (p), df = 1			1,9 (0,16)		0,1 (0,83)		
3.1. E2 ≤ 200	–	–	–	–	111/49,6	113/50,4	
3.2. E2 > 200	–	–	–	–	58/38,9	91/61,1	
χ ² (p), df = 1					3,7 (0,06)		
Антитела, гормоны Antibodies, hormones	РМЖ ER+ II-IV стадии BCP ER+ II-IV stages (n = 379)						
	1.1. IgG ₂ -E2 ≤ 3,5	86/54,1	73/45,9	92/57,9	67/42,1	66/41,5	93/58,5
	1.2. IgG ₂ -E2 > 3,5	91/41,4	129/58,6	103/46,8	117/53,2	84/38,2	136/61,8
	χ ² (p), df = 1	5,5 (0,02)		4,1 (0,04)		0,3 (0,58)	
2.1. IgG ₂ -Pg ≤ 2,5	–	–	93/52,5	84/47,5	67/37,9	110/62,1	
2.2. IgG ₂ -Pg > 2,5	–	–	102/50,5	100/49,5	83/41,1	119/58,9	
χ ² (p), df = 1			0,1 (0,77)		0,3 (0,59)		
3.1. E2 ≤ 200	–	–	–	–	90/46,2	105/53,8	
3.2. E2 > 200	–	–	–	–	60/32,6	124/67,4	
χ ² (p), df = 1					6,7 (0,009)		

вили, соответственно, 35,3% и 23,1% ($p = 0,008$). Аналогичная ситуация, но менее статистически значимая ($p = 0,046$) обнаружена и у больных с II-IV стадиями РМЖ. Снижение удельного веса больных низким уровнем Ki-67 ≤ 14 и соответствующее повышение удельного веса больных с высоким уровнем Ki-67 у больных с II-IV стадиями РМЖ по сравнению с I стадией имели место как при низких, так и при высоких концентрациях Pg в сыворотке крови ($p < 0,001$).

Анализ распределения больных РМЖ I стадией по уровням Ki-67 в опухоли и четырем возможным индивидуальным комбинациям низких и высоких концентраций E2 и Pg в сыворотке крови показал следующее. У больных с низким содержанием Pg и разными концентрациями E2 (позиции 3.1 и 3.2) опухоли с низким уровнем Ki-67 ≤ 14 встречались в 51,4% и 46,6% случаев, а опухоли с высоким уровнем Ki-67 > 30 – в 20,7% и в 27,6% соответственно. У больных с высоким содержанием Pg и разными концентрациями E2 (позиции 3.3 и 3.4) соответствующие показатели

составили: 39,8% и 28,6% для Ki-67 ≤ 14 ; 32,7% и 38,5% для Ki-67 > 30 ($p < 0,05$). Наиболее выраженные различия были выявлены при сравнении позиций 3.1 и 3.4 ($p = 0,003$).

У больных РМЖ II-IV стадией с низким содержанием Pg (позиции 3.1 и 3.2) удельный вес опухолей с высоким уровнем Ki-67 > 30 также был ниже (42,2% и 46,7%), чем при высоком содержании Pg (позиции 3.3 и 3.4: 54,3% и 55,6%). Статистически значимые различия проявились при сопоставлении позиций 3.1 и 3.4, как и при подобном анализе больных I стадией РМЖ.

Снижение удельного веса опухолей с низкими уровнями Ki-67 ≤ 14 и соответствующее повышение удельного веса опухолей с высокими уровнями Ki-67 > 30 у больных с II-IV стадиями по сравнению с I стадией имело место с разной степенью статистической значимости (от $p = 0,03$ до $p < 0,001$) при любой из четырех индивидуальной комбинации высоких и низких концентраций E2 и Pg.

ТАБЛИЦА 3. ЧИСЛО (n) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ НИЗКИХ (\leq) И ВЫСОКИХ ($>$) УРОВНЕЙ ИССЛЕДУЕМЫХ ГОРМОНОВ (E2 и Pg, pmol/L) И ИХ КОМБИНАЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ER⁺ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I И II-IV СТАДИЙ В СООТВЕТСТВИИ С УРОВНЯМИ Ki-67 В ОПУХОЛИ

TABLE 3. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF LOW (\leq) AND HIGH ($>$) STUDIED HORMONES SERUM LEVELS (E2 AND Pg, pmol/L) AND THEIR COMBINATIONS IN I AND II-IV STAGES ER⁺ BREAST CANCER PATIENTS (BCP) ACCORDING TO TUMOR Ki-67 LEVELS

Гормоны и их комбинации Hormones and their combinations	РМЖ ER ⁺ I стадия BCP ER ⁺ I stage (n = 373)			РМЖ ER ⁺ II-IV стадии BCP ER ⁺ II-IV stages (n = 379)			χ^2 (p), df = 2
	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	
1.1. E2 ≤ 200	102/45,5	62/27,7	60/26,8	46/23,6	54/27,7	95/48,7	27,8 (< 0,001)
1.2. E2 > 200	53/35,6	45/30,2	51/34,2	53/28,8	34/18,5	97/52,7	12,3 (0,003)
χ^2 (p), df = 2	4,0 (0,14)			4,7 (0,09)			
2.1. Pg ≤ 600	84/49,7	46/27,2	39/23,1	40/26,7	44/29,3	66/44,0	21,5 (< 0,001)
2.2. Pg > 600	71/34,8	61/29,9	72/35,3	59/25,8	44/19,2	126/55,0	17,2 (< 0,001)
χ^2 (p), df = 2	9,8 (0,008)			6,2 (0,046)			
3.1. E2 ≤ 200 + Pg ≤ 600	57/51,4	31/27,9	23/20,7	25/27,8	27/30,0	38/42,2	14,4 (< 0,001)
3.2. E2 > 200 + Pg ≤ 600	27/46,6	15/25,9	16/27,6	15/25,0	17/28,3	28/46,7	6,8 (0,03)
3.3. E2 ≤ 200 + Pg > 600	45/39,8	31/27,4	37/32,7	21/20,0	27/25,7	57/54,3	12,9 (0,002)
3.4. E2 > 200 + Pg > 600	26/28,6	30/33,0	35/38,5	38/30,6	17/13,7	69/55,6	12,2 (0,003)
χ^2 (p), df = 6 3.1-3.2-3.3-3.4	13,3 (< 0,05)			12,5 (> 0,05)			
χ^2 (p), df = 2 3.1-3.4	12,2 (0,003)			8,8 (0,01)			

Анализ распределения низких и высоких уровней исследуемых антиидиотипических антител и их комбинаций у больных ER⁺ РМЖ I и II-IV стадий в соответствии с уровнями Ki-67 показал следующее (табл. 4). Искомые взаимосвязи не были обнаружены у больных РМЖ в начале процесса (I стадия).

На II-IV стадиях заболевания с низким содержанием Ki-67 ≤ 14 в опухоли низкие уровни IgG₂-E2 встречались реже (19,5%), а высокие – чаще (30,9%), и наоборот, при высоком содержании Ki-67 > 30 низкие уровни IgG₂-E2 обнаруживали чаще, а высокие реже (57,2% против 45,9%, p = 0,03). Не выявили взаимосвязей с Ki-67 при анализе отдельно IgG₂-Pg (позиции 2.1 и 2.2).

Вместе с тем при низком содержании Ki-67 ≤ 14 высокие уровни IgG₂-E2 встречались чаще только в комбинации с высокими уровнями IgG₂-Pg (34,1%) и реже при высоком содержании Ki-67 > 30 (42,6%). Статистически значимые различия обнаружены при сравнении одновременно высоких и одновременно низких уровней ис-

следуемых антител (позиции 3.4 и 3.1, p = 0,03). Такие же различия (p = 0,03) проявились при сравнении больных с одновременно высокими уровнями IgG₂-E2 и IgG₂-Pg с подгруппой, объединяющей позиции 3.1+3.2+3.3, т. е. при одновременно низких уровнях исследуемых антител или одного из них при высоком уровне другого.

У больных с II-IV стадией процесса опухоли с низким содержанием Ki-67 ≤ 14 обнаруживали реже, а с высоким Ki-67 > 30 чаще, чем у больных с I стадией независимо от уровней IgG₂-E2 и IgG₂-Pg и от их комбинаций. Исключение наблюдалось только при комбинации высоких уровней IgG₂-E2 с низкими уровнями IgG₂-Pg (позиция 3.2, p = 0,12). Однако при отсутствии статистической значимости тенденция к снижению удельного веса Ki-67 ≤ 14 опухолей и к повышению Ki-67 > 30 сохранялась.

Далее исследовали ассоциации Ki-67 в опухоли с антиидиотипическими антителами у больных РМЖ с различными концентрациями стероидных гормонов в сыворотке крови.

ТАБЛИЦА 4. ЧИСЛО (n) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ НИЗКИХ (≤) И ВЫСОКИХ (>) УРОВНЕЙ ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ (IgG₂-E2 И IgG₂-Pg, у. е.) И ИХ КОМБИНАЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ER⁺ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I И II-IV СТАДИЙ В СООТВЕТСТВИИ С УРОВНЯМИ Ki-67 В ОПУХОЛИ

TABLE 4. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF LOW (≤) AND HIGH (>) LEVELS OF STUDIED SERUM ANTIIDIOTYPIC ANTIBODIES (IgG₂-E2 AND IgG₂-Pg, c. u.) AND THEIR COMBINATIONS IN I AND II-IV STAGES ER⁺ BREAST CANCER PATIENTS (BCP) ACCORDING TO TUMOR Ki-67 LEVELS

Антитела и их комбинации Antibodies and their combinations	РМЖ ER ⁺ I стадия BCP ER ⁺ I stage (n = 373)			РМЖ ER ⁺ II-IV стадии BCP ER ⁺ II-IV stages (n = 379)			χ ² (p), df = 2
	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	
1.1. IgG ₂ -E2 ≤ 3,5	67/46,5	37/25,7	40/27,8	31/19,5	37/23,3	91/57,2	32,4 (< 0,001) 10,6 (0,005)
1.2. IgG ₂ -E2 > 3,5	88/38,4	70/30,6	71/31,0	68/30,9	51/23,2	101/45,9	
χ ² (p), df = 2	2,4 (0,29)			6,9 (0,03)			
2.1. IgG ₂ -Pg ≤ 2,5	79/43,9	43/23,9	58/32,2	40/22,6	40/22,6	97/54,8	22,7 (< 0,001) 16,1 (< 0,001)
2.2. IgG ₂ -Pg > 2,5	76/39,4	64/33,1	53/27,5	59/29,2	48/23,8	95/47,0	
χ ² (p), df = 2	3,9 (0,14)			2,8 (0,25)			
3.1. IgG ₂ -E2 ≤ 3,5 + IgG ₂ -Pg ≤ 2,5	43/48,9	21/23,8	24/27,3	16/18,6	19/22,1	51/59,3	22,2 (< 0,001)
3.2. IgG ₂ -E2 > 3,5 + IgG ₂ -Pg ≤ 3,5	36/39,1	22/23,9	34/37,0	24/26,4	21/23,1	46/50,5	4,2 (0,12)
3.3. IgG ₂ -E2 ≤ 3,5 + IgG ₂ -Pg > 2,5	24/42,8	16/28,6	16/28,6	15/20,5	18/24,7	40/54,8	10,4 (0,006)
3.4. IgG ₂ -E2 > 3,5 + IgG ₂ -Pg > 2,5	52/38,0	48/35,0	37/27,0	44/34,1	30/23,3	55/42,6	8,1 (0,02)
χ ² (p), df = 2 3.1-3.4	3,7 (0,16)			7,4 (0,03)			
χ ² (p), df = 2 (3.1+3.2-3.3)-3.4	4,1 (0,13)			7,3 (0,03)			

По данным, представленным в таблице 5, видно, что при низких концентрациях $E2 \leq 200$ пмоль/л таковые отсутствуют у больных I стадией РМЖ как при анализе IgG_2-E2 и IgG_2-Pg по отдельности, так и в комбинациях. У больных с II-IV стадиями также не обнаружили взаимосвязей содержания Ki-67 в опухоли с уровнями антител по отдельности (позиции 1 и 2). В то же время у больных с низким содержанием в опухоли Ki-67 ≤ 14 одновременно высокие уровни IgG_2-E2 и IgG_2-Pg (позиция 3.4) встречались чаще (33,8%), а у больных с высоким Ki-67 > 30 – реже (36,9%), чем в случаях с одновременно низкими уровнями антител (позиция 3.1) или низким уровнем одного из них при высоком другого (позиции 3.2 и 3.3): меньше 19,0% и больше 50,0% соответственно). Статистически значимые различия ($p = 0,03$) об-

наружены при сравнении позиции 3.4 с объединенной подгруппой 3.1+3.2+3.3.

Снижение удельного веса больных с низким содержанием Ki-67 ≤ 14 и соответствующее повышение удельного веса с Ki-67 > 30 при II-IV стадиях по сравнению с I стадией имело место как при низких, так и при высоких уровнях антител (позиции 1 и 2), в том числе при их комбинациях 3.1, 3.2, и 3.3. При одновременно высоких уровнях IgG_2-E2 и IgG_2-Pg (позиция 3.4) сохранялась такая же тенденция, хотя различия между больными с I и II-IV стадиями по этим показателям были статистически недостоверными ($p = 0,14$).

У больных с высокими концентрациями $E2 > 200$ пмоль/л (табл. 6) на I стадии РМЖ искомые ассоциации не были обнаружены как при анализе IgG_2-E2 и IgG_2-Pg по-отдельности, так и в комбинациях их высоких и низких уровней. У

ТАБЛИЦА 5. ЧИСЛО (n) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ НИЗКИХ (\leq) И ВЫСОКИХ ($>$) УРОВНЕЙ ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ (IgG_2-E2 и IgG_2-Pg , у. е.) И ИХ КОМБИНАЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ER+ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I И II-IV СТАДИЙ С НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ В СЫВОРОТКЕ E2 (пмоль/л) В СООТВЕТСТВИИ С УРОВНЯМИ Ki-67 В ОПУХОЛИ

TABLE 5. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF LOW (\leq) AND HIGH ($>$) LEVELS OF STUDIED ANTIDIOTYPIC ANTIBODIES (IgG_2-E2 AND IgG_2-Pg , c. u.) AND THEIR COMBINATIONS IN I AND II-IV STAGES ER+ BREAST CANCER PATIENTS (BCP) WITH LOW E2 SERUM CONCENTRATIONS (pmol/L) ACCORDING TO TUMOR Ki-67 LEVELS

Антитела и их комбинации Antibodies and their combinations	РМЖ ER+ I стадия BCP ER+ I stage (n = 373)			РМЖ ER+ II-IV стадии BCP ER+ II-IV stages (n = 379)			χ^2 (p), df = 2
	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	
E2 ≤ 200							
1.1. $IgG_2-E2 \leq 3,5$	45/51,1	20/22,7	23/26,1	17/18,5	25/27,2	50/54,3	23,1 ($< 0,001$) 7,9 (0,02)
1.2. $IgG_2-E2 > 3,5$	57/41,9	42/30,9	37/27,2	29/28,2	29/28,2	45/43,7	
χ^2 (p), df = 2	2,3 (0,32)			3,1 (0,22)			
2.1. $IgG_2-Pg \leq 2,5$	49/48,5	23/22,8	29/28,7	17/18,3	27/29,0	49/52,7	20,7 ($< 0,001$) 10,3 (0,006)
2.2. $IgG_2-Pg > 2,5$	53/43,1	39/31,7	31/25,2	29/28,4	27/26,5	46/45,1	
χ^2 (p), df = 2	2,2 (0,33)			2,8 (0,25)			
3.1. $IgG_2-E2 \leq 3,5$ + $IgG_2-Pg \leq 2,5$	27/57,4	10/21,3	10/21,3	10/18,2	17/30,9	28/50,9	17,6 ($< 0,001$)
3.2. $IgG_2-E2 > 3,5$ + $IgG_2-Pg \leq 3,5$	22/40,7	13/24,1	19/35,2	7/18,4	10/26,3	21/55,3	5,6 (0,06)
3.3. $IgG_2-E2 \leq 3,5$ + $IgG_2-Pg > 2,5$	18/43,9	10/24,4	13/31,7	7/18,9	8/21,6	22/59,5	7,2 (0,03)
3.4. $IgG_2-E2 > 3,5$ + $IgG_2-Pg > 2,5$	35/42,7	29/35,4	18/22,0	22/33,8	19/29,2	24/36,9	3,9 (0,14)
χ^2 (p), df = 2 (3.2+3.3)-3.4	4,0 (0,14)			6,5 (0,04)			
χ^2 (p), df = 2 (3.1+3.2+3.3)-3.4	4,1 (0,13)			7,2 (0,03)			

больных с II-IV РМЖ не было ассоциаций каждого из них с содержанием в опухоли Ki-67 (позиции 1 и 2). В то же время опухоли с низким содержанием Ki-67 ≤ 14 встречались реже (19,4%), а высоким Ki-67 > 30 – чаще (74,2%) при одновременно низких уровнях IgG₂-E2 и IgG₂-Pg (позиция 3.1), чем при трех других комбинациях (более 20,0% и менее 50% соответственно). Различия между показателями по позиции 3.1 и объединенной подгруппой (3.1+3.2+3.3) были статистически значимыми ($p = 0,03$).

Между больными с II-IV и с I стадиями имела место тенденция к снижению удельного веса опухолей с Ki-67 ≤ 14 и к соответствующему повышению такового с Ki-67 > 30 при любом уровне исследуемых антител, в том числе и при их комбинациях. Наибольшей значимости эти различия достигали при низких уровнях IgG₂-E2, в том

числе в комбинации с низкими уровнями IgG₂-Pg ($p = 0,003$, позиции 1.1 и 3.1 соответственно).

Анализ распределения больных по содержанию в опухоли Ki-67 с учетом разных уровней каждого из указанных антиидиотипических антител по-отдельности, в зависимости от концентрации E2 в сыворотке крови (позиции 1 и 2 в табл. 5 и 6), показал незначительное увеличение Ki-67 положительных клеток при высоких концентрациях E2 по сравнению с низким ($p > 0,05$). Это было характерно как для I, так и для II-IV стадий РМЖ. В то же время у больных с II-IV стадиями РМЖ и одновременно низкими уровнями IgG₂-E2 и IgG₂-Pg с высоким содержанием в сыворотке E2 удельный вес опухолей с большим количеством Ki-67 положительных клеток был больше, чем у таковых с низким содержанием E2 (позиция 3.1 в таблицах 6 и 5: 74,2% против 50,9%; $p = 0,03$).

ТАБЛИЦА 6. ЧИСЛО (n) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ НИЗКИХ (\leq) И ВЫСОКИХ ($>$) УРОВНЕЙ ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ (IgG₂-E2 и IgG₂-Pg, у. е.) И ИХ КОМБИНАЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ER⁺ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I И II-IV СТАДИЙ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ В СЫВОРОТКЕ E2 (пмоль/л) В СООТВЕТСТВИИ С УРОВНЯМИ Ki-67 В ОПУХОЛИ

TABLE 6. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF LOW (\leq) AND HIGH ($>$) LEVELS OF STUDIED ANTIIDIDIOTYPIC ANTIBODIES (IgG₂-E2 AND IgG₂-Pg, c. u.) AND THEIR COMBINATIONS IN I AND II-IV STAGES ER⁺ BREAST CANCER PATIENTS (BCP) WITH HIGH E2 SERUM CONCENTRATIONS (pmol/L) ACCORDING TO TUMOR Ki-67 LEVELS

Антитела и их комбинации Antibodies and their combinations	РМЖ ER ⁺ I стадия BCP ER ⁺ I stage (n = 373)			РМЖ ER ⁺ II-IV стадии BCP ER ⁺ II-IV stages (n = 379)			χ^2 (p), df = 2
	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	
E2 > 200							
1.1. IgG ₂ -E2 $\leq 3,5$	22/39,2	17/30,4	17/30,4	14/20,9	12/17,9	41/61,2	11,7 (0,003)
1.2. IgG ₂ -E2 $> 3,5$	31/33,3	28/30,1	34/36,6	39/33,3	22/18,8	56/47,9	4,3 (0,12)
χ^2 (p), df = 2	0,7 (0,69)			3,7 (0,15)			
2.1. IgG ₂ -Pg $\leq 2,5$	30/38,0	20/25,3	29/36,7	23/27,4	13/15,5	48/57,1	6,9 (0,03)
2.2. IgG ₂ -Pg $> 2,5$	23/32,9	25/35,7	22/31,4	30/30,0	21/21,0	49/49,0	6,4 (0,04)
χ^2 (p), df = 2	1,9 (0,39)			1,4 (0,49)			
3.1. IgG ₂ -E2 $\leq 3,5$ + IgG ₂ -Pg $\leq 2,5$	16/39,0	11/26,8	14/34,1	6/19,4	2/6,5	23/74,2	11,8 (0,003)
3.2. IgG ₂ -E2 $> 3,5$ + IgG ₂ -Pg $\leq 3,5$	14/36,8	9/23,7	15/39,5	17/32,1	11/20,8	25/47,1	0,5 (0,77)
3.3. IgG ₂ -E2 $\leq 3,5$ + IgG ₂ -Pg $> 2,5$	6/40,0	6/40,0	3/20,0	8/22,2	10/27,8	18/50,0	4,0 (0,13)
3.4. IgG ₂ -E2 $> 3,5$ + IgG ₂ -Pg $> 2,5$	17/31,0	19/34,5	19/34,5	22/34,4	11/17,2	31/48,4	5,0 (0,08)
χ^2 (p), df = 2 3.1-3.2	0,3 (0,88)			6,2 (0,045)			
χ^2 (p), df = 2 (3.2+3.3+3.4)-3.1	0,4 (0,88)			7,3 (0,03)			

У больных с низкой концентрацией в сыворотке $Pg \leq 600$ пмоль/л на I стадии РМЖ, как и в предыдущих случаях не обнаружили ассоциаций содержания в опухоли Ki-67 и исследуемых антител, в том числе и при их комбинациях (табл. 7). На II-IV стадиях высокие уровни IgG_2-E2 встречались чаще, чем низкие, при низком содержании в опухоли $Ki-67 \leq 14$ (35,7% против 15,2%) и, наоборот, реже при высоком $Ki-67 > 30$ (34,5% против 56,0%, $p = 0,008$). Такая закономерность проявлялась в комбинации низкими уровнями IgG_2-Pg (позиции 3.1-3.2, $p = 0,04$) и сохранялась как тенденция в комбинации с высокими уровнями IgG_2-Pg (позиции 3.3-3.4, $p > 0,05$). Наиболее значимые различия обнаружены между больными с одновременно низкими и одновременно высокими уровнями IgG_2-E2 и IgG_2-Pg (позиции 3.1-3.4, $p = 0,009$).

Снижение удельного веса опухолей с низким содержанием $Ki-67 \leq 14$ и соответствующее по-

вышение с $Ki-67 > 30$ у больных с II-IV стадиями РМЖ по сравнению с I стадией было выраженным при низких уровнях IgG_2-E2 и IgG_2-Pg , в том числе в их комбинации (позиции 1.1, 2.1, 3.1; $p < 0,001$), а также в комбинации низких уровней IgG_2-E2 с высоким IgG_2-Pg (позиции 3.3, $p = 0,002$). Во всех остальных случаях наблюдалась такая же тенденция, но статистически не достоверная.

В таблице 8 представлены результаты исследования искомых ассоциаций у больных РМЖ с высокими концентрациями Pg в сыворотке. В отличие от предыдущих случаев таковых не обнаружили у больных с II-IV стадиями РМЖ. В то же время у больных с I стадией и низким содержанием в опухоли $Ki-67 \leq 14$ комбинации одновременно низких и одновременно высоких уровней IgG_2-E2 и IgG_2-Pg (позиции 3.1 и 3.4) встречались чаще (40,4% и 36,1%), чем комбинации высокого уровня одного из них с низким другого (по-

ТАБЛИЦА 7. ЧИСЛО (n) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ НИЗКИХ (\leq) И ВЫСОКИХ ($>$) УРОВНЕЙ ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ (IgG_2-E2 и IgG_2-Pg , у. е.) И ИХ КОМБИНАЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ER⁺ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I И II-IV СТАДИЙ С НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ В СЫВОРОТКЕ PG (пмоль/л) В СООТВЕТСТВИИ С УРОВНЯМИ Ki-67 В ОПУХОЛИ

TABLE 7. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF LOW (\leq) AND HIGH ($>$) LEVELS OF STUDIED ANTIIDIDIOTYPIC ANTIBODIES (IgG_2-E2 AND IgG_2-Pg , c. u.) AND THEIR COMBINATIONS IN I AND II-IV STAGES ER⁺ BREAST CANCER PATIENTS (BCP) WITH LOW PG SERUM CONCENTRATIONS (pmol/L) ACCORDING TO TUMOR Ki-67 LEVELS

Антитела и их комбинации Antibodies and their combinations	РМЖ ER ⁺ I стадия BCP ER ⁺ I stage (n = 373)			РМЖ ER ⁺ II-IV стадии BCP ER ⁺ II-IV stages (n = 379)			χ^2 (p), df = 2
	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	
Pg ≤ 600							
1.1. $IgG_2-E2 \leq 3,5$	35/58,2	15/25,0	10/16,8	10/15,2	19/28,8	37/56,0	29,7 ($< 0,001$) 2,0 (0,37)
1.2. $IgG_2-E2 > 3,5$	49/45,0	31/28,4	29/26,6	30/35,7	25/29,8	29/34,5	
χ^2 (p), df = 2	3,2 (0,20)			9,8 (0,008)			
2.1. $IgG_2-Pg \leq 2,5$	45/56,2	16/20,0	19/23,8	14/20,9	21/31,3	32/47,8	19,3 ($< 0,001$) 6,9 (0,03)
2.2. $IgG_2-Pg > 2,5$	39/43,8	30/33,7	20/22,5	26/31,3	23/27,7	34/41,0	
χ^2 (p), df = 2	4,2 (0,12)			2,1 (0,36)			
3.1. $IgG_2-E2 \leq 3,5$ + $IgG_2-Pg \leq 2,5$	22/61,1	6/16,7	8/22,2	3/9,1	10/30,3	20/60,6	20,5 ($< 0,001$)
3.2. $IgG_2-E2 > 3,5$ + $IgG_2-Pg \leq 3,5$	23/52,3	10/22,7	11/25,0	11/32,4	11/32,4	12/35,3	3,1 (0,24)
3.3. $IgG_2-E2 \leq 3,5$ + $IgG_2-Pg > 2,5$	13/54,2	9/37,5	2/8,3	7/21,2	9/27,3	17/51,5	12,5 (0,002)
3.4. $IgG_2-E2 > 3,5$ + $IgG_2-Pg > 2,5$	26/40,0	21/32,3	18/27,7	19/38,0	14/28,0	17/34,0	0,6 (0,75)
χ^2 (p), df = 2 3.1-3.2	0,7 (0,70)			6,6 (0,04)			
χ^2 (p), df = 2 3.1-3.4	4,6 (0,10)			9,5 (0,009)			

зиции 3.2 и 3.3: 27,1% и 34,4%). Соответственно, при высоком содержании в опухоли Ki-67 > 30 эти показатели составили 30,8% и 26,4% против 47,9% и 43,8%. Различия между объединенными подгруппами (3.2+3.3) и (3.1+3.4) оказались статистически значимыми (p = 0,03).

Сравнение больных на II-IV стадиях с I стадией РМЖ по удельным весам опухолей с низким и высоким содержанием Ki-67 показало, что снижение первых и соответствующее повышение вторых имело место как при низких, так и при высоких уровнях IgG₂-E2 и IgG₂-Pg (позиции 1 и 2), в том числе при их одновременно низких и одновременно высоких уровнях (позиции 3.1 и 3.4). Такая же тенденция наблюдалась и в комбинациях высокого уровня одного из них при низком уровне другого (позиции 3.2 и 3.3), хотя была статистически недостоверной.

Анализ распределения больных с I стадией РМЖ по содержанию в опухоли Ki-67 с учетом разных уровней каждого из указанных антиидиотипических антител по-отдельности, в зависимости от концентрации Pg в сыворотке крови (позиции 1.1 и 2.1 в табл. 7 и 8), показал значимое увеличение количества случаев с высоким уровнем Ki-67 положительных клеток при высоких концентрациях Pg по сравнению с низкими: при низких уровнях IgG₂-E2 с 16,7% до 35,7% (p = 0,02) и при низких уровнях IgG₂-Pg с 23,8% до 39,0% (p = 0,01). Такая же закономерность проявлялась при высоких уровнях IgG₂-E2 в комбинации с низкими уровнями IgG₂-Pg (позиции 3,2: с 25,0% до 47,9%, p = 0,03) и при низких уровнях IgG₂-E2 в комбинации с высокими уровнями IgG₂-Pg (позиции 3.3: с 8,3% до 43,8%, p = 0,02).

У больных с II-IV стадиями РМЖ значимое возрастание доли опухолей с высоким содержа-

ТАБЛИЦА 8. ЧИСЛО (n) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ НИЗКИХ (≤) И ВЫСОКИХ (>) УРОВНЕЙ ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ (IgG₂-E2 и IgG₂-Pg, у. е.) И ИХ КОМБИНАЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ER⁺ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I И II-IV СТАДИЙ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ В СЫВОРОТКЕ Pg (пмоль/л) В СООТВЕТСТВИИ С УРОВНЯМИ Ki-67 В ОПУХОЛИ

TABLE 8. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF LOW (≤) AND HIGH (>) LEVELS OF STUDIED ANTIIDIOTYPIC ANTIBODIES (IgG₂-E2 AND IgG₂-Pg, c. u.) AND THEIR COMBINATIONS IN I AND II-IV STAGES ER⁺ BREAST CANCER PATIENTS (BCP) WITH HIGH Pg SERUM CONCENTRATIONS (pmol/L) ACCORDING TO TUMOR Ki-67 LEVELS

Антитела и их комбинации Antibodies and their combinations	РМЖ ER ⁺ I стадия BCP ER ⁺ I stage (n = 373)			РМЖ ER ⁺ II-IV стадии BCP ER ⁺ II-IV stages (n = 379)			χ ² (p), df = 2
	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	
Pg > 600							
1.1. IgG ₂ -E2 ≤ 3,5	32/38,1	22/26,2	30/35,7	21/22,6	18/19,4	54/58,1	9,1 (0,01)
1.2. IgG ₂ -E2 > 3,5	39/32,5	39/32,5	42/35,0	38/27,9	26/19,1	72/52,9	9,5 (0,009)
χ ² (p), df = 2	1,1 (0,58)			0,9 (0,64)			
2.1. IgG ₂ -Pg ≤ 2,5	34/34,0	27/27,0	39/39,0	26/23,6	19/17,3	65/59,1	8,5 (0,02)
2.2. IgG ₂ -Pg > 2,5	37/35,6	34/32,7	33/31,7	33/27,7	25/21,0	61/51,3	8,9 (0,01)
χ ² (p), df = 2	1,4 (0,51)			1,4 (0,49)			
3.1. IgG ₂ -E2 ≤ 3,5 + IgG ₂ -Pg ≤ 2,5	21/40,4	15/28,8	16/30,8	13/24,5	9/17,0	31/58,5	8,2 (0,02)
3.2. IgG ₂ -E2 > 3,5 + IgG ₂ -Pg ≤ 3,5	13/27,1	12/25,0	23/47,9	13/22,8	10/17,5	34/59,6	1,5 (0,46)
3.3. IgG ₂ -E2 ≤ 3,5 + IgG ₂ -Pg > 2,5	11/34,4	7/21,9	14/43,8	8/20,0	9/22,5	23/57,5	2,0 (0,36)
3.4. IgG ₂ -E2 > 3,5 + IgG ₂ -Pg > 2,5	26/36,1	27/37,5	19/26,4	25/31,6	16/20,3	38/48,1	8,9 (0,01)
χ ² (p), df = 2 (3.2+3.3)-3.4	6,9 (0,03)			2,6 (0,27)			
χ ² (p), df = 2 (3.2+3.3)-(3.1+3.4)	7,0 (0,03)			4,2 (0,12)			

нием Ki-67 положительных клеток при высоких концентрациях Pg обнаружили только при высоких уровнях IgG₂-E2 (позиции 1.2 в табл. 7 и 8: 34,5% до 52,9%, $p = 0,03$).

Обсуждение

Иммуногистохимический анализ ER, PR, Ki-67 и HER-2 является общепринятой диагностической процедурой в определении молекулярно-биологического подтипа РМЖ для последующего выбора оптимальной схемы комбинированного лечения. Утрата опухолю стереоидных рецепторов и возрастание количества клеток, экспрессирующих Ki-67 — очевидные признаки прогрессии РМЖ и других гормоно-зависимых злокачественных новообразований. Исследование внеклеточных факторов организма, модулирующих пролиферативную активность опухоли, представляется перспективным в поиске дополнительных маркеров прогрессии и, возможно, новых средств таргетной терапии рака.

Роль половых гормонов и гормон-связывающего глобулина в канцерогенезе молочной железы не вызывает сомнений. Гораздо менее изученным остается участие аутоантител, специфичных к стероидным гормонам и их рецепторам. А. Maselli и соавт. [10] в сыворотке крови 22 из 46 больных РМЖ обнаружили антитела, специфичные к ER α , уровень которых прямо коррелировал с количеством Ki-67 экспрессирующих клеток опухоли. В наших предыдущих статьях показано снижение удельного веса ER⁺ и PR⁺ опухолей при II-IV стадиях по сравнению с I у больных РМЖ с высокими уровнями идиотипических аутоантител IgA₁-E2 и низкими уровнями IgA₁-Pg [1]. Одновременное повышение уровней антиидиотипических аутоантител IgG₂-E2 и IgG₂-Pg было ассоциировано с трансформацией ER⁺/PR⁺ в ER⁻/PR⁻ опухоли при росте РМЖ [2].

Эти предварительные данные послужили основанием для исследования взаимосвязей между содержанием в опухоли Ki-67 с одной стороны и с уровнями E2 и Pg, а также соответствующих антиидиотипических аутоантител в сыворотке крови больных РМЖ с другой стороны. При этом учитывали следующие обстоятельства: 1) очевидную взаимосвязь экспрессии Ki-67 с ER/PR статусом опухоли; 2) способность антиидиотипических анти-антител к связыванию с мембранными ER и PR и предполагаемое их действие на пролиферативную активность опухоли; 3) вероятное совместное участие E2 и Pg, IgG₂-E2 и IgG₂-Pg в регуляции пролиферации опухоли; 4) вероятные различия иммуно-гормональной модуляции пролиферации опухоли в начале заболевания и при последующей прогрессии.

В исследованной нами когорте больных РМЖ ($n = 896$) действительно имело место возрастание удельного веса опухолей, интенсивно экспрессирующих Ki-67 на II-IV стадиях по сравнению с I: при ER⁺/PR⁺ опухолях — на 20%; при ER⁺/PR⁻ опухолях — на 27%; при ER⁻/PR⁻ опухолях — на 61%. Относительное количество опухолей с низким содержанием Ki-67 положительных клеток у больных с ER⁻/PR⁻ РМЖ было значительно меньше, чем у больных с ER⁺/PR⁺ и ER⁺/PR⁻ РМЖ как на I, так и на II-IV стадиях. При этом распределение больных по уровням Ki-67 с ER⁺/PR⁺ и ER⁺/PR⁻ опухолями было практически одинаковым. Это свидетельствовало о том, что только утрата опухолью обоих ER и PR (но не одного PR при сохранении ER) взаимосвязано с повышенной пролиферативной активностью, и послужило основанием для объединения больных с ER⁺/PR⁺ и ER⁺/PR⁻ в отдельную подгруппу ($n = 752$), в которой и были выполнены дальнейшие исследования.

Между уровнями IgG₂-E2 и IgG₂-Pg были выявлены прямые взаимосвязи, более значимые у больных с I стадией РМЖ ($p < 0,001$) и менее — с II-IV стадиями ($p = 0,02$). Не обнаружили никаких ассоциаций между содержанием в сыворотке E2 и Pg с одной стороны и уровнями IgG₂-E2 и IgG₂-Pg — с другой, на любой стадии РМЖ. То есть образование IgG₂-E2 и IgG₂-Pg оказалось взаимозависимым, а уровни E2 и Pg — независимыми от антиидиотипических антител, на каждой отдельной стадии. Вместе с тем, удельный вес больных с высокой концентрацией E2 (но не Pg) при II-IV стадиях превышал таковой при I стадии, если уровни IgG₂-E2 или IgG₂-Pg были высокими ($p < 0,01$). Это частично подтверждало стимулирующую роль E2 в прогрессии РМЖ.

Удельный вес больных с высокой концентрацией в сыворотке E2 (без учета Ki-67) при II-IV стадиях РМЖ был выше, чем при I стадии (48,5% против 39,9%, $p = 0,02$). Таких различий не обнаружили при анализе Pg ($p = 0,11$). Это также подтверждало проканцерогенное действие E2.

Исследование взаимосвязей экспрессии Ki-67 с содержанием стероидных гормонов показало, что у больных с высокими концентрациями Pg в сыворотке крови удельный вес опухолей с высокими уровнями Ki-67 больше, а с низким — меньше, чем у больных с низкими концентрациями Pg, как при I ($p = 0,008$), так и при II-IV стадиях ($p = 0,046$) РМЖ. Подобных ассоциаций не выявлено при анализе E2. Минимальное количество опухолей с интенсивной экспрессией Ki-67 обнаружено при одновременно низких уровнях E2 и Pg, а максимальное — при одновременно высоких (20,7% и 38,5% при I стадии, $p = 0,003$; 42,2% и 55,6% при II-IV, $p = 0,01$ соответственно). Опре-

деляющую роль при этом играл Pg. Возрастание удельного веса больных с большим количеством Ki-67 положительных клеток у больных с II-IV стадиями РМЖ по сравнению с I стадией было статистически значимым как при низких, так и при высоких концентрациях E2 и Pg, и при любой их комбинации.

Полученные результаты отчасти противоречат данным Li Q. и соавт. [8] о E2-стимуляции прогрессии ER⁺ РМЖ и Н. Mohammed и соавт. [11] о Pg-ингибиции E2-индуцированной пролиферации ER⁺ клеток РМЖ. Одним из возможных объяснений этих противоречий может быть влияние на пролиферацию опухоли других внеклеточных факторов наряду со стероидными гормонами, в частности антиидиотипических антител, способных связываться с мембранными ER и PR.

Исследование взаимосвязей Ki-67 с IgG₂-E2 и IgG₂-Pg (без учета содержания в сыворотке E2 и Pg) показало отсутствие таковых у больных с I стадией РМЖ как при их анализе по-отдельности, так и при индивидуальных комбинациях высоких и низких уровней. У больных с II-IV стадией и высоким уровне IgG₂-E2 удельный вес опухолей с низким содержанием Ki-67 положительных клеток был выше, а с высоким — ниже, чем у больных с низким уровнем IgG₂-E2 ($p = 0,03$). Подобных ассоциаций не обнаружили при исследовании IgG₂-Pg. Одновременно высоким уровням IgG₂-E2 и IgG₂-Pg соответствовали низкие значения удельного веса опухолей с высоким содержанием Ki-67 положительных клеток по сравнению с больными, у которых уровни этих антител были одновременно низкими или низким был уровень одного из них при высоком другого ($p = 0,03$). То есть у больных РМЖ на II-IV стадиях с одновременным образованием IgG₂-E2 и IgG₂-Pg зафиксировано торможение пролиферации опухоли по сравнению с больными, у которых имело место их недостаточное образование.

Возрастание количества опухолей с высоким содержанием Ki-67 от I до II-IV стадий РМЖ наблюдалось одинаково значимо у больных как с низкими, так и с высокими уровнями антител, исследованных по отдельности ($p = 0,005$ и менее). Однако это было характерно только при низких уровнях IgG₂-E2 в комбинации с низкими уровнями IgG₂-Pg ($p < 0,001$) или с высокими ($p = 0,006$). При высоких уровнях IgG₂-E2 это возрастание было статистически недостоверным или менее значимым ($p = 0,12$ и $p = 0,02$ соответственно). Таким образом, указанные антиидиотипические антитела оказались действительно способными модулировать пролиферативную активность РМЖ, и ведущую роль в этом играли IgG₂-E2.

Особый интерес в настоящей работе представляет исследование комплексного влияния стероидных гормонов и соответствующих антиидиотипических антител на пролиферацию опухоли у больных РМЖ. Наиболее демонстративно это влияние проявлялось при сопоставлении больных с высокими и низкими концентрациями гормонов в сыворотке.

У больных с I стадией РМЖ и высокой концентрацией Pg по сравнению с таковыми с низкой концентрацией Pg возрастание количества активно пролиферирующих опухолей было только при низких уровнях IgG₂-E2 (35,7% против 16,7%, $p = 0,021$) или при низких уровнях IgG₂-Pg (39,0% против 23,8%, $p = 0,01$), или при низких уровнях IgG₂-E2 в комбинации с высокими IgG₂-Pg (43,8 % против 8,3%, $p = 0,02$), или при низких IgG₂-Pg в комбинации с высокими IgG₂-E2 (47,9% против 25,0%, $p = 0,03$). Такого возрастания не обнаружили при одновременно высоких уровнях IgG₂-E2 и IgG₂-Pg (26,4% против 27,7%, $p > 0,05$).

Распределение больных с I стадией РМЖ с низкими и высокими концентрациями E2 не зависело от уровней исследуемых антител ни по отдельности, ни в комбинациях.

У больных с II-IV стадиями РМЖ и высокой концентрацией Pg по сравнению с таковыми с низкой концентрацией Pg возрастание количества активно пролиферирующих опухолей выявлено только при высоких уровнях IgG₂-E2 (52,9% против 34,5%, $p = 0,03$). При аналогичном сопоставлении больных с II-IV стадиями и разными концентрациями E2 соответствующие показатели составили 74,2% против 50,9% ($p = 0,03$) в случае одновременно низких уровней IgG₂-E2 и IgG₂-Pg.

Таким образом, стимулирующее пролиферацию опухоли действие избытка E2 проявлялось у больных с II-IV стадиями РМЖ при одновременно низких уровнях исследуемых антиидиотипических антител, а Pg — у больных с I стадией РМЖ при низком уровне любого из них в комбинации с высоким другого. Наиболее значимое возрастание удельного веса опухолей с высоким содержанием Ki-67 экспрессирующих клеток у больных с II-IV стадиями РМЖ по сравнению с I стадией имело место при одновременно низких уровнях IgG₂-E2 и IgG₂-Pg в комбинации с низкими и высокими концентрациями E2 ($p < 0,001$), с низкими ($p < 0,001$) и высокими ($p = 0,02$) концентрациями Pg.

При II-IV стадиях РМЖ у больных с одновременно высокими уровнями IgG₂-E2 и IgG₂-Pg удельный вес опухолей с высоким содержанием Ki-67 положительных клеток был ниже, чем у

больных с одновременно низкими их уровнями или (в некоторых случаях) с низкими уровнями одного из них. Кроме того, количество опухолей с высоким содержанием Ki-67 у больных с II-IV стадией РМЖ по сравнению с I возрастало незначительно при одновременно высоких уровнях IgG₂-E2 и IgG₂-Pg ($p > 0,06$). Такое тормозящее пролиферацию опухоли действие антител проявлялось независимо от концентрации в сыворотке E2 и у больных с низкой концентрацией Pg. У больных с высокой концентрацией Pg это действие было менее выражено.

Полученные результаты противоречат данным А. Maselli и соавт. [10] о прямой корреляции уровней анти-ER α антител в сыворотке крови с удельным весом Ki-67 положительных клеток в опухоли у больных РМЖ. Возможным объяснением этого представляются различия в исследуемых когортах больных и деталях иммуноанализа антител. В работе [10] среди 46 больных были женщины в пре- и постменопаузе; не учитывались содержание в сыворотке стероидных гормонов и стадия РМЖ; медиана возраста составляла 53 года; в качестве адсорбированного антитела в ELISA использовали очищенный ER α ; аутоантитела против PR вообще не изучались. В нашей работе выборка состояла из 752 женщин только в постменопаузе с медианой возраста 65 лет; учитывалось участие E2 и Pg в сыворотке крови в анализе искомым ассоциаций антиидиотипических антител с Ki-67; в качестве адсорбированных антигенов использовали моноклональные антитела против E2 и Pg, что позволило исследовать совместное участие IgG₂-E2 и IgG₂-Pg в модуляции пролиферативной активности опухоли. Не исключено и различие в связывании различных эпителиальных мембранных ER с анти-ER антителами и с антиидиотипическими антителами к E2 и Pg. Очевидно, что объяснение проявившихся противоречий требует дальнейших, более детальных исследований, тем более что в некоторых экспериментах *in vitro* антитела против ER блокировали эффект E2 на опухолевые клетки молочной железы линии MCF-7 [4].

Если одновременное отсутствие в сыворотке обоих антиидиотипических антител действительно

ассоциировано со стимуляцией пролиферативной активности опухоли, возникает вопрос, возможно ли их использование (или использование антител против ER и PR) в качестве антипролиферативных средств для лечения РМЖ? Выделение больных с высокой пролиферативной активностью опухоли и с низкими уровнями аутологических IgG₂-E2 и/или IgG₂-Pg могло бы послужить основанием для применения соответствующих экзогенных антиидиотипических антител или антител, блокирующих ER и/или PR, в качестве дополнительных средств таргетной терапии РМЖ по аналогии с антителами против HER-2, которые с успехом используются в лечении РМЖ.

Например, у больных РМЖ II-IV стадий с высоким содержанием в сыворотке E2 и одновременно низкими уровнями IgG₂-E2 и IgG₂-Pg (табл. 6, позиция 3.1) удельный вес опухолей с высоким содержанием Ki-67 положительных клеток составлял 74,2%. Теоретически этот показатель может снизиться до 47,1% при назначении им IgG₂-E2 (позиция 3.2), до 50,0% – при назначении IgG₂-Pg (позиция 3.3) и до 48,4% при назначении IgG₂-E2 совместно с IgG₂-Pg (позиция 3.4).

Заключение

Впервые описаны ассоциации пролиферативной активности опухоли с одной стороны и содержания в сыворотке крови антиидиотипических антител к E2 и Pg в совокупности с этими гормонами с другой стороны у больных РМЖ. Выявлены особенности указанных ассоциаций в начале заболевания (при I стадии РМЖ) и при его развитии (при II-IV стадиях). Определены комбинации уровней исследуемых антител в совокупности с концентрацией гормонов, стимулирующие и тормозящие пролиферацию опухоли. Предложено рассмотреть возможность использования антиидиотипических антител или антител против мембранных рецепторов стероидных гормонов в качестве дополнительных средств таргетной терапии РМЖ у больных со стимулирующим пролиферацию иммуно-гормональным статусом.

Список литературы / References

1. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Костянко М.В., Колпинский Г.И., Вафин И.А., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е. Иммунные реакции на химические канцерогены и стероидные гормоны у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями молочной железы // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 1. С. 101-108. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Kostyanko M.V., Kolpinckiy G.I., Vafin I.A., Antonov A.V., Verzhbitskaja N.E. Immune reactions to clinical carcinogens and steroid hormones in breast pre-cancer and cancer patients. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2021, Vol. 24, no. 1, pp. 101-108. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-977-IRT.

2. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Мун С.А., Гордеева Л.А., Костянко М.В., Антонов А.В., Байрамов П.В., Вержбицкая Н.Е., Колпинский Г.И. Кооперативное участие стероидных гормонов и гормон-специфических аутоантител в прогрессии рака молочной железы // *Фундаментальная и клиническая медицина*, 2023. Т. 8, № 2. С. 19-32. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.N., Bayramov P.V., Verzhbitskaya N.E., Kolpinskiy G.I. Cooperation of steroid hormones and hormone-specific autoantibodies in breast cancer progression. *Fundamentalnaya i klinicheskaya meditsina = Fundamental and Clinical Medicine*, 2023, Vol. 8, no. 2, pp. 19-32. (In Russ.)].
3. Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Костянко М.В., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е., Байрамов П.В., Колпинский Г.И., Вафин И.А., Глушков А.Н. Кооперативное участие идиотипических и антиидиотипических антител в стероид-зависимом химическом канцерогенезе // *Российский иммунологический журнал*, 2023. Т. 25, № 1. С. 35-48. [Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E., Bairamov P.V., Kolpinskiy G.I., Vafin I.A., Glushkov A.N. Cooperation of idiotypic and anti-idiotypic antibodies at the steroid-dependent chemical carcinogenesis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 35-48. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1177-CO.
4. Chaudhri R.A., Schwartz N., Elbaradie K., Schwartz Z., Boyan B.D. Role of ER α 36 in membrane-associated signaling by estrogen. *Steroids*, 2014, Vol. 81, pp. 74-80.
5. Dressing G.E., Goldberg J.E., Charles N.J., Schwertfeger K.L., Lange C.A. Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: a review of regulation and physiological implications. *Steroids*, 2011, Vol. 76, no. 1-2, pp. 11-17.
6. Greiner M., Pfeiffer D., Smith R.D. Principles and practical application of the receiver operating characteristic analysis for diagnostic test. *Prev. Vet. Med.*, 2000, Vol. 45, pp. 23-41.
7. Kampa M., Notas G., Pelekanou V., Troullinaki M., Andrianaki M., Azariadis K., Kampouri E., Lavrentaki K., Castanas E. Early membrane initiated transcriptional effects of estrogens in breast cancer cells: First pharmacological evidence for a novel membrane estrogen receptor element (ER α). *Steroids*, 2012, Vol. 77, no. 10, pp. 959-967.
8. Li Q., Gao H., Yang H., Wei W., Jiang Y. Estradiol promotes the progression of ER $^+$ breast cancer through methylation-mediated RSK4 inactivation. *Oncotargets Ther.*, 2019, Vol. 12, pp. 5907-5916.
9. Luconi M., Francavilla F., Porazzi I., Macerola B., Forti G., Baldi E. Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids*, 2004, Vol. 69, no. 8-9, pp. 553-559.
10. Maselli A., Capoccia S., Pugliese P., Raggi C., Cirulli F., Fabi A., Malorni W., Pierdominici M., Ortona E. Autoantibodies specific to estrogen receptor alpha act as estrogen agonists and their level correlate with breast cancer cell proliferation. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no. 2, e1074375. doi: 10.1080/2162402X.2015.1074375.
11. Mohammed H., Russell I.A., Stark R., Rueda O.M., Hickey T.E., Tarulli G.A., Serandour A.A., Birrell S.N., Bruna A., Saadi A., Menon S., Hadfield J., Pugh M., Raj G.V., Brown G.D., D'Santos C., Robinson J.L., Silva G., Launchbury R., Perou C.M., Stingl J., Caldas C., Tilley W.D., Carroll J.S. Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. *Nature*, 2015, Vol. 523, no. 7560, pp. 313-317.
12. Norfleet A.M., Clarke C.H., Gametchu B., Watson C.S. Antibodies to the estrogen receptor-alpha modulate rapid prolactin release from rat pituitary tumor cells through plasma membrane estrogen receptors. *FASEB J.*, 2000, Vol. 14, no. 1, pp. 157-165.
13. Sömjen D., Kohen F., Lieberherr M. Nongenomic effects of an anti-idiotypic antibody as an estrogen mimetic in female human and rat osteoblasts. *J. Cell. Biochem.*, 1997, Vol. 65, no. 1, pp. 53-66.

Авторы:

Глушков А.Н. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Поленок Е.Г. — к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Гордеева Л.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Authors:

Glushkov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Polenok E.G., PhD (Pharmacy), Leading Research Associate, Immunochemistry Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Gordeeva L.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Антонов А.В. — заведующий отделением опухолей молочной железы ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

Antonov A.V., Chief, Breast Cancer Department, Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Байрамов П.В. — заведующий патологоанатомическим отделением ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

Bayramov P.V., Main Physician, Pathology Department, Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Вержбицкая Н.Е. — к.м.н., врач-патологоанатом ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

Verzhbitskaya N.E., PhD (Medicine), Pathologist, Pathology Department, Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Колпинский Г.И. — д.м.н., профессор кафедры лучевой диагностики, лучевой терапии и онкологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет»; главный врач ГАУЗ «Клинический консультативно-диагностический центр имени И.А. Колпинского», г. Кемерово, Россия

Kolpinskiy G.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Radiology, Radiotherapy and Oncology, Kemerovo State Medical University; Main Physician, Kemerovo Clinical Diagnostic Center, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 11.07.2023
Принята к печати 03.10.2023

Received 11.07.2023
Accepted 03.10.2023

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИПА ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ КОРЬЮ РАЗНОГО ВОЗРАСТА НА ТЕРРИТОРИИ С ВЫСОКОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬЮ

Мамаева Т.А.¹, Рубальская Т.С.¹, Жердева П.Е.¹, Метельская В.А.¹,
Топтыгина А.П.^{1,2}

¹ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Резюме. По данным ВОЗ, заболеваемость корью находится в фазе циклического подъема. В эпидемический процесс вовлекаются не только не привитые, но и лица, ранее получившие одну или две дозы коревой вакцины. Цель исследования – определение иммунологической структуры больных корью разных возрастных групп на территории с высокой заболеваемостью. Для определения типа иммунного ответа больных корью использовались качественные и количественные показатели IgM и IgG, полученные методом ИФА на тест-системах: ВектоКорь-IgM (АО «Вектор-Бест», Россия); Anti-Measles Viruses ELISA (IgG) и Avidity Anti-Measles Viruses ELISA IgG (Euroimmun, Германия). Результаты исследования сывороток 1893 больных позволили определить тип иммунного ответа: первичный и вторичный. В сыворотках 72,64% больных с первичным иммунным ответом содержались низкоавидные IgG в концентрации 0,45 (0,22-0,74) МЕ/мл; в группе с вторичным иммунным ответом выявлены высокоавидные антитела в концентрации 24,28 (21,59-27,4) МЕ/мл. Уровень антител с вторичным типом ответа превышал значение IgG в первой группе в 54 раза ($p < 0,05$). В группе с первичным иммунным ответом количество детей (< 1-14 лет) и взрослых (18-70 лет) было практически одинаковым: 49,6% и 47,56%, а детей и взрослых с вторичным иммунным ответом было 2,12% и 96,53% соответственно ($p < 0,05$). Подростков (15-17 лет) было 46 человек, 84,78% из них на встречу с вирусом кори ответили первичным иммунным ответом. Таким образом, на территории с высокой заболеваемостью у больных корью разного возраста определен тип иммунного ответа: первичный в 72,64% и вторичный – 27,36%. Установлено, что в группе больных с вторичным типом иммунного ответа детей и подростков было в 27,8 раза меньше, чем взрослых, что свидетельствует о высокой эффективности вакцинации детей. В то же время результаты обследования больных корью с первичным типом иммунного ответа как детей, так и взрослых указывают на «пробелы» в программе вакцинопрофилактики.

Ключевые слова: корь, ИФА, антитела, IgM, IgG, степень авидности IgG, первичный тип иммунного ответа, вторичный тип иммунного ответа

Адрес для переписки:

Топтыгина Анна Павловна
ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.
Тел.: 8 (495) 452-18-01.
Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Address for correspondence:

Anna P. Toptygina
G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology
10 Admiral Makarov St
Moscow
125212 Russian Federation
Phone: +7 (495) 452-18-01.
Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Образец цитирования:

Т.А. Мамаева, Т.С. Рубальская, П.Е. Жердева, В.А. Метельская, А.П. Топтыгина «Определение типа иммунного ответа у больных корью разного возраста на территории с высокой заболеваемостью» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 1. С. 49-58.
doi: 10.46235/1028-7221-16572-DOT

© Мамаева Т.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.A. Mamaeva, T.S. Rubalskaya, P.E. Zherdeva, V.A. Metelskaya, A.P. Toptygina "Determination of the immune response type in measles patients of different ages from a high-incidence area", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 1, pp. 49-58. doi: 10.46235/1028-7221-16572-DOT

© Mamaeva T.A. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16572-DOT

DETERMINATION OF THE IMMUNE RESPONSE TYPE IN MEASLES PATIENTS OF DIFFERENT AGES FROM A HIGH-INCIDENCE AREA

Mamaeva T.A.^a, Rubalskaya T.S.^a, Zherdeva P.E.^a, Metelskaya V.A.^a,
Toptygina A.P.^{a, b}

^a G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. According to the WHO data, the incidence of measles is now in the cyclic increase phase. The non-vaccinated subjects, like as persons who have previously received one or two doses of measles vaccine are involved in the epidemic process. The purpose of our study was to determine the immunological pattern in the groups of measles patients of different age in areas with high incidence of infection. To determine the immune response type in measles patients, qualitative and quantitative indices of IgM and IgG were used, detected by the following ELISA test-systems: VectoMeasles-IgM (JSC “Vector-Best”, Russia); Anti-Measles Viruses ELISA (IgG) and Avidity Anti-Measles Viruses ELISA IgG (Euroimmun, Germany). The serological study of 1893 patient allowed to determine the primary and secondary types of immune response. In 72.64% of the patients with primary immune response, the serum samples contained low-avidity IgG at a concentration of 0.45 (0.22-0.74) IU/mL. In the group with a secondary immune response, high-avidity antibodies were detected at a concentration of 24.28 (21.59-27.4) IU/mL. The antibody levels in secondary type of response was 54-fold higher than IgG values in the first group ($p < 0.05$). In the group with primary immune response, the ratio of children (< 1 to 14 years) and adults (18 to 70 years old) was almost the same (49.6% and 47.56%). Appropriate values for children and adult cohorts with a secondary immune response were 2.12% and 96.53%, respectively ($p < 0.05$). Among 46 teenagers (15-17 years old), 84.8% responded with a primary immune response to the measles virus. Thus, in the area with high-incidence of measles among patients of different age, the primary-type immune response was determined in 72.64%, and secondary-type, in 27.36%. We have found that in the patients with a secondary type of immune response group, the proportion of children and teenagers was 27.8 times lower than among adults, thus indicating to high efficiency of vaccination in pediatric population. At the same time, the results of studies among measles patients with primary-type immune response, both children and adults, suggest some “gaps” in the vaccine prevention program.

Keywords: measles, ELISA, antibodies, IgM, IgG, IgG avidity, primary type of immune response, secondary type of immune response

Введение

Корь – высоко контагиозное (95%) антропонозное заболевание, вызываемое вирусом *Morbillivirus hominis*. Коревая инфекция носит генерализованный характер и перенесенное заболевание влечет за собой значительные риски в виде осложнений, связанных либо с вторичной бактериальной инфекцией, либо с персистенцией вируса [14, 22, 26].

Вакцинация, введенная по всему миру в 60-е годы прошлого столетия, стала чрезвычайно успешным событием в снижении заболеваемости корью и смертности от этой инфекции [22, 26]. Однако в последние годы вспышки кори во всем мире высветили проблемы в борьбе с коревой инфекцией. Число зарегистрированных случаев кори в мире увеличилось более чем вдвое с 2017 по 2018 гг., с 170 тыс. до 350 тыс. [24]. В 2019 г. было зарегистрировано 104 248 случаев кори, из них большая часть пришлось на три страны:

Украину (57 282 случая), Казахстан (13 326 случаев) и Грузию (3920 случаев) [24]. После периода низкой заболеваемости корью в мире (2020-2022), на фоне ограничительных мероприятий, направленных на борьбу с новой коронавирусной инфекцией, наблюдается ее глобальный подъем. По данным ВОЗ, в Европейском регионе в 2023 г. зарегистрировано 30 434 случая заболевания, наибольшее количество (87,5%) которых в странах СНГ: Республика Казахстан, Российская Федерация (РФ), Киргизская Республика [23]. Для сравнения, по данным официальной статистики, в 2019 г. на территории РФ был зарегистрирован 4491 случай [1], а по состоянию на декабрь 2023 года Национальный научно-методический центр по надзору за корью и краснухой (ННМЦ, Москва) сообщает о 12 812 случаях кори.

Несмотря на то, что в глобальной структуре заболеваемости корью доминируют непривитые лица, ежегодно регистрируются случаи заболе-

вания у вакцинированных/ревакцинированных, синтез специфических антител у которых осуществляется по первичному или вторичному типу иммунного ответа [6, 8, 9, 10, 20, 22, 26].

Если первичная коревая инфекция в большинстве случаев имеет выраженную клиническую картину, то у ранее привитых корь может иметь стертую, атипичное течение. Корь в отсутствие патогномичных признаков сопровождается такими симптомами, как лихорадка, пятнисто-папулезная сыпь, кашель, ринит, конъюнктивит. Каждый из этих симптомов неспецифичен и может быть вызван и другими возбудителями как вирусной, так и бактериальной этиологии [16, 19, 20, 26, 29].

Известно, что основным лабораторным маркером коревой инфекции до сих пор является выявление антител класса М в сыворотке крови больного с подозрением на эту инфекцию [4, 5, 16, 22]. Однако при определении IgM, особенно в период элиминации кори, могут появляться ложноположительные результаты, а серодиагностика коревой инфекции у ранее вакцинированных лиц требует дополнительных исследований [2, 22].

Разработанный ранее алгоритм, основанный на сочетании специфических тестов разного формата и класса определяемых антител (IgM, IgG), позволяет не только количественно, но и качественно оценивать показатели гуморального иммунитета [2, 3].

С учетом вышеизложенного, целью данного исследования явилось определение иммунологической структуры больных корью разного возраста на территории с высокой заболеваемостью.

Материалы и методы

Выбор территории, на которой проведены исследования, был определен высокой заболеваемостью и вовлеченностью больных разного возраста в эпидемический процесс. Для выполнения исследований были использованы образцы сывороток крови, полученные от 1893 больных корью разного возраста, зарегистрированных на территориях г. Москвы и Московской области в 2019 году, где была зафиксирована самая высокая среднемноголетняя заболеваемость: 6,3 на 100 тыс. населения против показателя 3,1 на 100 тыс. населения в целом в РФ [8]. Показаниями для проведения исследований по изучению иммунологической структуры больных корью явились характерные клинические проявления, данные эпидемиологического анамнеза и первичное лабораторное подтверждение диагноза.

Образцы сывороток крови были получены на 4–5 день после появления сыпи в 76,97% (1457/1893), и в 23,03% (436/1893) случаях на 9–10 день. Сыворотки хранились при -25°C до их ис-

пользования в данном исследовании. Анализ результатов проводили без учета вакцинального статуса, так как сведения о прививках имелись только у 142 (7,5%) пациентов. Исследования проводились на базе лаборатории Национального научно-методического центра (ННМЦ) по кори и краснухе (МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора) методом ИФА с использованием тест-систем: ВектоКорь-IgM, формат capture (АО «Вектор-Бест», Россия) – для качественного определения IgM; Anti-Measles Viruses ELISA (IgG), формат indirect (Euroimmun, Германия) – для количественного определения IgG; Avidity Anti-Measles Viruses ELISA IgG (Euroimmun, Германия) – для определения авидности IgG. Образцы сывороток, концентрация высокоавидных антител класса G в которых превышала верхнее значение калибровочной кривой используемой тест-системы (≥ 5 МЕ/мл), согласно инструкции производителя, были исследованы в разведениях 1:400–1:800. Результаты ИФА регистрировали с помощью микропланшетного фотометра Multiskan FC (Thermo Scientific, США) при двух длинах волн – 450 и 620 нм. Полученные результаты были обработаны методами непараметрической статистики с вычислением медианы (Me), первого и третьего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Различия между группами оценивали с помощью критерия Манна–Уитни, уровень $p < 0,05$ расценивался как значимый.

Результаты

Среди 1893 больных корью разного возраста (рис. 1) возрастная группа (< 1–14 лет) была представлена 693/1893 больными (36,61%), из которых дети в возрасте до 1 года составили 10,68% (74 человека). В группу подростков (15–17 лет) входили 46 человек (2,43%). Взрослые (18–70 лет) составили 60,96% (1154/1893) человек, из которых 71,23% (822) в возрастной группе 18–40 лет. Результатом тестирования 1893 образцов сывороток крови с использованием тест-системы ВектоКорь-IgM на содержание специфических IgM стало лабораторное подтверждение в 100% случаях. Специфические антитела класса G были выявлены в сыворотках 1457 (77%) пациентов, а результаты исследуемых 436 (23,0%) образцов были интерпретированы как отрицательные. Корь у этих больных была подтверждена выявлением сероконверсии низкоавидных антител класса G при исследовании второй сыворотки, полученной через 5–6 дней после первого образца. Анализ качественных и количественных показателей специфических антител, полученных при исследовании образцов сывороток больных по возрастам, статистически значимых различий не выявил, что позволило представить резуль-

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ IgM И IgG В СЫВОРОТКАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ КОРЬЮ РАЗНОГО ВОЗРАСТА С ПЕРВИЧНЫМ ТИПОМ ИММУННОГО ОТВЕТА

TABLE 1. QUANTITATIVE AND QUALITATIVE INDICATORS OF IgM AND IgG IN THE MEASLES PATIENTS OF DIFFERENT AGES SERUM WITH A PRIMARY TYPE OF IMMUNE RESPONSE

Возраст (годы) Age (years)	Число больных n/(%) Number of patients n/(%)	IgM-результат (ВектоКорь-IgM), n/% IgM the result (Vecto Measles IgM test system), n/%			IgG, МЕ/мл IgG, ME/mL Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	Индекс авидности IgG, % Avidity index IgG, % Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})
		Положительный Positive	Сомнительный Equivocal	Отрицательный Negative		
< 1	74 (5,38%)	74/100%	–	–	0,45 (0,22-0,74)	13 (8-24)
1-14	608 (44,22%)	608/100%	–	–		
15-17	39 (2,84%)	39/100%	–	–		
18-70	654 (47,56%)	654/100%	–	–		
Всего Total	1375 (100%)	1375 (100%)	–	–		

таты в виде двух групп, объединенных по типу иммунного ответа (первичного, вторичного) в зависимости от количественного и качественного содержания IgG в сыворотках крови больных. Пациенты с первичным типом иммунного ответа (табл. 1) составили 72,64% (1375/1893) от общего числа обследованных больных корью. Первичный тип иммунного ответа был подтвержден наличием в образцах сывороток специфических иммуноглобулинов М в 100% случаях (1375/1375) и IgG с низкой степенью авидности (13 (8-24) % в концентрации 0,45 (0,22-0,74) МЕ/мл. Результаты исследования образцов сывороток крови на содержание антител класса G показали, что из 1375 пациентов, ответивших первичным иммунным ответом, детей (< 1-14 лет) было 682/1375

(49,6%), среди них доля малышей до 1 года составила 10,85% (74/682). Количество детей (< 1-14 лет) и взрослых (18-70 лет) было практически одинаковым: 49,6% (682/1375) и 47,56% (654/1375). Подростков в этой группе было 39/1375 (2,84%).

Пациентов, ответивших вторичным типом иммунного ответа (табл. 2) с высоким содержанием IgG, было 27,36% (518/1893). В сыворотках больных этой группы доля положительных результатов по IgM, полученных с использованием набора ВектоКорь-IgM, так же как и в первой группе, составила 100% (518/518). Антитела класса G были высокоавидными (98 (95-100) %) в высокой концентрации 24,28 (21,59-27,40) МЕ/мл. Возрастная структура пациентов в 96,53% (500/518) представлена взрослыми (18-70 лет).

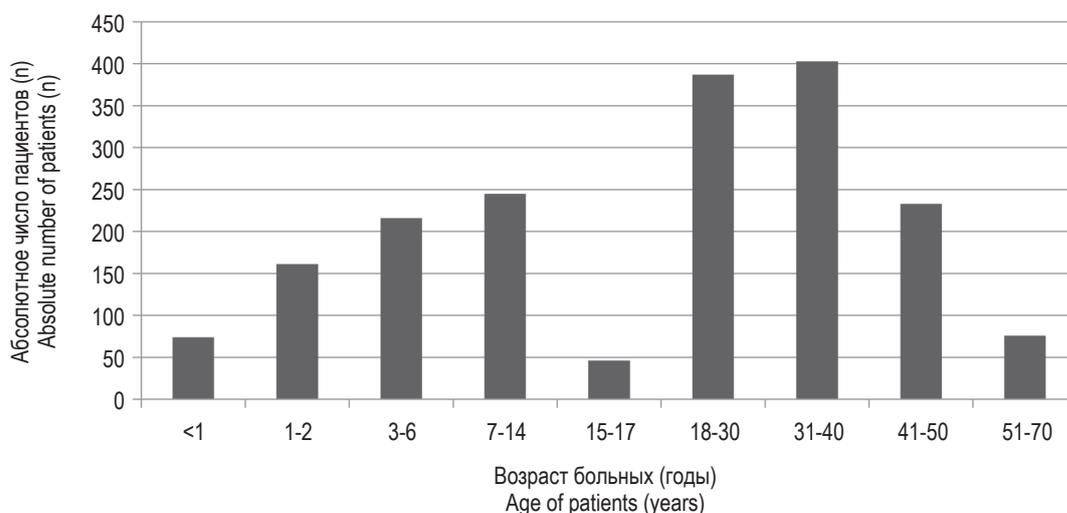


Рисунок 1. Возрастная структура больных корью

Figure 1. Age structure of patients with measles

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ IgM И IgG В СЫВОРОТКАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ КОРЬЮ РАЗНОГО ВОЗРАСТА С ВТОРИЧНЫМ ТИПОМ ИММУННОГО ОТВЕТА

TABLE 2. QUANTITATIVE AND QUALITATIVE INDICATORS OF IgM AND IgG IN THE MEASLES PATIENTS OF DIFFERENT AGES SERUM WITH A SECONDARY TYPE OF IMMUNE RESPONSE

Возраст (годы) Age (years)	Число больных n/(%) Number of patients n/(%)	IgM-результат (ВектоКорь-IgM), n/% IgM the result (Vecto Measles IgM test system), n/%			IgG, ME/мл IgG, ME/mL Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	Индекс avidности IgG, % Avidity index IgG, % Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})
		Положительный Positive	Сомнительный Equivocal	Отрицательный Negative		
< 1	–	–	–	–	24,28 (21,59-27,40)	98 (95-100)
1-14	11 (2,12%)	11/100%	–	–		
15-17	7 (1,35%)	7/100%	–	–		
18-70	500 (96,53%)	500/100%	–	–		
Всего Total	518 (100%)	518 (100%)	–	–		

Детей (1-14 лет) и подростков (15-17 лет) было 2,12% (11/518) и 1,35% (7/518) соответственно.

Таким образом, подтверждением первичного типа иммунного ответа у больных явилось выявление в сыворотке крови: положительного результата на IgM и низкоавидных антител класса

G в низкой концентрации; при вторичном типе иммунного ответа – определение положительного результата на IgM и высокоавидных IgG в высокой концентрации. Оценка гуморального иммунного ответа больных корью (1893 чел) разного возраста позволила составить иммуноло-

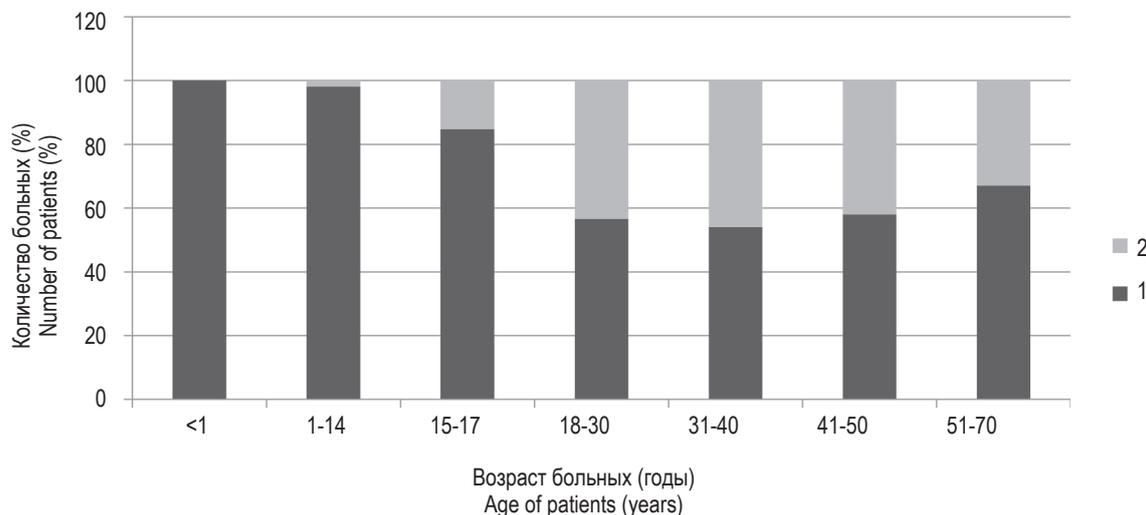


Рисунок 2. Иммунологическая карта больных корью разного возраста: 1 – больные с первичным иммунным ответом; 2 – больные с вторичным иммунным ответом

Примечание. Количественные данные участников эпидемического процесса, ответившие первичным или вторичным типом иммунного ответа, получены относительно общего числа больных каждой возрастной группы.

Figure 2. Immunological map of patients with measles of different ages: 1, group of primary immune response; 2, group of secondary immune response

Note. Quantitative data of participants in the epidemic process who responded with a primary or secondary type of immune response were obtained relative to the total number of patients in each age group.

гическую карту, которая отражает количественную и качественную (тип иммунного ответа) структуру участников эпидемического процесса (рис. 2). Так, возрастной состав участников эпидемического процесса, ответивших первичным типом иммунного ответа (1), представлен детьми (< 1-14 лет), – 682/1375 (49,6%); взрослыми (18-70 лет) – 654/1375 (47,56%). Следует отметить, что в возрастной группе (< 1-14 лет) было 98,41% (682/693) пациентов с первичным типом иммунного ответа, что свидетельствует об отсутствии у них вакцинации или перенесенной ранее инфекции. Среди больных 18-70 лет, ответивших первичным типом иммунного ответа, было 654/1154 (56,67%) человека; больных с вторичным типом 43,33% (500/1154). Из 46 подростков больных корью, ответивших первичным типом иммунного ответа, было 39/46 (84,78%) пациентов; вторичным – 7/46 (15,22%).

Обсуждение

Массовая плановая вакцинация, введенная во второй половине XX века, привела к изменению возрастной структуры больных корью. Если в довакцинальный период заболевали преимущественно дети, то в настоящее время в эпидемический процесс вовлекаются и взрослые как не привитые, так и привитые коревыми вакцинами с первичными и вторичными неудачами вакцинации [10, 15, 20]. В рамках наших исследований, было установлено изменение возрастной структуры больных корью: число заболевших детей составило 36,61%, что в 1,6 раза меньше, чем взрослых (18-70 лет) – 60,96%. Подростков (15-17 лет) было 2,43% от общего числа обследованных.

По данным ВОЗ, заболеваемость корью в настоящее время находится в фазе циклического подъема после предшествующего периода эпидемического спокойствия, а чрезвычайно высокая трансмиссивность вируса подвергает испытанию систему здравоохранения и ее эффективность [23]. Одни авторы утверждают о необходимости создания вакцин нового поколения и дополнительной вакцинации [18, 25], другие справедливо полагают, что не все потенциальные возможности программ иммунизации еще использованы [12, 13]. Для определения иммунологической структуры больных корью в разных возрастных группах, нами был использован разработанный ранее алгоритм [3] лабораторного подтверждения как типичных, так и атипичных случаев кори [2, 3]. Основанием для определения типа иммунного ответа явилось количественное определение IgG, которое используется не только для подтверждения случаев кори путем 4-кратного нарастания титров антител во второй сыворотке, но и для выявления бустер эф-

фекта специфических иммуноглобулинов класса G при встрече с вирусом кори лиц, не имеющих защитного уровня антител в сыворотке крови [9, 22, 28]. Для оценки качественного показателя IgG использовали тест по определению степени avidности коревых IgG, который основан на измерении силы связывания антител с эпитопами специфического антигена, что и обеспечивает использование данного теста не только с диагностической целью первичного случая заболевания, но и для идентификации реинфекции [15, 21, 27]. Это продемонстрировано и при других инфекциях, таких как краснуха, гепатит С, цитомегаловирусная инфекция и др. [19, 20].

Руководствуясь основанием подтверждения типа иммунного ответа, больные были распределены таким образом: пациенты с первичным типом иммунного ответа, который характеризовался наличием в сыворотках 72,64% больных низкоавидных (13 (8-24) %) IgG в концентрации 0,45 (0,22-0,74) МЕ/мл (табл. 1); вторичный тип иммунного ответа был установлен по результатам серологического обследования 27,36% больных, которые показали наличие в сыворотках высокоавидных (98 (95-100) %) антител класса G в высокой концентрации – 24,28 МЕ/мл (21,59-27,40) (табл. 2). Медиана содержания специфических IgG этой группы в 54 раза превышала соответствующее значение в группе с первичным типом иммунного ответа: 24,28 МЕ/мл против 0,45 МЕ/мл при $p < 0,05$. Полученные данные свидетельствуют о том, что результат встречи лиц, как привитых с вакцинными неудачами, так и не привитых, с диким вирусом кори, сопровождается синтезом специфических иммуноглобулинов по первичному и вторичному типу иммунного ответа, что подтверждают и другие исследователи [4, 14, 17, 22]. Литературные источники сообщают о том, что одной из причин заболеваемости корью пациентов, имеющих в анамнезе коревую вакцинацию, является снижение показателей поствакцинального иммунитета с годами [7, 30]. Однако снижение специфических антител с возрастом не означает полную потерю противокорьевого иммунитета, о чем свидетельствует ответ В-клеток памяти путем бустеризации IgG с высокой степенью avidности на фоне как типичных, так и атипичных клинических проявлений [3, 11].

В условиях элиминации кори и персонифицированного учета больных, классификация заболевших по типу иммунного ответа является важным инструментом для характеристики аспектов заболеваемости. Так, соотношение детей (< 1-14 лет) и взрослых (18-70 лет) было практически одинаковым в группе с первичным типом иммунного ответа: 49,6% и 47,56%, а в группе с вторичным типом иммунного ответа доля детей

в 45,5 раза статистически значимо меньше чем взрослых: 2,12% против 96,53% при ($p < 0,05$). На встречу с вирусом кори ответили первичным типом иммунного ответа 39/46 (84,78%) подростков.

Анализ результатов серологического обследования больных корью свидетельствует о том, что внимание следует обращать не только на возрастной состав участников эпидемического процесса, но и на количество больных с «вакцинными неудачами». Ранее (2014 год) было показано, что при показателе заболеваемости 3,24 на 100 тыс. населения, больных с вторичным типом иммунного ответа было 15,0% [2]. Полученные результаты настоящих исследований свидетельствуют о вовлечении 27,36% лиц с вакцинными неудачами на территории с показателем заболеваемости (6,3 на 100 тыс. населения), что, с учетом нетипичных форм заболевания, может явиться потенциалом распространения и заражения незащищенных групп населения.

Для оценки практической значимости полученных данных по определению типа иммунного ответа у лиц разного возраста в рамках данного исследования была разработана иммунологическая карта, на которой наглядно представлен не только процентный по возрастной состав участников эпидемического процесса с первичным и вторичным типом иммунного ответа на территории с высокой заболеваемостью, но и «пробелы» в организации программы иммунизации против кори (рис. 1, 2).

Высокий процент детского населения 36,61% (693/1893), вовлеченного в эпидемический процесс, свидетельствует о «пробелах» в организации программы вакцинации против кори. Практически все дети (< 1-14 лет) 682/693 (98,41%) ответили формированием первичного иммунного ответа. И если дети до одного года не привиты по возрасту, то заболеваемость 1-14-летних связана с «пробелами» в организации вакцинации (отказы от прививок, медицинские отводы, религиозные убеждения и др.). Следует отметить, что доля детей с вторичным типом иммунного ответа от общего числа заболевших возрастной группы

(1-14 лет) была малочисленна – 1,78% (11/619). Это свидетельствует о том, что привитые дети практически не вовлекаются в эпидемический процесс за счет наличия защитного уровня специфического иммунитета к вирусу кори, что подтверждает эффективность вакцинации детского населения, несмотря на высокую (6,3 на 100 тыс. населения) заболеваемость на территории.

О проблемах в организации вакцинопрофилактики свидетельствует и доля взрослых (18-70 лет), встреча с вирусом у которых была впервые 56,67% (654/1154). Среди больных возрастной группы 18-70 лет, лиц с вторичным типом иммунного ответа было 43,33% (500/1154), что свидетельствует о проблеме другого характера – истощение поствакцинального уровня противокоревых антител ниже защитного уровня.

Выводы

1. На территории с высокой заболеваемостью у больных корью разного возраста определен тип иммунного ответа: первичный – 72,64% и вторичный – 27,36%.

2. Выявлено достоверное различие в качественных и количественных показателях IgG при первичном и вторичном типе иммунного ответа: низкоавидные в концентрации 0,45 МЕ/мл и высокоавидные в концентрации 24,28 МЕ/мл соответственно ($p < 0,05$).

3. Установлено, что в группе больных с вторичным типом иммунного ответа детей и подростков (1-17 лет) было 3,47%, а взрослых (18-70 лет) – 96,53%, что свидетельствует о высокой эффективности вакцинации детского населения.

4. Данные иммунологического обследования больных корью с первичным типом иммунного ответа детей декретированного возраста и подростков (1-17 лет) – 49,73%, так же как и взрослых (18-70 лет) – 50,27% указывают на «пробелы» в программе вакцинопрофилактики в целом.

Список литературы / References

1. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году» https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=14933. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=14933. [State report «On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2019». [Electronic resource]. Access mode: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=14933.

2. Мамаева Т.А., Железнова Н.В., Бичурина М.А., Наумова М.А., Говорухина М.В., Топтыгина А.П. Оценка возрастной структуры больных корью с первичным и вторичным иммунным ответом за период 2010-2016 годы в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 4. С. 717-728. [Mamaeva T.A., Zheleznova N.V., Bichurina M.A., Naumova M.A., Govoruhina M.V., Toptygina A.P. Evaluation

of age-related distribution of measles cases with primary and secondary immune response in Russian Federation, 2010-2016. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, Vol. 10, no. 4, pp. 717-728. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-EOA-1407.

3. Мамаева Т.А., Железнова Н.В., Наумова М.А., Говорухина М.В., Калашникова Н.А., Бичурина М.А., Мукомолов С.Л. Алгоритм лабораторного подтверждения и дифференциальной диагностики коревой инфекции в период элиминации кори в Российской Федерации // *Инфекция и иммунитет*, 2015. Т. 5, № 1. С. 55-62. [Mamaeva T.A., Zheleznova N.V., Naumova M.A., Govoruhina M.V., Kalashnikova N.A., Bichurina M.A., Mukomolov S.L. Algorithm of laboratory confirmation and differential diagnosis of measles infection at the stage of the measles elimination program in Russia. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, Vol. 5, no. 1, pp. 55-62. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2015-1-55-62.

4. Мамаева Т.А., Наумова М.А., Железнова Н.В., Липская Г.Ю., Mulders M., Featherstone D.A. Оценка коммерческих тест-систем ИФА разного формата для определения уровня специфических IgM и IgG в сыворотках больных корью // *Вопросы вирусологии*, 2013. Т. 58, № 5. С. 43-48. [Mamaeva T.A., Naumova M.A., Zheleznova N.V., Lipskaya G.Y., Mulders M., Featherstone D.A. Estimation of the commercial ELIZA test-systems of different formats to detect specific IgM and IgG in the measles patients sera. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, Vol. 58, no. 5, pp. 43-48. (In Russ.)]

5. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202102180019>. [SanPiN 3.3686-21 «Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases». (In Russ.)]

6. Топтыгина А.П., Мамаева Т.А. Динамика синтеза и циркуляции субклассов специфических IgG при иммунном ответе на вакцину против кори, краснухи, эпидемического паротита // *Российский иммунологический журнал*, 2019. Т. 13, № 1. С. 78-85. [Toptygina A.P., Mamaeva T.A. Analyzing features of measles immune response in adult patients. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 1, pp. 78-85. (In Russ.)] doi: 10.31857/S102872210005024-1.

7. Топтыгина А.П., Смердова М.А., Наумова М.А., Владимировна Н.П., Мамаева Т.А. Влияние особенностей популяционного иммунитета на структуру заболеваемости корью и краснухой // *Инфекция и иммунитет*, 2018. Т. 8, № 3. С. 341-348. [Toptygina A.P., Smerdova M.A., Naumova M.A., Vladimirova N.P., Mamaeva T.A. Influence of population immunity peculiarities on the structure of measles and rubella prevalence. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 3, pp. 341-348. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-341-348.

8. Цвиркун О.В., Тихонова Н.Т., Тураева Н.В., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Герасимова А.Г. Характеристика популяционного иммунитета к кори в Российской Федерации // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*, 2020. Т. 19, № 4. С. 6-13. [Tsvirkun O.V., Tikhonova N.T., Turaeva N.T., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Gerasimova A.G. Population immunity and structure of measles cases in the Russian Federation. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2020, Vol. 19, no. 4, pp. 6-13. (In Russ.)]

9. Chen R.T., Markowitz L.E., Albrecht P., Stewart J.A., Mofenson L.M., Preblud S.R., Orenstein W.A. Measles antibody: reevaluation of protective titers. *J. Infect. Dis.*, 1990, Vol. 162, no. 5, pp. 1036-1042.

10. Cherry J.D., Zahn M. Clinical Characteristics of measles in previously vaccinated and unvaccinated patients in California. *Clin. Infect. Dis.*, 2018, Vol. 67, no. 9, pp. 1315-1319.

11. Damien B., Huiss S., Schneider F., Muller C.P. Estimated susceptibility to asymptomatic secondary immune response against measles in late convalescent and vaccinated persons. *J. Med. Virol.*, 1998, Vol. 56, pp. 85-90.

12. Durrhem D.N. Measles virus is unforgiving where immunity gaps exist. *J. Infect. Dis.*, 2017, Vol. 216, no. 10, pp. 1183-1184.

13. Durrhem D.N., Crowcroft N.S. The price of delaying measles eradication. *Lancet Public Health*, 2017, Vol. 2, no. 3, pp. e130-e131

14. Griffin D.E. The immune response in measles: virus control, clearance and protective immunity. *Viruses*, 2016, Vol. 8, no. 10, 282. doi: 10.3390/v8100282.

15. Hahn S.J.M., Nic Lochlainn L.M., van Burgel N.D. Measles outbreak among previously immunized healthcare workers, The Netherlands, 2014. *J. Infect. Dis.*, 2016, Vol. 214, no. 12, pp. 1980-1986.

16. Hübschen J.M., Bork S.M., Brown K.E., Mankertz A., Santibanez S., Ben Mamou M., Mulders M.N., Muller C.P. Challenges of measles and rubella laboratory diagnostic in the era of elimination. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2017, Vol. 23, pp. 511-515.

17. Hübschen J.M., Gouandjika-Vasilache I., Dina J. Measles. *Lancet*. 2022, Vol. 399, pp. 678-690.

18. Javelle E., Colson P., Parola P., Raoult D. Measles, the need for a paradigm shift. *Eur. J. Epidemiol.*, 2019, Vol. 34, no. 10, pp. 897-915.

19. Kang J.H. Febrile illness with skin rashes. *Infect. Chemother*, 2015, Vol. 47, pp. 155-166

20. Komabayashi K., Seto J., Tanaka S. The largest measles outbreak, including 38 modified measles and 22 typical measles cases in its elimination Era in Yamagata, Japan, 2017. *Jap. J. Infect. Dis.*, 2018, Vol. 71, no. 6, pp. 413-418.

21. Kontio M., Jokinen S., Paunio M., Peltola H., Davidkin I. Waning Antibody Levels and Avidity: Implications for MMR Vaccine-Induced Protection. *J. Infect. Dis.*, 2012, Vol. 206, no. 10, pp. 1542-1548.

22. Manual for the Laboratory-based Surveillance of Measles, Rubella, and Congenital Rubella Syndrome. Third edition, June 2018. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/chapter-1-manual-for-the-laboratory-based-surveillance-of-measles-rubella-and-congenital-rubella-syndrome>.
23. Measles and rubella monthly update – WHO European Region – November 2023. Available at: <https://www.who.int/europe/publications/m/item/measles-and-rubella-monthly-update-who-european-region-november-2023>.
24. Measles and rubella strategic framework: 2021-2030. World Health Organization. 2020. Available at: <https://iris.who.int/handle/10665/339801>.
25. McKee A., Ferrari M.J., Shea K. Correlation between measles vaccine doses: implications for the maintenance of elimination. *Epidemiol. Infect.*, 2018, Vol. 146, pp. 468-475
26. Rota P.A., Moss W.J., Takeda M., de Swart R.L., Thompson K.M., Goodson J.L. Measles. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2016, Vol. 2, 16049. doi: 10.1038/nrdp.2016.49.
27. Sowers S.B., Rota J.S., Hickman C.J., Mercader S., Redd S., McNall R.J. High concentrations of measles neutralizing antibodies and high-avidity measles IgG accurately identify measles reinfection cases. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2016, Vol. 23, no. 8, pp. 707-716.
28. WHO epidemiological report. Regional Office for Europe of the World Health Organization, 2020, Vol. 1, pp. 1-13. Available at: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/434364/EpiBrief-1-2020-rus.pdf.
29. Woods C.R. False-positive results for immunoglobulin M serologic results: explanations and examples. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.*, 2013, Vol. 2, no. 1, pp. 87-90.
30. Zhang Z., Chen M., Ma R., Pan J., Suo L., Lu L. Outbreak of measles among persons with secondary vaccine failure, China, 2018. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2020, Vol. 16, no. 2, pp. 358-361.

Авторы:

Мамаева Т.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории прикладной иммунохимии ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Рубальская Т.С. — руководитель лаборатории прикладной иммунохимии ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Жердева П.Е. — научный сотрудник лаборатории прикладной иммунохимии ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Authors:

Mamaeva T.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Applied Immunochemistry, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Rubalskaya T.S., Head, Laboratory of Applied Immunochemistry, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Zherdeva P.E., Research Associate, Laboratory of Applied Immunochemistry, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Метельская В.А. — к.б.н., старший научный сотрудник, и.о. руководителя лаборатории прикладной иммунохимии ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Топтыгина А.П. — д.м.н., главный научный сотрудник, руководитель лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Metelskaya V.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Acting Head, Laboratory of Applied Immunochemistry, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Toptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head, Laboratory of Cytokines, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Поступила 07.02.2023
Принята к печати 13.03.2023

Received 07.02.2023
Accepted 13.03.2023

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ У ДЕТЕЙ

Савченко А.А.¹, Мартынова Г.П.², Иккес Л.А.², Беленюк В.Д.¹,
Борисов А.Г.¹

¹ Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения
Российской академии наук”», г. Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора
В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Резюме. Характер течения инфекционных заболеваний, вызванных вирусами, а зачастую и их исход, определяется активностью воспалительной реакции, которая реализуется как на местном, так и на системном уровне. Однако особенности функционирования нейтрофилов в процессе воспалительной реакции при инфекционном мононуклеозе (ИМ), вызванном попаданием вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), в настоящее время практически не исследованы.

Целью исследования явилось изучение особенностей фенотипического состава нейтрофилов крови у детей с ИМ.

Обследовано 84 ребенка в возрасте от 3 до 11 лет с ВЭБ-инфекцией средней и тяжелой степени тяжести. Все пациенты имели положительный тест на ДНК ВЭБ в лимфоцитах крови и серологические маркеры острой ВЭБ-инфекции. Контрольную группу составили 40 практически здоровых детей аналогичного возрастного диапазона. Исследование фенотипа нейтрофилов осуществляли методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови.

При исследовании фенотипа нейтрофилов по комбинации двух функциональных антигенов CD64 и CD32 обнаружено, что у детей с ИМ независимо от возраста основной фракцией нейтрофилов крови являются дубль-отрицательные клетки, тогда как у здоровых детей – CD64⁺CD32⁺-нейтрофилы. Основная фракция нейтрофилов в парной комбинации антигенов CD64 и CD11b у больных детей 3–6 и 7–11 лет определяется такая же, как и у здоровых (CD64⁺CD11b⁺), но при изменении содержания минорных фракций клеток. Количество CD64⁺CD15⁺-нейтрофилов (основная фракция клеток у здоровых детей) у больных обеих возрастных группах значительно снижается. Однако наблюдается выраженное увеличение уровня дубль-отрицательных клеток по антигенам CD64 и CD15. По экспрессии рецепторов CD32 и CD11b у детей с ИМ независимо от возраста в качестве основной

Адрес для переписки:

Савченко Андрей Анатольевич
Научно-исследовательский институт
медицинских проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел.: 8 (391) 212-52-63.
E-mail: aasavchenko@yandex.ru

Address for correspondence:

Andrei A. Savchenko
Research Institute of Medical Problems of the North
3g Partizan Zheleznyak St
Krasnoyarsk
660022 Russian Federation
Phone: +7 (391) 212-52-63.
E-mail: aasavchenko@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Савченко, Г.П. Мартынова, Л.А. Иккес,
В.Д. Беленюк, А.Г. Борисов «Особенности фенотипа
нейтрофильных гранулоцитов при инфекционном
мононуклеозе у детей» // Российский иммунологический
журнал, 2024. Т. 27, № 1. С. 59-70.
doi: 10.46235/1028-7221-16077-FOT

© Савченко А.А. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Savchenko, G.P. Martynova, L.A. Ikkes, V.D. Belenyuk,
A.G. Borisov “Features of the neutrophil granulocyte phenotype
in children with infectious mononucleosis”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024,
Vol. 27, no. 1, pp. 59-70.
doi: 10.46235/1028-7221-16077-FOT

© Savchenko A.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16077-FOT

фракции нейтрофилов выявляются клетки с фенотипом CD32⁻CD11b⁺, тогда как у здоровых детей — CD32⁺CD11b⁺. При этом в обеих возрастных группах больных детей также повышается содержания дубль-отрицательных нейтрофилов по данным маркерам. В качестве основных фракций нейтрофилов по парной комбинации антигенов CD11b и CD15 при ИМ выявляются клетки с фенотипами CD11b⁻CD15⁺ и CD11b⁺CD15⁺, у здоровых детей — только CD11b⁺CD15⁺ нейтрофилы.

Изменения в фенотипе нейтрофилов при ИМ характеризуют снижение миграционной способности клеток с высокой активностью провоспалительных функций. Установлены онтогенетические особенности фенотипа нейтрофилов, которые значительно изменяются у детей с ИМ, что, по-видимому, определяется иммунопатогенезом вирусной инфекции. Выявленные изменения в фенотипическом составе нейтрофилов при ИМ могут определяться как особенностью защитной реакции клеток врожденного иммунитета, так и патогенным действием самого вируса на нейтрофилы.

Ключевые слова: инфекционный мононуклеоз, возраст детей, нейтрофилы, фенотип, функциональная активность, экспрессия рецепторов

FEATURES OF THE NEUTROPHIL GRANULOCYTE PHENOTYPE IN CHILDREN WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Savchenko A.A.^a, Martynova G.P.^b, Ikkes L.A.^b, Belenyuk V.D.^a,
Borisov A.G.^a

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

^b V. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. The course of infectious diseases caused by viruses, and their common outcome is determined by the activity of the inflammatory reaction which occurs both at the local and systemic levels. However, the features of neutrophil functions during inflammatory reaction are virtually unknown in the patients with infectious mononucleosis (IM), caused by Epstein–Barr virus (EBV). Hence, the aim of our study was to evaluate some characteristics of phenotypic spectrum of blood neutrophils in children with IM. Patients and methods. We examined 84 children aged 3 to 11 years with EBV infection with moderate or severe clinical course of the disease. All patients exhibited a positive test for EBV DNA in blood lymphocytes and appropriate serological markers of acute EBV infection. The control group consisted of 40 conditionally healthy children at the similar age range. The study of neutrophil phenotype was carried out by flow cytometry using direct immunofluorescence of whole peripheral blood samples.

A study of the neutrophil phenotype with a combination of two functional antigens (CD64 and CD32) has revealed that in children with IM, regardless of age, the main fraction of blood neutrophils are double-negative cells, whereas in healthy children it consists of CD64⁻CD32⁺ neutrophils. The main fraction of neutrophils in the paired combination of CD64 and CD11b antigens in sick children aged 3-6 and 7-11 years was similar to the healthy controls (CD64⁻CD11b⁺), but with a change in the content of minor cell fractions. The number of CD64⁻CD15⁺ neutrophils (main fraction of cells in healthy children) proved to be significantly reduced in the IM patients of both age groups. However, we have revealed a marked increase in the level of double-negative cells for the CD64 and CD15 antigens. At the same time, the content of double-negative neutrophils for these markers was also increased in IM children of both age groups. The cells with CD11b⁻CD15⁺ and CD11b⁺CD15⁺ phenotypes comprised the main fractions in IM, as studied by a paired combination of CD11b and CD15 antigens; in healthy children — only CD11b⁺CD15⁺ neutrophils are detected.

The phenotypic changes of neutrophils during IM suggest a decreased migratory ability of cells with high activity of proinflammatory functions. The established ontogenetic features of the neutrophil phenotype are significantly changed in the children with IM, probably, due to specific immunopathogenesis of the viral infection. The detected changes in phenotypic composition of neutrophils associated with IM may be caused both by the features of protective reaction of innate immune cells and pathogenic effects of the virus itself upon blood neutrophils.

Keywords: infectious mononucleosis, age of children, neutrophils, phenotype, functional activity, receptor expression

Введение

Инфекционный мононуклеоз (ИМ) — часто встречающаяся клиническая форма инфекции, преимущественно вызванная вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ), которая представляет собой неспецифическую клинически манифестную реакцию ретикулоэндотелиальной системы на инфекционный процесс. Вирус способен пожизненно персистировать в организме, осуществляя репликацию преимущественно в В-лимфоцитах [1, 17]. Такая персистенция ВЭБ приводит к возникновению иммунодефицитных состояний и является патогенетическим фоном для формирования контингента детей, подверженных повторным эпизодам респираторной патологии [1, 2, 9].

При ВЭБ-инфекции у детей может нарушаться функция не только В-лимфоцитов, но и таких клеток иммунной системы, как Т-лимфоциты, НК-клетки, нейтрофилы [3, 9]. Причем изменения реактивности клеток иммунной системы может осуществляться как за счет их инфицирования, так и опосредованными механизмами, например, через нарушения регуляторных процессов в иммунной системе. В частности, проведенными ранее исследованиями было показано, что у детей с ВЭБ-инфекцией в нейтрофилах крови нарушаются механизмы синтеза первичных и вторичных АФК, что влияет на развитие полноценной функциональной активности клеток [3].

В настоящее время все большее внимание привлекают исследования, связанные с ролью клеток врожденного иммунитета в иммунопатогенезе вирусных инфекций [8, 13]. Связано это с тем, что характер течения инфекционных заболеваний, вызванных вирусами, а зачастую и их исход, определяется активностью воспалительной реакции, которая реализуется как на местном, так и на системном уровне. Известно, что нейтрофильные гранулоциты вовлекаются в развитие любого иммуновоспалительного процесса [3, 4, 10]. Воспринимая многочисленные сигналы о дестабилизации внутренней среды, нейтрофилы модулируют свои функции, нацеленные на ее восстановление. Активированные нейтрофильные гранулоциты при этом становятся мощными эффекторами пусковых и регуляторных механизмов самых начальных этапов инфекционных заболеваний, определяющих характер развития воспалительных процессов. Уже как эффекторы нейтрофилы способны реализовать широкий спектр защитных реакций — фагоцитоз, формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NETs) и синтезировать и секретировать широкий спектр цитотоксических молекул (например, активных форм кислорода (АФК), лизосомальных ферментов и т.

д.) [3, 4, 15]. В то же время, в связи с тем, что нейтрофильные гранулоциты способны синтезировать и в рамках реализации своих эффекторных функций выделять в окружающую среду различные цитокины, регулирующие функциональную активность других клеток иммунной системы, нейтрофилы определяются и как регуляторные клетки [4, 10]. При этом эффекторная и регуляторная активность нейтрофильных гранулоцитов значительно зависит от экспрессии соответствующих рецепторов на поверхности клетки. Причем изменения в уровнях экспрессии активационных рецепторов на нейтрофилах при развитии иммуновоспалительных процессов будут характеризовать роль клеток при данной патологии и уровень нарушения их функциональной активности [4, 7].

Таким образом, целью данного исследования явилось изучение особенностей фенотипического состава нейтрофилов крови у детей с ИМ.

Материалы и методы

На базе инфекционного отделения КГБУЗ «Красноярская межрайонная детская клиническая больница № 1» г. Красноярск обследовано 84 ребенка в возрасте от 3 до 11 лет с ВЭБ-инфекцией средней и тяжелой степени тяжести. В группу обследования не были включены дети с негладким течением ИМ (тяжелая нейтропения, тромбоцитопения и повышение аминотрансфераз более 5 норм) на фоне лечения противовирусными и антибактериальными препаратами и препаратами, обладающими иммуномодулирующим действием, а также больные с наличием другого инфекционного заболевания, перенесенного в течение последнего месяца перед включением в обследование, и при отказе в подписании информированного согласия на участие в клиническом исследовании. Все наблюдаемые нами пациенты имели положительный тест на ДНК ВЭБ в лимфоцитах крови и серологические маркеры острой ВЭБ-инфекции (ВЭБ-VCАIgM (+), ВЭБ-ЕА-DIgG (+)). Контрольную группу составили 40 практически здоровых детей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование было одобрено комитетами по этике НИИ МПС и КрасГМУ, выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека» (с изменениями 2013 г.) и «Правилами надлежащей клинической практики в Российской Федерации», утвержденной приказом Минздрава России от 19 июня 2003 г. № 266.

Забор крови у обследуемых детей производили утром натощак с 8 до 9 часов. Цельную периферическую кровь забирали из локтевой вены в 4

ТАБЛИЦА 1. КЛОН БЕЛКА, ИЗОТИП, ФЛУОРОХРОМ И ПРОИЗВОДИТЕЛЬ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ В ИССЛЕДОВАНИИ

TABLE 1. PROTEIN CLONE, ISOTYPE, FLUOROCHROME AND MANUFACTURER OF MONOCLONAL ANTIBODIES USED IN THE STUDY

Антитело Antibody	Клон Clone	Изотип Isotype	Флуорохром Fluorochrome	Производство Production
CD64	22	Mouse IgG1	FITC	Beckman Coulter
CD32	FUN-2	Mouse IgG2b	PE	BioLegend
CD11b	LM2	Mouse IgG1	PerCP/Cyanine5.5	BioLegend
CD16	3G8	Mouse IgG1	PC7	Beckman Coulter
CD15	HI98	Mouse IgM	Alexa Fluor® 700	BioLegend
CD45	HI30	Mouse IgG1	APC/Cyanine7	BioLegend

мл вакутейнер с K_2 ЭДТА. Исследование развернутого анализа крови и фенотипического состава нейтрофилов осуществляли в течение 2 часов после забора крови. Исследование содержания лейкоцитов и общей фракции нейтрофилов в крови осуществляли на гематологическом анализаторе DxH 500 (Beckman Coulter, США) центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН. Иммунофенотипирование нейтрофильных гранулоцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с помощью моноклональных антител, меченных FITC (fluorescein isothiocyanate); PE (phycoerythrin), PerCP/Cyanine 5.5 (peridinin-chlorophyll protein-cyanin 5.5), PC7 (phycoerythrin-cyanin 7), APC (allophycocyanin), AF700 (Alexa Fluor 700) и APC/Cyanine7 (allophycocyanin-cyanine7) (табл. 1). Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [20]. Лизис эритроцитов был выполнен по безотмывочной технологии с использованием реагента VersLyse (Beckman Coulter, США). Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [5]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН. Обработку полученных цитофлуориметрических результатов осуществляли с помощью программ Navios Software v. 1.2 и Kaluza v. 2.1.1 (Beckman Coulter, США).

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1-го и 3-го квартилей ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$).

Достоверность различий между показателями независимых выборок (сравнение с показателями контрольной группы) оценивали по непараметрическому U-критерию Манна–Уитни (Mann–Whitney U test). Статистический анализ осуществляли в пакете программ Statistica 6.1 (StatSoft Inc., США, 2007).

Результаты

Исследование содержания нейтрофилов в крови при ИМ позволило установить, что у больных детей в возрасте 3–6 лет снижается процентное количество общей фракции нейтрофильных гранулоцитов на фоне повышения абсолютного уровня лейкоцитов (табл. 2). При исследовании количества нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих CD32 и CD64, установлено, что у детей в возрасте 3–6 лет с ИМ снижено относительное содержание CD64⁺CD32⁺ нейтрофилов, но повышено количество CD64⁺CD32⁻ и CD64⁺CD32⁻ клеток. У детей с ИМ данной возрастной группы обнаружены изменения в содержании нейтрофильных гранулоцитов в крови, экспрессирующих рецепторы CD64 и CD11b, относительно контрольных значений: повышение количества CD64⁺CD11b⁺ клеток, понижение уровня CD64⁺CD11b⁻ клеток. Проведение цитометрического анализа нейтрофилов, экспрессирующих пару рецепторов CD64 и CD15, позволило установить, что в первой возрастной группе больных ИМ снижается количество CD64⁺CD15⁺ нейтрофилов, но значительно увеличивается содержание клеток отрицательных по CD15: CD64⁺CD15⁻ и CD64⁺CD15⁻ клеток. При исследовании клеток с экспрессией рецепторов CD32 и CD11b обнаружено, что при ИМ у детей в возрасте 3–6 лет значительно повышается содержание CD32⁻

ТАБЛИЦА 2. ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ (В %) У ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ 1-3 ЛЕТ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. PHENOTYPIC COMPOSITION OF BLOOD NEUTROPHILS (IN %) IN CHILDREN AGED 1-3 YEARS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Контроль Control	Больные ИМ Patients with IM	р
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /L	8,11 (6,12-10,25)	14,60 (10,30-18,35)	0,003
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	53,2 (47,5-62,0)	36,0 (18,7-42,0)	< 0,001
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л Neutrophils, 10 ⁹ /L	4,29 (2,93-6,39)	4,12 (2,15-6,77)	
CD64 ⁺ CD3 ²⁺	95,56 (84,98-98,52)	45,63 (37,19-57,66)	< 0,001
CD64 ⁺ CD32 ⁺	1,59 (0,69-2,92)	0,87 (0,30-1,97)	
CD64 ⁺ CD32 ⁻	5,89 (3,10-9,14)	51,62 (44,13-60,83)	< 0,001
CD64 ⁺ CD32 ⁻	0,81 (0,02-2,12)	2,14 (1,76-3,09)	0,049
CD64 ⁺ CD11b ⁺	92,63 (84,97-97,45)	91,87 (85,04-98,12)	
CD64 ⁺ CD11b ⁺	3,01 (1,79-5,45)	7,12 (5,63-10,02)	0,010
CD64 ⁺ CD11b ⁻	1,24 (0,65-4,42)	0,99 (0,50-1,97)	
CD64 ⁺ CD11b ⁻	0,15 (0,006-0,200)	0,007 (0,003-0,010)	0,039
CD64 ⁺ CD15 ⁺	95,79 (87,18-96,23)	58,22 (43,81-69,04)	< 0,001
CD64 ⁺ CD15 ⁺	2,31 (1,38-3,33)	1,86 (1,05-3,11)	
CD64 ⁺ CD15 ⁻	2,25 (1,04-4,96)	37,63 (29,94-48,06)	< 0,001
CD64 ⁺ CD15 ⁻	0,08 (0,01-0,50)	2,14 (1,27-4,00)	< 0,001
CD32 ⁺ CD11b ⁺	1,98 (1,10-3,56)	49,52 (41,24-58,63)	< 0,001
CD32 ⁺ CD11b ⁺	92,80 (83,72-98,34)	18,76 (10,28-27,33)	< 0,001
CD32 ⁺ CD11b ⁻	1,41 (0,76-2,26)	28,69 (19,87-36,52)	< 0,001
CD32 ⁺ CD11b ⁻	2,49 (1,07-3,93)	2,26 (1,15-4,04)	
CD11b ⁺ CD15 ⁺	1,09 (0,28-3,42)	48,72 (40,84-58,14)	< 0,001
CD11b ⁺ CD15 ⁺	95,85 (92,64-97,91)	40,25 (34,67-49,19)	< 0,001
CD11b ⁺ CD15 ⁻	0,12 (0,10-0,99)	2,24 (0,84-3,71)	0,006
CD11b ⁺ CD15 ⁻	2,36 (0,45-3,39)	7,34 (3,77-12,08)	0,003

ТАБЛИЦА 3. ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ (В %) У ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ 7-11 ЛЕТ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. PHENOTYPIC COMPOSITION OF BLOOD NEUTROPHILS (IN %) IN CHILDREN AGED 7-11 YEARS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Контроль Control	Больные ИМ Patients with IM	Р
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /L	7,98 (5,42-9,83)	12,65 (10,15-17,00)	< 0,001
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	56,0 (48,3-67,6)	27,5 (21,5-41,0)	< 0,001
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л Neutrophils, 10 ⁹ /L	4,31 (2,91-6,36)	3,39 (2,60-5,33)	
CD64 ⁺ CD32 ⁺	90,65 (82,98-94,95)	38,82 (30,16-45,08)	< 0,001
CD64 ⁺ CD32 ⁻	1,34 (0,52-2,65)	1,21 (0,83-1,59)	
CD64 ⁻ CD32 ⁻	5,58 (1,89-8,62)	60,82 (52,18-66,13)	< 0,001
CD64 ⁺ CD32 ⁻	0,08 (0,004-0,820)	1,17 (0,10-2,24)	0,038
CD64 ⁻ CD11b ⁺	95,37 (91,57-96,81)	93,39 (91,56-95,21)	
CD64 ⁺ CD11b ⁺	1,72 (1,32-2,82)	4,15 (1,83-6,46)	0,027
CD64 ⁻ CD11b ⁻	1,85 (1,12-4,82)	2,44 (1,93-2,94)	
CD64 ⁺ CD11b ⁻	0,02 (0,008-0,094)	0,015 (0,010-0,020)	
CD64 ⁻ CD15 ⁺	95,56 (90,11-95,11)	64,22 (57,06-78,37)	< 0,001
CD64 ⁺ CD15 ⁺	1,80 (0,97-4,40)	0,78 (0,40-1,53)	0,040
CD64 ⁻ CD15 ⁻	4,03 (2,53-5,34)	32,65 (26,96-39,08)	< 0,001
CD64 ⁺ CD15 ⁻	0,14 (0,05-0,17)	0,89 (0,55-1,69)	< 0,001
CD32 ⁻ CD11b ⁺	1,91 (0,61-3,48)	94,39 (87,64-97,03)	< 0,001
CD32 ⁺ CD11b ⁺	94,22 (84,59-97,12)	3,05 (2,10-4,00)	< 0,001
CD32 ⁻ CD11b ⁻	0,54 (0,12-1,29)	2,48 (1,53-3,43)	0,007
CD32 ⁺ CD11b ⁻	1,18 (0,67-2,63)	0,075 (0,020-0,130)	0,002
CD11b ⁻ CD15 ⁺	1,42 (0,88-3,55)	54,88 (37,64-68,02)	< 0,001
CD11b ⁺ CD15 ⁺	94,74 (92,21-96,82)	43,46 (35,09-50,87)	< 0,001
CD11b ⁻ CD15 ⁻	0,45 (0,18-0,96)	0,50 (0,21-0,97)	
CD11b ⁺ CD15 ⁻	2,05 (1,50-3,80)	1,01 (0,54-1,62)	0,026

CD11b⁺ и CD32⁺CD11b⁻ нейтрофилов, а также понижается уровень CD32⁺CD11b⁺ клеток. Кроме того, у детей в возрасте 3-6 лет с ИМ относительно контрольных значений в крови возрастает содержание CD11b⁻CD15⁺, CD11b⁻CD15⁻ и CD11b⁺CD15⁻ нейтрофилов, но снижается количество CD11b⁺CD15⁺ нейтрофилов.

У детей в возрасте 7-11 лет с ИМ также (как и у больных в возрасте 3-6 лет) понижено процентное содержание нейтрофилов на фоне повышенного относительно контрольных значений абсолютного уровня лейкоцитов (табл. 3). При исследовании особенностей фенотипа нейтрофилов у детей в возрасте 7-11 лет установлено, что при ИМ значительно снижено процентное количество CD64⁺CD32⁺ нейтрофилов, но при повышении содержания CD64⁺CD32⁻ и CD64⁺CD32⁺ клеток. Кроме того, у больных детей данной возрастной группы в периферической крови повышено количество CD64⁺CD11b⁺ нейтрофилов относительно контрольных значений. Выявленные изменения относительно контрольных показателей обнаружены у детей с ИМ в содержании нейтрофилов, экспрессирующих и/или не экспрессирующих CD64 и CD15: снижение уровней CD64⁺CD15⁺ и CD64⁺CD15⁻ клеток, но при увеличении количества CD64⁺CD15⁻ и CD64⁺CD15⁺ клеток. Также выявленные изменения обнаружены у детей с ИМ старшей возрастной группы в перераспределении нейтрофилов с экспрессией CD32 и CD11b: увеличение относительно контрольных значений количества CD32⁺CD11b⁺- и CD32⁺CD11b⁻ клеток, понижение содержания CD32⁺CD11b⁺ и CD32⁺CD11b⁻ клеток. При исследовании клеток с экспрессией CD11b и CD15 обнаружено, что у детей в возрасте 7-11 лет с ИМ относительно контрольных показателей повышено количество CD11b⁻CD15⁺ нейтрофилов, но снижено содержание CD11b⁺CD15⁺ и CD11b⁺CD15⁻ клеток.

При исследовании особенностей фенотипа нейтрофилов в зависимости от возраста детей установлено, что у здоровых детей в возрасте 7-11 лет в периферической крови снижено количество CD64⁺CD32⁻ ($p = 0,008$), CD64⁺CD11b⁺ ($p = 0,047$), CD64⁺CD11b⁻ ($p = 0,003$) и CD32⁺CD11b⁻ нейтрофилов ($p = 0,038$) (см. табл. 2 и 3). У детей с ИМ в возрасте 7-11 лет по сравнению с показателями, выявленными у больных детей 1-3 лет, повышено количество CD64⁺CD11b⁻ нейтрофилов ($p = 0,048$), но понижено содержание CD64⁺CD15⁻ ($p = 0,042$), CD11b⁻CD15⁻ ($p = 0,016$) и CD11b⁺CD15⁻ клеток ($p < 0,001$). Кроме того, при ИМ у детей двух возрастных групп выявлено выраженное перераспределение нейтрофилов, экспрессирующих и/или не экспрессирующих CD32 и CD11b. У детей старшей возрастной

группы в крови увеличен уровень CD32⁺CD11b⁺-нейтрофилов ($p < 0,001$), но понижено содержание CD32⁺CD11b⁺ ($p < 0,001$), CD32⁺CD11b⁻ ($p < 0,001$) и CD32⁺CD11b⁻ клеток ($p < 0,001$).

Обсуждение

Нейтрофильные гранулоциты являются одними из наиболее высокорепродуктивных клеток врожденного иммунитета. При этом функциональная и регуляторная активность нейтрофилов характеризуется комплексом экспрессированных на них рецепторов, кооперация которых может модулировать реактивность клеток при иммунопатологических процессах [4, 6]. Мы провели исследование содержания нейтрофилов с парной комбинацией экспрессии маркеров, характеризующих функциональные, регуляторные и адгезионные свойства клеток, у детей с ИМ в возрасте 3-6 и 7-11 лет. Как уже было установлено ранее, реализация широкого спектра функциональной активности, включающая эффекторные и регуляторные, у нейтрофилов определяется экспрессией рецепторов CD64 и CD32 [6]. Рецептор CD64 (FcγRI) определяется как одноцепочечный гликопротеин типа I, относится к суперсемейству иммуноглобулинов, является высокоаффинным рецептором IgG [18]. Доказано, что данный маркер принимает участие в механизмах антителозависимой клеточной цитотоксичности и практически не экспрессируется на нейтрофилах, находящихся в состоянии относительного покоя [6]. Маркер CD32 (FcγRIIa) характеризуется как трансмембранный гликопротеин, является низкоаффинным рецептором IgG, запускает тирозинкиназный каскад, что приводит к активации NADPH-оксидазы, опосредует секреторную активность, цитотоксические процессы и иммуномодулирующие механизмы нейтрофилов [6, 11]. При обследовании детей с ИМ было установлено, что на фоне лейкоцитоза происходит перераспределение соотношения нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих и не экспрессирующих CD64 и CD32. Независимо от возрастной группы обследуемых преобладающими при ИМ являются дубль-отрицательные нейтрофилы (CD64⁻CD32⁻), в то время как у здоровых детей – CD64⁺CD32⁺ клетки. Фракция CD64⁺CD32⁻ нейтрофилов у здоровых детей является минорной. В связи с тем, что данные клетки не экспрессируют оба функциональных маркера, их можно определить, как клетки с минимальной функциональной активностью. В то же время, количество CD64⁺CD32⁺ нейтрофилов у детей с ИМ в возрасте 3-6 и 7-11 лет уменьшается относительно контрольных значений в 2,1 и 2,3 раза, соответственно. Как отмечено в исследовании Нестеровой И.В. с соавт. (2021), фракция нейтрофилов от-

рицательная по CD64 и положительная по CD32 является «бдительным стражем», которая при антигенном воздействии меняет репертуар своих рецепторов для активизации функционального потенциала [6]. При этом минорными фракциями нейтрофилов у детей с ИМ являются клетки с фенотипами CD64⁺CD32⁺ и CD64⁺CD32⁻. Следовательно, на фоне данной вирусной инфекции в крови у детей снижается количество нейтрофилов, положительных по маркерам CD64 и CD32, что свидетельствует о снижении функциональной активности клеток. При сравнении содержания нейтрофилов в крови у детей с парной комбинацией рецепторов CD64 и CD32 обнаружено снижение уровня CD64⁺CD32⁻ клеток у здоровых детей, тогда как онтогенетических особенностей при ИМ не выявлено.

Следующей комбинацией было исследовано количество нейтрофилов, экспрессирующих и/или не экспрессирующих рецепторы CD64 и CD11b. Маркер CD11b является трансмембранным гликопротеином типа I и определяется как субъединица α M интегрина, объединяется с антигеном CD18 (субъединица интегрин β 2) для создания интегрин Mac-1 (CD11b/CD18, α M β 2, CR3, iC3bR, Mo-1) [14]. Установлено, что в лейкоцитах крови Mac-1 экспрессируется в неактивной форме, но под влиянием хемокинов быстро активируется, обеспечивая адгезию к эндотелиальным клеткам [6, 12]. Кроме того, Mac-1 также является рецептором для 3-го компонента системы комплемента (iC3b) и способствует фагоцитозу опсонизированных бактерий [19]. Обнаружено, что преобладающей фракцией нейтрофилов по комбинации рецепторов CD64 и CD11b у детей явились CD64⁺CD11b⁺ клетки, причем это проявляется как у здоровых детей двух возрастных групп, так и больных ИМ. Также, независимо от возраста и вирусной инфекции, минорными фракциями являются CD64⁺CD11b⁺, CD64⁻CD11b⁻ и CD64⁺CD11b⁻ нейтрофилы. Исходя из функциональной значимости рецепторов CD64 и CD11b можно заключить, что наиболее функционально активными клетками являются дубль-положительные нейтрофилы (CD64⁺CD11b⁺), которые определяются как клетки с высоким уровнем функциональной активности (в связи с экспрессией CD64) и способные к быстрой миграции в ткань (CD11b⁺) [6]. При этом количество нейтрофилов с данным фенотипом повышается при ИМ независимо от возраста больных детей: в 2,3 раза у детей в 1-й возрастной группе и в 2,4 раза во второй возрастной группе. Кроме того, у детей с ИМ в возрасте 3–6 лет снижается уровень CD64⁺CD11b⁻ нейтрофилов. Следовательно, на вирусной инфекции отсутствует значимое перераспределение фракций нейтрофилов у детей с

экспрессией и/или отсутствием экспрессии маркеров CD64 и CD11b. Повышение количества функционально активных и способных проявлять высокий уровень миграционной активности нейтрофилов при ИМ определяется развитием защитной реакции организма на вирусную инфекцию. Также обнаружены онтогенетические особенности в распределении CD64⁺/CD11b⁺ нейтрофилов у детей. Так, у здоровых детей с возрастом снижается количество CD64⁺CD11b⁺ и CD64⁺CD11b⁻ клеток, тогда как при ИМ повышается уровень CD64⁻CD11b⁻ нейтрофилов. Следовательно, у больных детей наблюдается нарушение нормального онтогенетического перераспределения нейтрофилов с парной комбинацией антигенов CD64 и CD11b, что, безусловно, связано с особенностью иммунопатогенеза ИМ.

Антиген CD15 (3-фукозил-N-ацетиллактозамин, Lewis X) представляет собой углеводную молекулу адгезии, которая синтезируется фукозилтрансферазами FUT4 и FUT9, принимает активное участие в процессах миграции клеток [21]. Также в исследовании Nan J. и соавт. (2017) показано, что рецептор CD15 экспрессируется на миелоидных супрессорных клетках (MDSC, myeloid-derived suppressor cells) и является сигнальной молекулой, инициирующей провоспалительные функции [16]. Мажорной фракцией нейтрофилов в крови у детей являются клетки с фенотипом CD64⁺CD15⁺, независимо от возрастной группы и наличия инфекционного заболевания. Однако у больных детей количество CD64⁺CD15⁺ нейтрофилов значительно снижается (в 1,6 и 1,5 раза у детей в возрасте 3–6 и 7–11 лет соответственно), но увеличивается содержание CD64⁻CD15⁻ клеток (в 16,7 и 8,1 раза для младшей и старшей возрастных групп соответственно), тем самым определяя дубль-отрицательные клетки по CD64 и CD15 как вторые по количеству в крови при ИМ. Соответственно, независимо от возраста в крови у здоровых детей к минорным фракциям нейтрофилов относятся клетки с фенотипами CD64⁺CD15⁺, CD64⁻CD15⁻ и CD64⁺CD15⁻, при ИМ – CD64⁺CD15⁺ и CD64⁺CD15⁻. При этом у детей с ИМ в крови независимо от возраста повышается уровень CD64⁺CD15⁻ нейтрофилов, и только у больных в возрасте 7–11 лет относительно контрольных значений снижается количество CD64⁺CD15⁺ клеток. Следовательно, перераспределение количества нейтрофилов при ИМ реализуется в направлении минимальной функциональной активности, включая стимуляцию провоспалительных процессов. Причем у детей старшей возрастной группы снижение провоспалительной активности нейтрофилов более выражено, чем у детей младшего возрастного диапазона. Возрастные особенности в перерас-

пределении рецепторов CD64 и CD15 обнаружены только при ИМ – снижение количества CD64⁺CD15⁻ нейтрофилов.

При анализе распределения парной комбинации антигенов CD32 и CD11b обнаружено, что если у здоровых детей независимо от возраста основной фракцией нейтрофилов являются клетки с фенотипом CD32⁺CD11b⁺, то у детей с ИМ также независимо от возраста в крови преобладают клетки с фенотипом CD32⁻CD11b⁺. При этом количество CD32⁻CD11b⁺ нейтрофилов при ИМ повышается у детей в возрасте 3-6 лет в 25 раз и у детей в возрасте 7-11 лет в 49,4 раза. Содержание CD32⁺CD11b⁺ нейтрофилов у больных детей младшей возрастной группы снижается почти в 5 раз, а у больных старшей возрастной группы – в 30,9 раза. Минорными фракциями нейтрофилов по комбинации рецепторов CD32 и CD11b у здоровых детей, независимо от возраста, являются клетки с фенотипами CD32⁻CD11b⁻, CD32⁻CD11b⁺ и CD32⁺CD11b⁻. В то же время у детей с ИМ в возрасте 3-6 лет к минорной фракции можно отнести только клетки с фенотипом CD32⁺CD11b⁻, тогда как минорными фракциями у детей с ИМ в возрасте 7-11 лет являются CD32⁺CD11b⁺, CD32⁻CD11b⁻ и CD32⁺CD11b⁻ нейтрофилы. В связи с тем, что основное перераспределение нейтрофилов при ИМ произошло в направлении увеличения содержания клеток с фенотипом CD32⁻CD11b⁺, можно заключить, что при ИМ повышается уровень клеток способных к миграции, но с низкой функциональной активностью. При этом по данной комбинации антигенов выявляются значительные возрастные изменения, особенно при ИМ. Так, если у здоровых детей старшей возрастной группы по сравнению с показателями, выявленными у детей младшей возрастной группы, уменьшается только количество CD32⁻CD11b⁻ нейтрофилов, то у больных детей выявляется полное перераспределение содержания клеток по данным маркерам: повышение количества CD32⁻CD11b⁺ нейтрофилов и снижение уровней CD32⁺CD11b⁺, CD32⁻CD11b⁻ и CD32⁺CD11b⁻ нейтрофилов. Соответственно, подобное перераспределение количества нейтрофилов с указанными фенотипами преимущественно определяется иммунопатогенезом вирусной инфекции.

Также на фоне данной вирусной инфекции выявляется перераспределение количества нейтрофилов у детей по комбинации антигенов CD11b и CD15. По данным маркерам основной фракцией нейтрофилов у здоровых детей в обеих возрастных группах являются клетки с фенотипом CD11b⁺CD15⁺, минорными – клетки с фенотипами CD11b⁻CD15⁺, CD11b⁻CD15⁻ и CD11b⁺CD15⁻. По сравнению с контрольными

значениями содержание CD11b⁺CD15⁺ нейтрофилов уменьшается у детей с ИМ в возрасте 3-6 лет почти в 2,4 раза, а у больных в возрасте 7-11 лет – почти в 2,2 раза. При этом уровень CD11b⁻CD15⁺ нейтрофилов у больных младшего возраста увеличивается в 44,7 раза, тогда как у детей с ИМ старшей возрастной группы – в 38,6 раза. Соответственно, у детей с ИМ основными фракциями нейтрофилов являются клетки с фенотипами CD11b⁻CD15⁺ и CD11b⁺CD15⁺, а минорными – CD11b⁻CD15⁻ и CD11b⁺CD15⁻ клетки. Подобное перераспределение характеризует снижение миграционной активности нейтрофилов, осуществляющих провоспалительные функции. При этом у детей младшего возраста увеличивается содержание дубль-отрицательных по данным антигенам клеток, т. е. нейтрофилов с низким уровнем функциональной и миграционной активности. Подобного у детей старшей возрастной группы не обнаружено, но выявляется понижение количества CD11b⁺CD15⁻ нейтрофилов – клеток, способных к миграции, но со сниженной провоспалительной активностью. Зависимые от возраста изменения выявляются только при ИМ: у детей старшей возрастной группы снижается количество CD11b⁻CD15⁻ и CD11b⁺CD15⁻ нейтрофилов.

Заключение

Таким образом, у детей с ИМ на фоне лейкоцитоза значительно меняется фенотип нейтрофилов крови. Соответственно, изменение фенотипа, безусловно, определяет нарушения функциональной и миграционной активности клеток. Так, при исследовании фенотипа нейтрофилов по комбинации двух функциональных антигенов CD64 и CD32 обнаружено, что у детей с ИМ независимо от возраста основной фракцией нейтрофилов крови являются дубль-отрицательные клетки, тогда как у здоровых детей – CD64⁺CD32⁺ нейтрофилы. Основная фракция нейтрофилов в парной комбинации антигенов CD64 и CD11b у больных детей 3-6 и 7-11 лет определяется такая же, как и у здоровых (CD64⁺CD11b⁺), но при изменении содержания минорных фракций клеток. Количество CD64⁺CD15⁺ нейтрофилов (основная фракция клеток у здоровых детей) у больных обеих возрастных группах значительно снижается, но при этом наблюдается выраженное увеличение уровня дубль-отрицательных клеток по антигенам CD64 и CD15, что характеризуется снижением провоспалительных функций нейтрофилов в острую стадию данной вирусной инфекции. По экспрессии рецепторов CD32 и CD11b у детей с ИМ независимо от возраста в качестве основной фракции нейтрофилов выявляются клетки с

фенотипом CD32⁺CD11b⁺, тогда как у здоровых детей – CD32⁺CD11b⁺. При этом в обеих возрастных группах больных детей также повышается содержания дубль-отрицательных нейтрофилов по данным маркерам. В качестве основных фракций нейтрофилов по парной комбинации антигенов CD11b и CD15 при ИМ выявляются клетки с фенотипами CD11b⁺CD15⁺ и CD11b⁺CD15⁻, у здоровых детей – только CD11b⁺CD15⁺ нейтрофилы. Подобное перераспределение характеризует снижение миграционной способности нейтрофилов с высокой активностью провоспалительных функций. При сравнении распре-

деления нейтрофилов по парным комбинациям антигенов у детей разных возрастных групп обнаружены онтогенетические особенности (у здоровых детей), которые значительно изменяются у детей с ИМ, что, по-видимому, определяется иммунопатогенезом вирусной инфекции. Выявленные изменения в фенотипическом составе нейтрофилов при ИМ могут определяться как особенностью защитной реакции клеток врожденного иммунитета, так и патогенным действием самого вируса на нейтрофилы и должны быть учтены при разработке новой иммунотерапевтической стратегии лечения ИМ.

Список литературы / References

1. Демина О.И., Чеботарева Т.А., Мазанкова Л.Н., Тетова В.Б., Учаева О.Н. Инфекционный мононуклеоз у детей: клинико-лабораторная характеристика в зависимости от этиологии и фазы инфекционного процесса // *Инфекционные болезни*, 2020. Т. 18, № 3. С. 62-72. [Demina O.I., Chebotareva T.A., Mazankova L.N., Tetova V.B., Uchaeva O.N. Infectious mononucleosis in children: clinical and laboratory characteristics depending on the disease etiology and phase of infection. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2020, Vol. 18, no. 3, pp. 62-72. (In Russ.)]
2. Дроздова Н.Ф., Фазылов В.Х. Инфекционный мононуклеоз, обусловленный вирусом Эпштейна–Барр: клинико-патогенетические аспекты (обзор литературы) // *Вестник современной клинической медицины*, 2018. Т. 11, № 3. С. 59-65. [Drozdova N.F., Fazyilov V.H. Infectious mononucleosis caused by the Epstein–Barr virus: clinical and pathogenetic aspects (literature review). *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny = Bulletin of Modern Clinical Medicine*, 2018, Vol. 11, no. 3, pp. 59-65. (In Russ.)]
3. Иккес Л.А., Мартынова Г.П., Савченко А.А. Дисфункция нейтрофилов периферической крови у больных при вирусной Эпштейна–Барр инфекции // *Вопросы практической педиатрии*, 2019. Т. 14, № 5. С. 21-25. [Ikkes L.A., Martynova G.P., Savchenko A.A. Dysfunction of peripheral blood neutrophils in patients with Epstein-Barr virus infection. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Clinical Practice in Pediatrics*, 2019, Vol. 14, no. 5, pp. 21-25. (In Russ.)]
4. Козлов В.А., Тихонова Е.П., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Андропова Н.В., Анисимова Е.Н., Головкин А.С., Демина Д.В., Здзитовецкий Д.Э., Калинина Ю.С., Каспаров Э.В., Козлов И.Г., Корсунский И.А., Кудлай Д.А., Кузьмина Т.Ю., Миноранская Н.С., Продеус А.П., Старикова Э.А., Черданцев Д.В., Чесноков А.Б., Шестерня П.А., Борисов А.Г. Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов. Красноярск: Поликор, 2021. 563 с. [Kozlov V.A., Tikhonova E.P., Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Andronova N.V., Anisimova E.N., Golovkin A.S., Demina D.V., Zdzitovetsky D. E., Kalinina Yu.S., Kasparov E.V., Kozlov I.G., Korsunsky I.A., Kudlai D.A., Kuzmina T.Yu., Minoranskaya N.S., Prodeus A.P., Starikova E.A., Cherdantsev D.V., Chesnokov A.B., Shesternya P.A., Borisov A.G. Clinical immunology. A practical guide for infectious disease specialists]. Krasnoyarsk: Policor, 2021. 563 p.
5. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа // *Медицинская иммунология*, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.
6. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Русинова Т.В., Павленко В.Н., Юцкевич Я.А., Барова Н.К., Тараканов В.А. Ремоделинг фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11B⁺NG CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11B⁺NG в созданной de novo экспериментальной модели вирусно-бактериальной инфекции в системе *in vitro* // *Инфекция и иммунитет*, 2021. Т. 11, № 1. С. 101-110. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Rusinova T.V., Pavlenko V.N., Yutskevich Ya.A., Barova N.K., Tarakanov V.A. Phenotype remodeling in neutrophilic granulocyte subsets CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11B⁺NG, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11B⁺ NG in *de novo* experimental model of viral-bacterial infection *in vitro*. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, Vol. 11, no. 1, pp. 101-110. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-ROT-1517.
7. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В. Взаимосвязь фенотипа и метаболизма нейтрофилов крови у больных раком почки // *Медицинская иммунология*, 2020. Т. 22, № 5. С. 887-896. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V. Immunophenotype and metabolism are linked in peripheral blood neutrophils from patients with kidney cancer. *Meditsinskaya*

immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 887-896. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-IAM-2037.

8. Bakarozzi M., Mavropoulos A., Bogdanos D.P., Dalekos G.N., Rigopoulou E.I. p38 Mitogen-activated protein kinase impairment of innate immune cells is a characteristic feature of HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J. Viral Hepat.*, 2020, Vol. 27, no. 1, pp. 52-60.

9. Damania B., Kenney S.C., Raab-Traub N. Epstein-Barr virus: Biology and clinical disease. *Cell*, 2022, Vol. 185, no. 20, pp. 3652-3670.

10. Gardiman E., Bianchetto-Aguilera F., Gasperini S., Tiberio L., Scandola M., Lotti V., Gibellini D., Salvi V., Bosisio D., Cassatella M.A., Tamassia N. SARS-CoV-2-Associated ssRNAs Activate Human Neutrophils in a TLR8-Dependent Fashion. *Cells*, 2022, Vol. 11, no. 23, 3785. doi: 10.3390/cells11233785.

11. Gasparoto T.H., Dalboni T.M., Amôr N.G., Abe A.E., Perri G., Lara V.S., Vieira N.A., Gasparoto C.T., Campanelli A.P. Fcγ receptors on aging neutrophils. *J. Appl. Oral. Sci.*, 2021, Vol. 29, e20200770. doi: 10.1590/1678-7757-2020-0770.

12. Goretti Riça I., Joughin B.A., Teke M.E., Emmons T.R., Griffith A.M., Cahill L.A., Banner-Goodspeed V.M., Robson S.C., Hernandez J.M., Segal B.H., Otterbein L.E., Hauser C.J., Lederer J.A., Yaffe M.B. Neutrophil heterogeneity and emergence of a distinct population of CD11b/CD18-activated low-density neutrophils after trauma. *J. Trauma Acute Care Surg.*, 2023, Vol. 94, no. 2, pp. 187-196.

13. Hayashida E., Ling Z.L., Ashhurst T.M., Viengkhou B., Jung S.R., Songkhunawej P., West P.K., King N.J.C., Hofer M.J. Zika virus encephalitis in immunocompetent mice is dominated by innate immune cells and does not require T or B cells. *J. Neuroinflammation*, 2019, Vol. 16, no. 1, 177. doi: 10.1186/s12974-019-1566-5.

14. Kabanov D.S., Grachev S.V., Prokhorenko I.R. Monoclonal antibody to CD14, TLR4, or CD11b: Impact of epitope and isotype specificity on ROS generation by human granulocytes and monocytes. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2020, Vol. 2020, 5708692. doi: 10.1155/2020/5708692.

15. Kapoor D., Shukla D. Neutrophil extracellular traps and their possible implications in ocular herpes infection. *Pathogens*, 2023, Vol. 12, no. 2, 209. doi: 10.3390/pathogens12020209.

16. Nan J., Xing Y.F., Hu B., Tang J.X., Dong H.M., He Y.M., Ruan D.Y., Ye Q.J., Cai J.R., Ma X.K., Chen J., Cai X.R., Lin Z.X., Wu X.Y., Li X. Endoplasmic reticulum stress induced LOX-1⁺ CD15⁺ polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma. *Immunology*, 2018, Vol. 154, no. 1, pp. 144-155.

17. Naughton P., Healy M., Enright F., Lucey B. Infectious Mononucleosis: diagnosis and clinical interpretation. *Br. J. Biomed. Sci.*, 2021, Vol. 78, no. 3, pp. 107-116.

18. Patnaik R., Azim A., Agarwal V. Neutrophil CD64 a diagnostic and prognostic marker of sepsis in adult critically ill patients: a brief review. *Indian J. Crit. Care Med.*, 2020, Vol. 24, no. 12, pp. 1242-1250.

19. Sim H., Jeong D., Kim H.I., Pak S., Thapa B., Kwon H.J., Lee K. CD11b deficiency exacerbates methicillin-resistant staphylococcus aureus-induced sepsis by upregulating inflammatory responses of macrophages. *Immune Netw.*, 2021, Vol. 21, no. 2, e13. doi: 10.4110/in.2021.21.e13.

20. Sutherland D.R., Ortiz F., Quest G., Illingworth A., Benko M., Nayyar R., Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2018, Vol. 94, no. 4, pp. 637-651.

21. Szlasa W., Wilk K., Knecht-Gurwin K., Gurwin A., Froń A., Sauer N., Krajewski W., Saczko J., Szydełko T., Kulbacka J., Małkiewicz B. Prognostic and therapeutic role of CD15 and CD15s in cancer. *Cancers (Basel)*, 2022, Vol. 14, no. 9, 2203. doi: 10.3390/cancers14092203.

Авторы:

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Мартынова Г.П. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой детских инфекционных болезней ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Иккес Л.А. — ассистент кафедры детских инфекционных процессов с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Authors:

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Cellular Molecular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Martynova G.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Childhood Infectious Diseases, V. Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Ikkes L.A., Assistant Professor, Department of Childhood Infectious Diseases with a PE-course, V. Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Беленюк В.Д. — младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Belenyuk V.D., Junior Research Associate, Laboratory of Cellular Molecular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Molecular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 17.10.2023
Принята к печати 03.12.2023

Received 17.10.2023
Accepted 03.12.2023

ПОЛУЧЕНИЕ ДОНОРСКОГО ГАММА-ГЛОБУЛИНА ОТ МНОГОРОЖАВШИХ ЖЕНЩИН И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ЭКСПРЕССИЮ МОЛЕКУЛ HLA-G И HLA-DR ЛИМФОЦИТОВ ЖЕНЩИН, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С СЕПТАЛЬНЫМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА

Шабалдин А.В.¹, Синицкая А.В.¹, Шмулевич С.А.¹, Гришачева Е.О.¹,
Шабалдина Е.В.², Деева Н.С.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
г. Кемерово, Россия

² ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Кемерово, Россия

Резюме. Общее звено патогенеза репродуктивных потерь и врожденных пороков сердца (ВПС) связано с иммунным воспалением в системе «мать-эмбрион», которое влияет на дифференцировку и пролиферацию прогениторных клеток сердечно-сосудистой системы. Выдвигается гипотеза, что это звено может быть заблокировано регуляторными аутоиммунными и аллоиммунными антителами к молекулам HLA-G и HLA-DR. Кроме того, эти антитела могут быть в достаточном количестве в донорских иммуноглобулинах, особенно полученных из крови многоплодных женщин. Исходя из этого, была поставлена цель исследования – получение очищенной фракции гамма-глобулина из крови многоплодных женщин и оценка ее функциональной активности в отношении молекул HLA-DR и HLA-G.

Выделение фракции гамма-глобулина (ФГГ) из плазмы крови многоплодных женщин выполняли с помощью аффинной хроматографии в несколько сеансов. Чистоту полученного белка анализировали с помощью электрофоретического разделения белковой фракции сыворотки крови и электрофореза в 4,12% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия (SDS) (ПААГ-электрофорез). ПААГ-электрофорез показал, что выделенная ФГГ не отличалась от коммерческого лечебного иммуноглобулина для внутривенного введения (ИГЧ).

Для оценки функциональной активности ФГГ в отношении молекул HLA-DR и HLA-G сформированы: основная группа женщин и их детей с ВПС (n = 38) и контрольная группа женщин с их ус-

Адрес для переписки:

Синицкая Анна Викторовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых
заболеваний»
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый б-р, б.
Тел.: 8 (950) 586-33-97.
E-mail: cepoav1991@gmail.com

Address for correspondence:

Sinitskaya Anna V.
Research Institute for Complex Issues
of Cardiovascular Diseases
6 Sosnoviy Blvd
Kemerovo
650002 Russian Federation
Phone: +7 (950) 586-33-97.
E-mail: cepoav1991@gmail.com

Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, А.В. Синицкая, С.А. Шмулевич,
Е.О. Гришачева, Е.В. Шабалдина, Н.С. Деева
«Получение донорского гамма-глобулина от
многоплодных женщин и его влияние на экспрессию
молекул HLA-G и HLA-DR лимфоцитов женщин,
имеющих детей с септальными врожденными пороками
сердца» // Российский иммунологический журнал, 2024.
Т. 27, № 1. С. 71-84.
doi: 10.46235/1028-7221-14186-IOD

© Шабалдин А.В. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Shabaldin, A.V. Sinitskaya, S.A. Shmulevich,
E.O. Grishacheva, E.V. Shabaldina, N.S. Deeva “Isolation of
donor gamma globulin obtained from multiparous women and
its effects upon expression of HLA-G and HLA-DR molecules
on lymphocytes from mothers of children with septal congenital
heart defects”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 1, pp. 71-84.
doi: 10.46235/1028-7221-14186-IOD

© Shabaldin A.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-14186-IOD

ловно-здоровыми детьми ($n = 21$). Для определения специфичности ФГГ по отношению к молекулам HLA-G, HLA-DR, а также для сравнения его эффекта с аутогенными и аллогенными сыворотками и ИГЧ разработан протокол иммунологического тестирования с помощью проточной цитофлуориметрии. Получено, что блокирующая активность женской сыворотки по отношению к аутогенным (собственным) и аллогенным (эмбриона/плода/ребенка) молекулам HLA-G и HLA-DR определяет протективный эффект в отношении формирования врожденных пороков сердца в последующем поколении. Фракция гамма-глобулина, полученная из донорской крови многорожавших женщин, обладает более выраженным блокирующим эффектом по отношению к экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR.

Полученный иммунобиологический препарат может быть прототипом лечебного и профилактического средства, блокирующего патогенез врожденных пороков сердца.

Ключевые слова: фракции гамма-глобулина, врожденные пороки сердца, HLA-G, HLA-DR, антитела

ISOLATION OF DONOR GAMMA GLOBULIN OBTAINED FROM MULTIPAROUS WOMEN AND ITS EFFECTS UPON EXPRESSION OF HLA-G AND HLA-DR MOLECULES ON LYMPHOCYTES FROM MOTHERS OF CHILDREN WITH SEPTAL CONGENITAL HEART DEFECTS

Shabaldin A.V.^a, Sinitskaya A.V.^a, Shmulevich S.A.^a, Grishacheva E.O.^a, Shabaldina E.V.^b, Deeva N.S.^a

^a *Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation*

^b *Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation*

Abstract. A common pathogenetic mechanism of reproductive losses and congenital heart disease (CHD) is associated with immune inflammation in the “mother-embryo” system which affects differentiation and proliferation of cardiovascular progenitor cells. It is hypothesized that this link may be blocked by regulatory auto- and alloimmune antibodies to HLA-G and HLA-DR molecules. Moreover, these antibodies may be present at sufficient amounts in donor immunoglobulins, especially those obtained from the blood of multiparous women. Based on this suggestion, the aim of our study was to obtain enriched gamma globulin fraction from the blood of multiparous women and evaluate its functional effects towards HLA-DR and HLA-G molecules.

Isolation of the gammaglobulin fraction (GGF) from the blood plasma of multiparous women was performed using affinity chromatography in several sessions. Purity grade of the resulting protein was analyzed by immunoelectrophoresis, electrophoretic separation of the protein fraction of blood serum and electrophoresis in 4.12% polyacrylamide gel with the addition of SDS (PAGE electrophoresis). PAAG electrophoresis showed that this GGF did not differ from commercial therapeutic intravenous immunoglobulin (IVIG).

Assessment of the functional activity of GGF upon HLA-DR and HLA-G molecules was performed in the main group of women and their children with congenital heart disease ($n = 38$), and control group of women who gave birth to conditionally healthy children ($n = 21$). To determine the specificity of GGF with respect to HLA-G, HLA-DR molecules, as well as to compare its effect with autologous and allogeneic sera and IVIG, we developed an immunological testing protocol using flow cytometry. The protocol was arranged on the basis of the methodology of “cross-match” approach and Russian patent “Method for determining antibodies to HLA-G”. It was found that the blocking activity of female serum towards autologous (intrinsic) and allogeneic (embryo/fetus/child) HLA-G and HLA-DR molecules may determine the protective effect on development of congenital heart defects in the next generation. Donor human immunoglobulin showed a similar blocking effects to these molecules, possibly due to the presence of alloimmune antibodies to HLA classes I and II. The gammaglobulin fraction obtained from the donor blood of multiparous women has a more pronounced blocking effect on the HLA-G and HLA-DR expression. Hence, this immunobiological preparation can be considered a prototype of therapeutic and prophylactic agent blocking the genesis of congenital heart defects.

Keywords: gamma globulin fractions, congenital heart defects, HLA-DR, HLA-G, antibodies

Введение

Иммунные механизмы, лежащие в основе репродуктивных потерь и врожденных пороков, аномалий развития плода, продолжают активно изучаться [16]. Взаимосвязь между этими двумя патологическими состояниями не всегда очевидна, но она имеет место. Так, эмбриональный период с 3-й по 8-ю неделю гестации является наиболее критичным. Именно в этот временной отрезок наиболее часто происходит прерывание беременности, и в этот же период формируются врожденные пороки развития плода, в том числе и сердечно-сосудистой системы. С позиции репродуктивной морфологии и физиологии происходит иммунная адаптация материнского микроокружения к аллогенным антигенам эмбриона, механизмы которой также продолжают активно изучаться [3]. В то же время в самом эмбрионе идет органогенез, регулируемый огромным количеством внутриклеточных и межклеточных мессенджеров. Эти регуляторные сети обеспечивают, с одной стороны, эффективный органогенез, а с другой – они подвержены влиянию внешнего микроокружения, в том числе иммунным взаимодействиям в системе «мать-эмбрион/плод». Последние определяют провоспалительный потенциал, распространяющийся на эмбриобласт. Неоднократно формулировалась гипотеза о триггерах, запускающих патологические регуляторные сети при эмбриогенезе сердечно-сосудистой системы, и являющихся продуктами иммунных взаимодействий в системе «мать – эмбрион/плод» [8].

Именно на это общее звено патогенеза репродуктивных потерь и врожденных пороков и аномалий развития плода, в том числе врожденных пороков сердца (ВПС), может быть направлена прегравидарная иммунная терапия.

Одним из иммунных препаратов является иммуноглобулин для внутривенного введения, который применяется при лечении аллогенной формы репродуктивных потерь [12]. Данный препарат может содержать антитела, блокирующие материнские молекулы презентации аллоантигенов (HLA-DR) или модулирующие экспрессию эмбриональных HLA, в том числе и HLA-G. Именно через эти механизмы может быть ограничено воспаление в системе «мать-эмбрион» и, ассоциированный с ним, тератогенез в сердечно-сосудистой системе. Иммуноглобулины для внутривенного введения применяются в лечебных целях как до беременности, так и вовремя нее [4].

Исходя из высказанной концепции, что ВПС это воспалительные эмбриопатии, формирующиеся при нарушении иммунных взаимодей-

ствиях в системе «мать-эмбрион/плод», вполне обосновано применение иммуноглобулина для профилактики риска формирования спорадических (без семейной истории и без хромосомной патологии) ВПС на прегравидарном этапе, а также лечения во время беременности. Лечебный эффект будет заключаться в блокировании материнских HLA и свободных для распознавания HLA молекул эмбриобласта. Тот факт, что наибольшее количество антител к антигенам HLA различных классов выявляется у женщин репродуктивного периода и имеющих несколько детей, доказывает их физиологическую роль [2]. Соответственно, можно предположить, что иммуноглобулин, полученный из крови многорожавших женщин, будет иметь больший протективный эффект в отношении блокирования иммунного воспаления в системе «мать-эмбрион/плод», и лежащего в основе патогенеза как репродуктивных потерь, так и ВПС.

Исходя из этого, была поставлена **цель исследования** – получение очищенной фракции гамма-глобулина из крови многорожавших женщин и оценка ее функциональной активности в отношении молекул HLA-DR и HLA-G.

Материалы и методы

Для получения очищенной фракции гамма-глобулина (ФГГ) из крови многорожавших женщин, выполнен забор периферической крови в объеме 10 мл у 60 женщин, имеющих в анамнезе более четырех родов (все дети были условно здоровыми). Периферическая донорская кровь набиралась в течение 2020-2021 года. Сбор крови проводился в родильном доме Областной детской клинической больницы имени Ю.А. Атаманова г. Кемерово в пробирки, содержащие натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).

Выделение ФГГ из плазмы крови многорожавших женщин выполняли с помощью аффинной хроматографии в несколько сеансов (по 85 мл плазмы на один сеанс).

Чистоту полученного белка анализировали с помощью электрофоретического разделения белковой фракции сыворотки крови и электрофореза в 4-12% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия (SDS).

Для оценки функциональной активности ФГГ в отношении молекул HLA-DR и HLA-G сформировано несколько групп: основная группа включала 38 женщин и их детей со спорадически септальными ВПС (дефект межжелудочковой перегородки – ДМЖП и дефект межпредсердной перегородки – ДМПП). Группа сформирована на базе отделения кардиохирургии № 2 Научно-ис-

следователъского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ). Группа сравнения представлена 21 женщиной и их условно здоровыми детьми без ВПС, которая собрана на поликлинических базах ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет». У всех матерей получено информированное согласие на их участие, а также их детей в иммунологическом исследовании. Группы были сопоставимы по полу и возрасту.

На выделенных лимфоцитах (далее обозначались как донорские) оценивалась функциональная активность очищенной и сконцентрированной ФГГ. Выбор групп исследования был обусловлен тем, что функциональная оценка ФГГ проводилась как по отношению к эффекту аутосыоротки женщин, имеющих детей с ВПС, так и к таковому у женщин, родивших исключительно условно здоровых детей.

Статистическую обработку полученного материала проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения выборок оценивали с помощью W-теста Шапиро-Уилка. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений, процентных долей (%). Количественные данные представляли в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Сравнение значений уровней метри-

ческих показателей в несвязанных выборках проводили с помощью непараметрического Манна-Уитни, а в связанных – Вилкоксона. Вероятность ошибки первого рода была принята за 5%, соответственно уровень статистической значимости выявлялся при $p < 0,05$, что соответствует стандартным требованиям.

Результаты

Получение фракции гамма-глобулина из плазмы многорожавших женщин

Выделение ФГГ (с высокой концентрацией иммуноглобулина G, IgG) осуществлялось при помощи системы DEAE Affi-Gel Blue (Bio-Rad, США). Получение и десорбцию ФГГ осуществляли с применением подвижной фазы буферов (20 мм K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , pH 8,0, 0,02%). Значение pH регулировали с помощью добавления 0,1 М КОН. Работу осуществляли на хроматографе низкого давления BioLogic (Bio-Rad, США). Подготовка сорбента включала рекомендованные производителем этапы, в том числе предварительную отмывку сорбента от остаточного красителя на стеклянном фильтре с последующим перенесением сорбента в фосфатный буфер и упаковку сорбента.

Фракция (рис. 1) собиралась с помощью коллектора фракций BioFrac. Регенерацию сорбен-

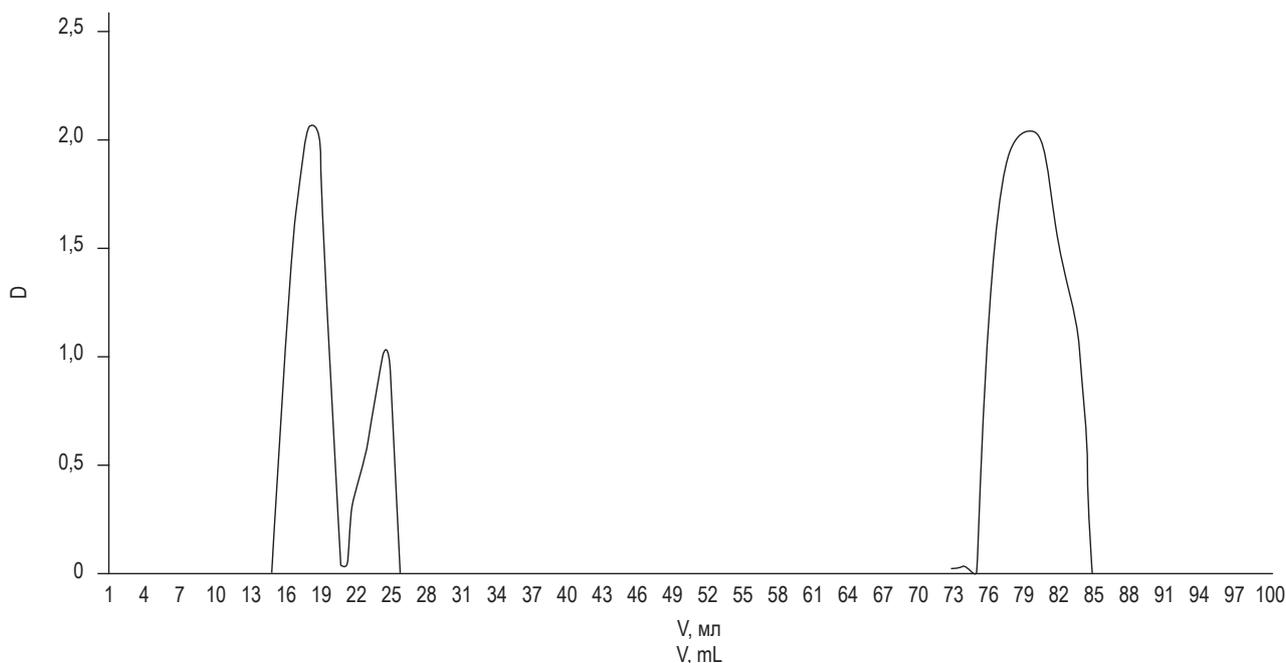


Рисунок 1. Хроматограмма выделения ФГГ с объемом элюции 16-20 мл и десорбированного сывороточного белка с объемом элюции 75-85 мл

Figure 1. Chromatogram of the isolation of FGG with an elution volume of 16-20 mL and desorbed whey protein with an elution volume of 75-85 mL

та после анализа осуществляли 0,5 М раствором NaCl.

За все сеансы суммарно получено 80 мл ФГГ с концентрацией белка 5,1 г/л и остаточным альбумином менее 0,2 г/л. Анализ общего белка и альбумина проводился на анализаторе Architect C8000 (Abbott, США). Концентрация белка в ФГГ соответствовала нижней границе концентрации иммуноглобулина G в сыворотке крови человека. Данная фракция была обозначена как ФГГ1.

Далее был выполнен электрофорез белков хроматографического смыва в 1,5% агарозном геле на 0,05 М веронал-мединаловом буфере (pH = 8,6) в три этапа. Первый этап связан с проведением электрофореза белков хроматографического смыва в агарозном геле. На втором этапе в агарозный гель была добавлена моноспецифическая сыворотка против иммуноглобулина G человека («Моно-РИД-G», АО НПО «Микроген», Россия), антитела которой при диффузии в геле преципитировали со специфическими молекулами. Третий этап был связан с высушиванием и окрашиванием пластины с гелем для верификации линий преципитации.

Иммуноэлектрофорез показал, что в хроматографическом смыве имеется фракция иммуноглобулина G человека (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки).

Кроме того, выполнен электрофорез белков сыворотки крови на коммерческих наборах для электрофоретического разделения белковой фракции сыворотки крови на мембранах ацетилцеллюлоза («КлиниТест-ЭФ», Россия). Снятие результатов электрофореза проводилось на отечественном аппарате для электрофореза белков сыворотки крови УЭФ-01-«Астра» (Россия), данные представлены на рисунке 3 (см. 2-ю стр. обложки). Как видно из рисунка (дорожка № 6, ФГГ1), в полученном образце выявлялась преимущественно фракция гамма-глобулинов в невысокой концентрации. Эти данные наглядно показывают, что была выделена именно фракция гамма-глобулинов. Необходимо отметить, что концентрация гамма-глобулинов в лечебных препаратах иммуноглобулинов для внутривенного введения равна 50 г/л. Для оценки эффектов коммерческих иммуноглобулинов для внутривенного введения и полученной ФГГ1, необходимо последнюю сконцентрировать как минимум в 5 раз.

Для концентрации ФГГ1 была использована установка FreeZone 2.5 Plus (Labconco, США). Замороженные образцы в объеме по 40 мл лиофилизировали с использованием установки FreeZone 2.5 Plus (Labconco, США) в течение суток при вакууме 0,04 мБар и температуре от

-50 °С. Выполнено 2 сеанса лиофилизации. Каждый из полученных лиофилизатов разводили в 4 мл 0,5М раствором NaCl. Объединенный общий объем составил 8 мл. Тем самым проведено концентрирование по объему в 10 раз. Повторное исследование общего белка и альбумина на анализаторе Architect C8000 (Abbott, США) показало концентрацию белка 30,6 г/л, а остаточный альбумин – 0,2 г/л. Данная фракция обозначалась ФГГ2, и она была сконцентрирована по отношению к ФГГ1 в 6 раз. Кроме того, ФГГ2 может быть прототипом иммуноглобулина человека для внутривенного введения, полученного от многорожавших женщин.

Для верификации белков, входящих в ФГГ2, и сравнения ее со стандартным иммуноглобулином человека для внутривенного введения был проведен электрофорез в 4-12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Для SDS-PAGE использовали фракции ФГГ1, ФГГ2 и иммуноглобулины человека для внутривенного введения (ИГЧ1 – иммуновенин 5%, АО НПО «Микроген», Россия; ИГЧ2 – иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения 5%, АО НПО «Микроген», Россия). Белки разделяли путем электрофореза в 4-12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) при напряжении 150 В в течение 2 часов с использованием буфера для разделения белков NuPAGE MES SDS (NP0002, Thermo Fisher Scientific), антиоксиданта NuPAGE (NP0005, Thermo Fisher Scientific) и камеры для вертикального электрофореза XCell SureLock Mini-Cell (EI0001, Thermo Fisher Scientific). В качестве маркера молекулярных масс использовали смесь белковых стандартов Novex Sharp Pre-Stained (LC5800, Thermo Fisher Scientific). Гель окрашивали красителем Кумасси (Coomassie Brilliant Blue G-250) (рис. 4, см. 2-ю стр. обложки).

Как видно из рисунка 4, основные бенды ФГГ1, ФГГ2, ИГЧ1 и ИГЧ2 полностью совпадали между собой. Концентрация белков от ФГГ1 к ФГГ2 значительно увеличилась, но даже в последней была ниже, чем в стандартных лечебных иммуноглобулинах для внутривенного введения (ИГЧ1 и ИГЧ2). Так, в ФГГ2 концентрация общего белка составляла 29 г/л, а в ИГЧ1 и ИГЧ2 – 50 г/л, что в 1,7 раза больше. Молекулярная масса основных белков в ФГГ2, ИГЧ1 и ИГЧ2 была в пределах 110-150 г/л, что соответствует молекулярной массе гамма-глобулинов.

На данном этапе работы из крови многорожавших женщин была получена очищенная и сконцентрирована фракция гамма-глобулина (ФГГ1/ФГГ2), что документировано в иммуно-

электрофорезе, в электрофорезе белков сыворотки крови и в ДНС-ПААГ электрофорезе, и именно эта фракция оценивалась в последующих иммунологических исследованиях.

Влияние ФГГ на экспрессию молекул HLA-G и HLA-DR лимфоцитов матерей и детей с септалными врожденными пороками сердца и контрольных групп

Протокол проточной цитофлуориметрии

Для определения специфичности сконцентрированной ФГГ2 по отношению к молекулам HLA-G, HLA-DR, а также для сравнения его эффекта с аутогенными и аллогенными сыворотками и стандартным лечебным 5%-ным иммуноглобулином для внутривенного введения (ИГЧ1) был разработан протокол иммунологического тестирования с помощью проточной цитофлуориметрии. Протокол был разработан на основе методического подхода – cross-match, а также использован метод определения антител к HLA-G, для которого был получен патент Российской Федерации [5].

Для тестирования ФГГ2 были выделены у всех обследованных лимфоциты из 4 мл периферической крови на градиенте плотности фиколл-верографина 1,077 г/см³ («Фиколл-1077», ООО «Диаэм», Москва) по стандартной методике. Полученные взвеси лимфоцитов женщин и детей двукратно отмывались раствором Хэнкса (ООО «Диаэм», Москва). Для этого по 1000 мкл раствора Хэнкса добавлялось в пробирки с лимфоцитами женщин и детей, и центрифугировались 10 минут при 1500 g. После центрифугирования надосадочная жидкость убиралась. Далее во все монокультуры с минимальным количеством раствора Хэнкса (среднее содержание лимфоцитов было 3 млн клеток в 25 мкл раствора Хэнкса) для первичного окрашивания лимфоцитов добавлялись 5 мкл раствора моноклональных антител к молекуле CD45, конъюгированными с флуоресцентным красителем перидинин-хлорофиллом 7 (PC-7, BioLegend, США). Инкубация проводилась в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте, после которой выполнялась однократная отмывка лимфоцитов раствором Хэнкса от несвязанных антител. После отмывки в пробирки с детскими и женские монокультурами добавлялось 800 мкл полной среды (RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), с 2 ммольями L-глутамином (Panreac, Испания), с 10 ммольями Нерес-буфера (Sigma-Aldrich, США), с 5×10^{-5} ммольями 2-меркаптоэтанола (Biochem, Франция) и с 50 мкг/мл раствором гентамицина-сульфата (ООО «Ветинтерфарм», Россия).

Далее выполнялся подход cross-match согласно патенту Российской Федерации «Способ определения антител к HLA-G» [5].

Для каждой детской и женской монокультуры готовилось по восемь пробирок для проточного цитофлуориметра Beckman Coulter (США), в четырех из которых оценивалась экспрессия HLA-G, а в следующих четырех – экспрессия HLA-DR. В каждую пробирку вносилось по 100 мкл клеточной взвеси (350 тысяч клеток в полной среде). Далее, в первую и пятую пробирки добавлялись по 100 мкл полной среды (контрольные пробы), во вторую и шестую пробирки вносились по 100 мкл аутогенной сыворотки крови для женских монокультур и аллогенных материнских сывороток для детских монокультур, в третью и восьмую пробирки добавлялись 50 мкл ФГГ2 и 50 мкл полной среды, тем самым концентрация гамма-глобулина уравнивалась с сывороткой периферической крови. Соответственно, для уравнивания концентраций гамма-глобулинов с периферической кровью в четвертую и девятую пробирки вносились по 30 мкл ИГЧ1 и по 70 мкл полной среды. Все пробирки инкубировались в термостате при 37 градусов Цельсия в течение 30 минут.

После окончания инкубации проводилась однократная отмывка лимфоцитов каждой пробирки раствором Хэнкса, по вышеописанной методике. После однократной отмывки выполнялось окрашивание лимфоцитов в каждой монокультуре как в полной среде, так и в среде с добавлением аллогенных, аутогенных сывороток, с ФГГ2 и ИГЧ1 с помощью конъюгированных моноклональных антител (МКАТ). В пробирки, где оценивалась экспрессия HLA-G, добавлялись 3 мкл с МКАТ к молекуле CD3 конъюгированные с флуорисцеин изотиоцианат (FITC) и 3 мкл с МКАТ к молекуле HLA-G конъюгированные с алофикоцианин (APC) (BioLegend, США). Соответственно, в пробирки, где оценивалась экспрессия HLA-DR, добавлялись МКАТ в тех же соотношения, но вместо МКАТ к HLA-G добавлялся МКАТ к HLA-DR, также конъюгированный с APC (BioLegend, США). Объем антител к количеству лимфоцитов, время и температура инкубаций соответствовали прилагаемым инструкциям к каждому конъюгированному моноклональному антителу. Инкубирование проводилось в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте.

С учетом перекрестного реагирования с молекулами HLA-G и HLA-DR антител, содержащих в аллогенных, аутогенных сыворотках, а также в ФГГ2 и ИГЧ1 оценили концентрацию гамма-глобулинов в растворах моноклональных антител и в добавляемых иммунобиологических матери-

алах. Так, из раствора специфических МКАТ добавлялось на 300 тысяч клеток 1,5 мкг антител; а из сыворотки крови и из препаратов иммуноглобулина на это же количество клеток добавлялось около 1000 мкг гамма-глобулина, что могло быть достаточным для частичного закрытия антигенных детерминант анализируемых молекул на лимфоцитах.

После окончания инкубации с МКАТ проводилась отмывка лимфоцитов раствором Хенкса по описанной выше методике. Однократный раствор OptiLyse (Beckman Coulter, США) добавлялся по 200 мкл в каждую пробирку для фиксации антител на лимфоцитах в монокультурах.

Особенности экспрессии HLA-G и HLA-DR на различных субпопуляциях лимфоцитов женщин и детей, а также влияние на этот процесс аутогенных и аллогенных сывороток и гамма-глобулиновых препаратов крови человека были оценены с помощью протокола проточной цитофлуориметрии для CytoFlex (Beckman Coulter, США).

Протокол включал несколько последовательных этапов для каждой монокультуры, инкубированных в полной среде и в среде с добавлением аллогенных, аутогенных сывороток крови, а также с ФГГ2 и ИГЧ1.

Первый этап был связан с выделением в первой гистограмме популяции лимфоцитов по их размерным характеристикам (прямое (малоугловое) светорассеяние – forward scatter – FSL) и по внутриклеточной плотности (боковое светорассеяние – side scatter – SSL).

В следующей гистограмме пул лимфоцитов был дополнительно кластеризован по общему лейкоцитарному маркеру CD45 (CD45-PC7) и внутриклеточной плотности (SSL).

Третья гистограмма была для этого исследования основной. Именно в ней анализировались выделенные лимфоциты по фенотипам: CD3⁺/HLA-G⁺, CD3⁻/HLA-G⁺ и CD3⁺/HLA-DR⁺, CD3⁻/HLA-DR⁺, а также CD45⁺/HLA-G⁺, CD45⁺/HLA-DR⁺. Анализ этих субпопуляций лимфоцитов проводился во всех монокультурах как в полной среде, так и с добавлением аутогенных, аллогенных сывороток крови и с ФГГ2, ИГЧ1 (рис. 5, см. 3-ю стр. обложки).

По различию экспрессии HLA-G и HLA-DR на различных субпопуляциях женских и детских лимфоцитов в полной среде и в среде с добавлением аллогенных, аутогенных сывороток крови и с ФГГ2 и ИГЧ1, соответственно, определяли их эффект. Если в среде с той или иной сывороткой крови или с ФГГ2 и ИГЧ1 экспрессия HLA-G и HLA-DR на соответствующей субпопуляции лимфоцитов была ниже, чем в полной среде, то

эффект данного иммунобиологического материала считался блокирующим. В том случае, если в среде с сывороткой крови или с ФГГ2 и ИГЧ1 экспрессия молекул HLA-G и HLA-DR на соответствующей субпопуляции лимфоцитов была выше, чем в полной среде, то эффект данной сыворотки считался активирующим. Для количественной оценки эффектов сывороток крови и ФГГ2, ИГЧ1 использовали формулу:

Изменение экспрессии HLA-G или HLA-DR в % = ((количество клеток с молекулами HLA-G или HLA-DR в среде с сывороткой крови или с ФГГ2, ИГЧ1 – количество клеток с молекулами HLA-G или HLA-DR в полной среде)/количество клеток с молекулами HLA-G или HLA-DR в полной среде) × 100%.

Оценка эффекта выделенной фракции гамма-глобулина

На первом этапе исследования провели сравнение эффектов активации и блокирования экспрессии HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин основной и контрольной групп под воздействием аутогенной сыворотки и ФГГ2, ИГЧ1. Данные представлены в таблице 1. Как видно из таблицы, аутогенная женская сыворотка обладала блокирующим эффектом на субпопуляции лимфоцитов CD3⁻, HLA-G⁺ и CD3⁺, HLA-G⁺ в контрольной группе и, напротив, активирующим эффектом – в основной группе (женщины, имеющие детей с ВПС). По этим показателям получены значимые различия между группами. Соответственно, в коммерческом лечебном иммуноглобулине для внутривенного введения (ИГЧ1) и в полученной концентрированной гамма-глобулиновой фракции (ФГГ2) эти антитела присутствовали. Так, из таблицы 1 видно, что ИГЧ1 и ФГГ2 оказывали блокирующий эффект на все субпопуляции женских лимфоцитов, экспрессирующих HLA-G, в основной и контрольной группах. Причем эффект данных препаратов был сопоставим с эффектом аутогенной сыворотки для женских лимфоцитов CD3⁻, HLA-G⁺ в контрольной группе. Все женщины этой группы имели только условно-здоровых детей (без ВПС). Для данной субпопуляции в основной группе эффект ИГЧ1 и ФГГ2 значимо отличался от влияния на экспрессию HLA-G женской аутогенной сыворотки (табл. 1).

В таблице 2 представлен анализ эффектов аутогенной сыворотки, ФГГ2 и ИГЧ1 в отношении молекул HLA-DR в основной и контрольной группах. Как видно из таблицы, аутогенная женская сыворотка обладала тем же блокирующим эффектом в отношении HLA-DR на анализируемых субпопуляции лимфоцитов CD3⁻, HLA-DR⁺ и CD3⁺, HLA-DR⁺ в контрольной группе, как и

ТАБЛИЦА 1. ЭФФЕКТЫ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ (АУТОГЕННАЯ СЫВОРОТКА, ФГГ2, ИГЧ1) НА ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ HLA-G В ОСНОВНОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППАХ ЖЕНЩИН

TABLE 1. EFFECTS OF IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS (AUTOGENOUS SERUM, FGG2, HIG1) ON CHANGES IN THE EXPRESSION OF HLA-G MOLECULES IN THE MAIN AND CONTROL GROUPS OF WOMEN

Эффекты иммунобиологических препаратов Effects of immunobiological preparations	Женщины контрольной группы Women in the control group			Женщины основной группы (дети с ВПС) Women of the main group (children with CHD)			p
	Me	Q _{0,25}	Q _{0,75}	Me	Q _{0,25}	Q _{0,75}	
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-G, аутогенная сыворотка, % Change in expression of CD3 ⁺ , HLA-G, autogenous serum, %	-34,24	-74,71	6,22	78,18	45,07	111,297	0,001
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-G, ИГЧ1, % Change in CD3 ⁺ , HLA-G, HIG1 expression, %	-11,72	-36,79	13,36	-7,42	-21,53	6,693	> 0,05
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-G, ФГГ2, % Change in CD3 ⁺ , HLA-G, FGG2 expression, %	-12,76	-45,33	23,81	-10,67	-19,31	30,644	> 0,05
P ауто/ИГЧ1 P auto/HIG1	> 0,05			0,009			p
P ауто/ФГГ2 P auto/FGG2	> 0,05			0,003			
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-G, аутогенная сыворотка, % Change in expression of CD3 ⁺ , HLA-G, autogenous serum, %	-35,59	-54,73	-16,46	45,72	22,47	68,97	0,001
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-G, ИГЧ1, % Change in expression of CD3 ⁺ , HLA-G, HIG1, %	-3,82	-21,15	16,78	-0,71	-19,67	21,09	> 0,05
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-G, ФГГ2, % Change in expression of CD3 ⁺ , HLA-G, FGG2, %	-12,67	-36,69	10,02	-2,01	-18,04	14,03	> 0,05
P ауто/ИГЧ1 P auto/HIG1	0,042			0,019			p
P ауто/ФГГ2 P auto/FGG2	> 0,05			0,011			

Примечание. Ауто – аутогенная сыворотка.

Note. Auto, autogenous serum.

для HLA-G. По данным показателям, между контрольной и основной группой были получены значимые различия. В основной группе женская аутогенная сыворотка, также проявляла активирующий эффект по отношению к экспрессии молекулы HLA-DR. Анализ эффективности ИГЧ1 и ФГГ2 по отношению к HLA-DR значимо различался с эффектом аутогенной сыворотки. Так, ИГЧ1 обладал блокирующим эффектом на экспрессию HLA-DR в контрольной группе для двух

анализируемых субпопуляций: CD3⁻, HLA-DR⁺ и CD3⁺, HLA-DR⁺. И, напротив, его эффект стремился к нулю в основной группе. Если принять во внимание, что протекция ВПС связана с блокирующим эффектом экспрессии HLA-DR аутогенной сывороткой, то активности ИГЧ1 недостаточно для этой протекции. В то же время, ФГГ2 проявлял блокирующий эффект в отношении экспрессии HLA-DR на субпопуляциях лимфоцитов CD3⁻, HLA-DR⁺ и CD3⁺, HLA-DR⁺

ТАБЛИЦА 2. ЭФФЕКТЫ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ (АУТОГЕННАЯ СЫВОРОТКА, ФГГ2, ИГЧ1) НА ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ HLA-DR В ОСНОВНОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППАХ ЖЕНЩИН

TABLE 2. EFFECTS OF IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS (AUTOGENOUS SERUM, FGG2, HIG1) ON CHANGES IN THE EXPRESSION OF HLA-DR MOLECULES IN THE MAIN AND CONTROL GROUPS OF WOMEN

Эффекты иммунобиологических препаратов Effects of immunobiological preparations	Женщины контрольной группы Women in the control group			Женщины основной группы (дети с ВПС) Women of the main group (children with CHD)			p
	Me	Q _{0,25}	Q _{0,75}	Me	Q _{0,25}	Q _{0,75}	
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-DR, аутогенная сыворотка, % Change in CD3 ⁺ , HLA-DR expression, autogenous serum, %	-15,21	-38,83	6,41	30,89	13,46	48,32	0,011
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-DR, ИГЧ1, % Change in CD3 ⁺ , HLA-DR, HIG1 expression, %	-24,19	-42,18	-6,20	8,66	-6,22	21,55	0,019
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-DR, ФГГ2, % Change in CD3 ⁺ , HLA-DR, FGG2 expression, %	-30,67	-52,23	-9,12	-11,47	-26,78	-0,84	> 0,05
P ауто/ИГЧ1 P auto/HIG1	> 0,05			> 0,05			p
P ауто/ФГГ2 P auto/FGG2	> 0,05			0,004			
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-DR, аутогенная сыворотка, % Change in expression of CD3 ⁺ , HLA-DR, autogenous serum, %	-46,95	-56,05	-37,85	8,68	-10,63	28,00	0,001
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-DR, ИГЧ1, % Change in expression of CD3 ⁺ , HLA-DR, HIG1, %	-15,88	-18,76	-12,99	4,49	-13,68	21,67	0,041
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-DR, ФГГ2, % Change in expression of CD3 ⁺ , HLA-DR, FGG2, %	-22,36	-37,09	-2,38	-10,52	-19,70	-1,35	> 0,05
P ауто/ИГЧ1 P auto/HIG1	> 0,05			> 0,05			
P ауто/ФГГ2 P auto/FGG2	> 0,05			0,023			

Примечание. Ауто – аутогенная сыворотка.

Note. Auto, autogenous serum.

как в контрольной, так и в основной группах. По этому свойству получены значимые различия для двух анализируемых субпопуляций лимфоцитов между аутогенной сывороткой в основной группе (табл. 2). Соответственно, протективный эффект в отношении риска формирования ВПС для полученного препарата гамма-глобулиновой фракции значимо выше, чем для коммерческого лечебного иммуноглобулина для внутривенного введения.

Следующим этапом исследования было сравнение эффектов ФГГ2 и ИГЧ1 с аллогенным влиянием материнской сыворотки крови на экспрессию молекул HLA-G и HLA-DR на детских лимфоцитах основной и контрольной групп. В таблице 3 представлены данные об эффектах в отношении экспрессии молекулы HLA-G. Как видно из таблицы, эффект аллогенной сыворотки был схож с эффектом аутогенной сыворотки. То есть в двух анализируемых субпопуляциях

ТАБЛИЦА 3. ЭФФЕКТЫ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ (МАТЕРИНСКАЯ АЛЛОГЕННАЯ СЫВОРОТКА, ФГГ2, ИГЧ1) НА ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ HLA-G В ОСНОВНОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППАХ ДЕТЕЙ

TABLE 3. EFFECTS OF IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS (MATERNAL ALLOGENEIC SERUM, FGG2, HIG1) ON CHANGES IN THE EXPRESSION OF HLA-G MOLECULES IN THE MAIN AND CONTROL GROUPS OF CHILDREN

Эффекты иммунобиологических препаратов Effects of immunobiological preparations	Дети контрольной группы Children of the control group			Дети основной группы (с ВПС) Children of the main group (with CHD)			p
	Me	Q _{0,25}	Q _{0,75}	Me	Q _{0,25}	Q _{0,75}	
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-G, аллогенная сыворотка, % Change in expression of CD3 ⁺ , HLA-G, allogeneic serum, %	-44,19	-72,70	-15,68	143,72	95,31	192,14	< 0,001
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-G, ИГЧ1, % Change in CD3 ⁺ , HLA-G, HIG1 expression, %	-56,62	-88,23	-37,01	17,71	-8,20	43,62	0,024
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-G, ФГГ2, % Change in CD3 ⁺ , HLA-G, FGG2 expression, %	-18,62	-62,93	45,69	11,67	-7,07	30,42	> 0,05
Р алло/ИГЧ1 P allo/HIG1	> 0,05			0,031			p
Р алло/ФГГ2 P allo/FGG2	> 0,05			0,027			
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-G, аллогенная сыворотка Changes in the expression of CD3 ⁺ , HLA-G, allogeneic serum	-41,40	-85,93	3,13	44,03	18,12	69,94	0,023
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-G, ИГЧ1 Changes in the expression of CD3 ⁺ , HLA-G, HIG1	-75,45	-83,28	-67,61	15,39	-3,71	37,07	0,009
Изменение экспрессии CD3 ⁺ , HLA-G, ФГГ2 Changes in the expression of CD3 ⁺ , HLA-G, FGG2	-65,72	-87,83	-43,61	12,45	-3,45	28,36	0,017
Р алло/ИГЧ1 P allo/HIG1	> 0,05			> 0,05			
Р алло/ФГГ2 P allo/FGG2	> 0,05			> 0,05			

Примечание. Алло – аллогенная сыворотка.

Note. Allo, allogeneic serum.

лимфоцитов в контрольной группе аллогенная сыворотка оказывала блокирующий эффект на экспрессию HLA-G, а в основной группе – активирующий.

В таблице 4 представлены данные об анализе эффектов аллогенной материнской сыворотки крови, ФГГ2 и ИГЧ1 на экспрессию HLA-DR в основной и контрольной группах. Как видно из таблицы, аллогенная сыворотка проявляла блокирующий эффект на экспрессию HLA-DR в

двух анализируемых субпопуляциях лимфоцитов в контрольной группе. В то же время этот эффект отсутствовал в основной группе и был, напротив, активирующим для субпопуляции CD3⁺, HLA-DR⁺ лимфоцитов. На субпопуляцию CD3⁺, HLA-DR⁺ лимфоцитов материнская аллогенная сыворотка влияла слабым блокирующим эффектом, стремящемся к нулю. По этим эффектам основная группа значительно отличалась от группы контроля (табл. 2).

ТАБЛИЦА 4. ЭФФЕКТЫ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ (МАТЕРИНСКАЯ АЛЛОГЕННАЯ СЫВОРОТКА, ФГГ2, ИГЧ1) НА ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ HLA-DR В ОСНОВНОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППАХ ДЕТЕЙ

TABLE 4. EFFECTS OF IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS (MATERNAL ALLOGENEIC SERUM, FGG2, HIG1) ON CHANGES IN THE EXPRESSION OF HLA-DR MOLECULES IN THE MAIN AND CONTROL GROUPS OF CHILDREN

Эффекты иммунобиологических препаратов Effects of immunobiological preparations	Дети контрольной группы Children of the control group			Дети основной группы (с ВПС) Children of the main group (with CHD)			p
	Me	Q _{0,25}	Q _{0,75}	Me	Q _{0,25}	Q _{0,75}	
Изменение экспрессии CD3⁺, HLA-DR, аллогенная сыворотка, % Change in CD3 ⁺ , HLA-DR expression, allogeneic serum, %	-21,51	-24,96	-18,06	36,44	15,93	56,95	0,025
Изменение экспрессии CD3⁺, HLA-DR, ИГЧ1, % Change in CD3 ⁺ , HLA-DR, HIG1 expression, %	-15,49	-19,29	-11,68	2,30	-9,54	14,14	0,046
Изменение экспрессии CD3⁺, HLA-DR, ФГГ2, % Change in CD3 ⁺ , HLA-DR, FGG2 expression, %	-16,32	-24,91	-7,72	-9,44	-15,88	-3,00	> 0,05
P алло/ИГЧ1 P allo/HIG1	> 0,05			0,048			p
P алло/ФГГ2 P allo/FGG2	> 0,05			0,027			
Изменение экспрессии CD3⁺, HLA-DR, аллогенная сыворотка Changes in CD3 ⁺ , HLA-DR expression, allogeneic serum	-27,38	-34,77	-14,99	-3,67	-16,06	5,73	0,049
Изменение экспрессии CD3⁺, HLA-DR, ИГЧ1 Changes in the expression of CD3 ⁺ , HLA-DR, HIG1	-45,53	-56,33	-34,74	-8,00	-14,79	-1,20	0,037
Изменение экспрессии CD3⁺, HLA-DR, ФГГ2 Changes in the expression of CD3 ⁺ , HLA-DR, FGG2	-51,59	-56,71	-46,48	-24,65	-31,28	-18,02	0,045
P алло/ИГЧ1 P allo/HIG1	> 0,05			> 0,05			
P алло/ФГГ2 P allo/FGG2	> 0,05			> 0,05			

Примечание. Алло – аллогенная сыворотка.

Note. Allo, allogeneic serum.

Обсуждение

Известно, что ген HLAG имеет низкий полиморфизм, поэтому практически у всех людей экспрессируется почти один и тот же белок [7]. В то же данная молекула является ключевой для ограничения иммунного воспаления в системе «мать-эмбрион/плод» и вынашивания беременности [13]. Доказано, что дефицит экспрессии HLA-G на клетках эмбриона и цитотрофобласта, а не генетический полиморфизм, ассоциирован

с репродуктивными потерями [10]. Кроме того, показано, что молекула HLA-G экспрессируется не только на клетках вневорсинчатого цитотрофобласта, но и в половых путях, в крови беременных и небеременных женщин, в семенной жидкости, а также в предимплантированных эмбрионах [10]. Тем самым особенности экспрессии HLA-G в материнском микроокружении, в клетках эмбриона, могут быть значимыми в ограничении иммунного отторжения полуаллогенно-

го эмбриона и провоспалительной компоненты патогенеза ВПС.

Доскональное понимание роли HLA-G как на женских Т-, так и на В-лимфоцитах, еще впереди, как и оценка значимости аутоиммунных регуляторных антител к этой молекуле. В то же время представленное исследование показывает наибольший блокирующий эффект по отношению к экспрессии HLA-G именно от ФГГ2, который сопоставим с аутогенной сывороткой женщин, родивших здоровых детей.

В отношении аллогенных или отцовских антител к HLA I и II классов при репродуктивных потерях и аномалий развития плода имеется достаточное количество научных исследований. Интерес к аллогенным антителам против HLA, индуцируемых во время беременности, не стихает с 80-х годов прошлого столетия [9]. Современные исследования на диагностических платформах LUMINEX подтверждают, что более 40% повторнородящих женщин имеют антитела против HLA I и II классов. Причем доказано, что удельный вес женщин, имеющих специфические антитела против отцовских HLA не превышает 20% из всей популяции. Соответственно, из когорты женщин, имеющих антитела к HLA, это будет 50% [14]. При репродуктивных потерях, а возможно, и при аномалиях развития плода, снижается как количество женщин, имеющих антитела к HLA I и II классов, так и их специфичность по отношению к отцовским HLA [14]. Неспецифические в отношении отцовских, а значит, и аллогенных эмбриональных/плодовых, HLA антитела не обладают блокирующим эффектом. Они могут быть триггерами в развитии воспалительных реакций в системе «мать-эмбрион/плод», и через это усиливать экспрессию молекул HLA I и II классов.

Тем самым аллоиммунные антитела к HLA-DR эмбриона/плода/ребенка являются значимыми регуляторными элементами как в отношении вы-

нашивания беременности, так и для блокирования тератогенеза в сердечно-сосудистой системе.

Таким образом, в патогенез ВПС вносит вклад активирующий эффект факторов материнской аллогенной сыворотки (женских гуморальных факторов). Донорский иммуноглобулин человека может блокировать это патогенное воздействие женских гуморальных факторов. Причем у иммуноглобулина, полученного от многорожавших женщин, этот эффект выражен в большей степени, и тем самым он может претендовать не только на лечебный препарат аллогенных форм репродуктивных потерь, но и как иммунобиологический препарат, направленный для прегравидарной иммунной профилактики ВПС. Полученные результаты не противоречат основной концепции иммунологии репродукции и ограничения иммунного воспаления при сердечно-сосудистой патологии [1, 11].

Заключение

Блокирующая активность женской сыворотки по отношению к аутогенным (собственным) и аллогенным (эмбриона/плода/ребенка) молекулам HLA-G и HLA-DR определяет протективный эффект в отношении формирования ВПС в последующем поколении. Донорский иммуноглобулин человека обладает схожими блокирующими эффектами к этим молекулам, возможно, за счет наличия в нем аллоиммунных антител к HLA I и II классов. Фракция гамма-глобулина, полученная из донорской крови многорожавших женщин, обладает более выраженным блокирующим эффектом по отношению к экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR. Тем самым данный иммунобиологический препарат может быть прототипом лечебного и профилактического средства, блокирующего патогенез врожденных пороков сердца.

Список литературы / References

1. Борисенко Д.В., Ивкин А.А., Шукевич Д.Л. Современные методы ограничения системного воспалительного ответа при коррекции врожденных пороков сердца у детей в условиях искусственного кровообращения // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, 2021. Т.10, № 2. С. 113-124. [Borisenko D.V., Ivkin A.A., Shukevich D.L. Treatment of systemic inflammatory response syndrome following on-pump pediatric congenital heart surgery. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolovaniy = Complex Issues of Cardiovascular Diseases*, 2021, Vol. 10, no. 2, pp. 113-124. (In Russ.)]
2. Дубоссарская З.М., Дубоссарская Ю.А. Основные вопросы иммунологии репродукции // Медицинские аспекты здоровья женщины, 2010. Т. 31, № 4. С. 15-21. [Dubossarskaya Z.M., Dubossarskaya Yu.A. Basic issues of reproduction immunology. *Meditzinskie aspekty zdorovya zhenshchiny = Medical Aspects of Women's Health*, 2010, Vol. 31, no. 4, pp. 15-21. (In Russ.)]

3. Есина Е.В., Логина Н.Ю., Аляутдина О.С. Роль иммунных взаимодействий в развитии бесплодия: обзор литературы // Российский медицинский журнал. Мать и дитя, 2013. Т. 21, № 1. С. 44-48. [Esina E.V., Logina N.Yu., Alyautdina O.S. The role of immune interactions in the development of infertility: a literature review. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal. Mat i ditya = Russian Medical Journal. Mother and Child*, 2013, Vol. 21, no. 1, pp. 44-48. (In Russ.)]
4. Романенко Н.А., Бессмельцев С.С., Чечёткин А.В. Коррекция иммунного статуса пациентов иммуноглобулином человека для внутривенного введения // Казанский медицинский журнал, 2017. Т. 5. С. 775-783. [Romanenko N.A., Bessmeltsev S.S., Chechetkin A.V. Correction of patients' immune status with human intravenous immunoglobulin. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2017, Vol. 5, pp. 775-783. (In Russ.)]
5. Способ определения антител к аллогенным HLA-G. Шабалдин А.В., Мозес В.Г., Беленкова О.В., Шабалдина Е.В. Патент на изобретение RU 2585091 C1, 27.05.2016. Заявка № 2015101526/15 от 19.01.2015. [Method for determination of antibodies to allogeneic HLA-G. Shabaldin A.V., Mozes V.G., Belenkova O.V., Shabaldina E.V. Patent for invention RU 2585091 C1, May 27, 2016. Application No. 2015101526/15 dated 01/19/2015.]
6. Шабалдин А.В., Гривцова С.В., Деева Н.С., Шмулевич С.А., Цепочкина А.В., Аникеенко А.А., Шабалдина Е.В., Вавин Г.В. Изменение экспрессии HLA-DR на субпопуляциях лимфоцитов супругов, имеющих детей со спорадическими врожденными пороками сердца без хромосомных заболеваний, под воздействием женской аутосыыворотки // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 143-148. [Shabaldin A.V., Gritvtsova S.V., Deeva N.S., Shmulevich S.A., Tsepokina A.V., Anikeenko A.A., Shabaldina E.V., Vavin G.V. Changes in the expression of HLA-DR on lymphocyte subpopulations of spouses having children with sporadic congenital heart defects without chromosomal diseases, under the influence of female's auto-serum. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 143-148. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CIT-2013.
7. Шабалдин А.В., Деева Н.С., Сухих А.С., Изменение экспрессии мембранных молекул HLA-G у женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца, под воздействием фракции гамма-глобулинов, полученной из плазмы крови многорожавших женщин // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 373-376. [Shabaldin A.V., Deeva N.S., Sukhikh A.S. Altered expression of cell membrane HLA-G molecules in mothers of children with inborn heart defects upon exposure to plasma gamma-globulin from multiparous women. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 373-376. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-987-AEO.
8. Chen L., Guan J., Wei Q., Yuan Z., Zhang M. Potential role of "omics" technique in prenatal diagnosis of congenital heart defects. *Clin. Chim. Acta*, 2018, Vol. 482, pp. 185-190.
9. Densmore T.L., Tim Goodnough L., Ali S., Dynis M., Chaplin H. Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. *Transfusion*, 1999, Vol. 39, no. 1, pp. 103-106.
10. Lynge Nilsson L., Djuricic S., Hviid T.V.F. Controlling the immunological crosstalk during conception and pregnancy: HLA-G in reproduction. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 198. doi: 10.3389/fimmu.2014.00198.
11. Mulder A., Kardol M.J., Kamp J., Uit Het Broek C., Schreuder G.M., Doxiadis I.I., Claas F.H. Determination of the frequency of HLA antibody secreting B-lymphocytes in alloantigen sensitized individuals. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001, Vol. 124, no. 1, pp. 9-15.
12. Nyborg K.M., Kolte A.M., Larsen E.C., Christiansen O.B. Immunomodulatory treatment with intravenous immunoglobulin and prednisone in patients with recurrent miscarriage and implantation failure after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 2014, Vol. 102, no. 6, pp. 1650-1655.
13. Persson G., Jørgensen N., Nilsson L.L., Andersen L.H.J., Hviid T.V.F. A role for both HLA-F and HLA-G in reproduction and during pregnancy? *Hum. Immunol.*, 2020, Vol. 81, no. 4, pp. 127-133.
14. Prieto-Casal F., Cabañas-Gadea C., Figueredo-López S., Villagra-Carrón V. Fetomaternal immunization against HLA antigens in women from a Paraguayan population. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.*, 2021, Vol. 19, no. 1, pp. 48-57.

15. Shabaldin A.V., Shmulevich S.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Lukoyanycheva E.B., Gorshkova S.V., Shabaldina E.V. Peculiarities of allogenic interactions in the short-term culture of lymphocytes of spouses who have children with congenital heart diseases or early reproductive losses. *Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 21, no. 2, pp. 279-292. doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292.

16. Wu Q.Y. To promote the sustainable development of surgical treatment for congenital heart disease by innovation and practice. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2018, Vol. 56, no. 6, pp. 407-409.

Авторы:

Шабалдин А.В. — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Синицкая А.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории геномной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Шмелевич С.А. — к.м.н., детский кардиолог ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Гришачева Е.О. — клинический ординатор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Шабалдина Е.В. — д.м.н., заведующая кафедрой оториноларингологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Деева Н.С. — врач-кардиолог ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Authors:

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Heart Diseases, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Sinitskaya A.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Shmulevich S.A., PhD (Medicine), Pediatric Cardiologist, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Grishacheva E.O., Clinical Resident, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Shabaldina E.V., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Otorhinolaryngology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Deeva N.S., Cardiologist, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 18.07.2023
Принята к печати 05.10.2023

Received 18.07.2023
Accepted 05.10.2023

ИММУНОТЕРАПИЯ ДЕТЕЙ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Долгополов И.С.^{1,2}, Рыков М.Ю.³

¹ ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тверь, Россия

² ГБУЗ Тверской области «Детская областная клиническая больница», г. Тверь, Россия

³ ФГБОУ ВО «Российский государственный социальный университет», Москва, Россия

Резюме. Частота глиом высокой степени злокачественности (ЗГ) составляет от 35% до 46% всех опухолей центральной нервной системы. Несмотря на комбинированную терапию, включающую хирургическое вмешательство, лучевую и химиотерапию, общая пятилетняя выживаемость не превышает 10%. Появление новых иммунотерапевтических стратегий послужило началом для нового направления в лечении данной категории пациентов.

Цель — повышение выживаемости пациентов с глиомами.

В исследование включены 5 пациентов в возрасте от 2 до 16 лет (средний возраст 7,6 года). У трех пациентов диагностирована анапластическая астроцитома (АА), у одного пациента — мультиформная глиобластома (МГ) (3-й рецидив) и еще у одного пациента — диффузная глиома ствола мозга (ДГ). Среднее время до развития первого рецидива составило 12 месяцев (от 4 до 16 мес.), до развития второго — 5 месяцев (от 1 до 8 мес.). Протокол иммунотерапии включал комбинированное введение аутологичной вакцины на основе дендритных клеток (ДВ) и повторные интратекальные / внутривенные инъекции донорских аллогенных иммунокомпетентных клеток в течение не менее 2 лет.

У двух из трех пациентов с АА интервал без прогрессирования составил 67 и 71 месяц. Один пациент с третьим рецидивом МГ жив без какой-либо терапии через 13,3 года после начала иммунотерапии. Среднее время наблюдения составило 67 месяцев, общая двухлетняя выживаемость составила 58%. Два пациента умерли от прогрессирования заболевания в течение 6 и 7 месяцев от начала иммунотерапии. За период лечения пациенты получали в среднем 20 (от 8 до 60) инъекций аллогенных иммунокомпетентных клеток и 18 (от 8 до 44) инъекций ДВ. Побочных эффектов не наблюдалось.

Иммунотерапия может быть привлекательным вариантом для лечения пациентов со злокачественными глиомами высокой степени злокачественности, не поддающимися традиционной терапии, и заслуживает дальнейшего изучения.

Ключевые слова: глиобластома, астроцитома, иммунотерапия, дендритная вакцина, адаптивная терапия аллогенными клетками

Адрес для переписки:

Рыков Максим Юрьевич
ФГБОУ ВО «Российский государственный социальный университет»
129226, Россия, Москва, ул. Вильгельма Пика, 4, стр. 1.
Тел.: 8 (916) 187-52-61.
E-mail: wordex2006@rambler.ru

Address for correspondence:

Maksim Yu. Rykov
Russian State Social University
4 Wilhelm Pieck St, Bldg 1
Moscow
129226 Russian Federation
Phone: +7 (916) 187-52-61.
E-mail: wordex2006@rambler.ru

Образец цитирования:

И.С. Долгополов, М.Ю. Рыков «Иммунотерапия детей со злокачественными опухолями головного мозга» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 1. С. 85-94.
doi: 10.46235/1028-7221-16566-IFC

© Долгополов И.С., Рыков М.Ю., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.S. Dolgoplov, M. Yu. Rykov "Immunotherapy for children with malignant brain tumors", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 1, pp. 85-94.
doi: 10.46235/1028-7221-16566-IFC

© Dolgoplov I.S., Rykov M. Yu., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16566-IFC

IMMUNOTHERAPY FOR CHILDREN WITH MALIGNANT BRAIN TUMORS

Dolgopolov I.S.^{a, b}, Rykov M.Yu.^c

^a Tver State Medical University, Tver, Russian Federation

^b Children's Regional Clinical Hospital, Tver, Russian Federation

^c Russian State Social University, Moscow, Russian Federation

Abstract. The incidence of high-grade malignant gliomas (MG) ranges from 35 to 46% of all central nervous system tumors. Despite combined therapy including surgery, radiation treatment and chemotherapy, overall five-year survival does not exceed 10%. The advent of novel immunotherapeutic strategies has promoted a renewed hopes for the treatment of MG. The aim of the present study was to improve the survival rates of glioma patients.

Our study included 5 pediatric patients at the median age of 7.6 years (2-16). Three pts had anaplastic astrocytoma (AA) (1st relapse, 1 pt; 2nd relapse, in 2 pts), One patient was diagnosed with glioblastoma multiforme (GBM) (3rd recurrence), and 1 child had diffuse brainstem glioma (BSG). The median time to the first relapse was 12 months (4 to 16), the second relapse occurred at a median of 5 months (1 to 8). The protocol of immunotherapy included combined administration of autologous dendritic cell-based vaccine (DV) and repeated intrathecal/intraventricular injections of donor allogeneic immunocompetent cells (alloIC) for at least 2 years.

Two of 3 pts with AA experienced a progression-free interval of 67 and 71 months. One patient with 3rd GBM relapse is alive without any treatment for 13.3 years after starting the immunotherapy. The median time of follow-up was 67 months, with the 2-year overall survival rate of 58%. Two pts died from the disease progression within 6 and 7 months from the beginning of immunotherapy. Over the period of treatment, the patients received a median of 20 alloIC injections (8 to 60), and 18 DV administrations (8 to 44). No serious side-effects were observed.

Immunotherapy could be an promising option for treating patients with high-grade malignant gliomas refractory to conventional therapy and, therefore, deserves further investigations.

Keywords: glioblastoma, astrocytoma, immunotherapy, dendritic vaccine, allogenic cell adoptive therapy

Введение

Злокачественные глиомы (высокой степени злокачественности), такие как анапластические астроцитомы (степень III по классификации ВОЗ) и глиобластомы (степень IV по классификации ВОЗ), имеют неблагоприятный прогноз у детей и у взрослых. Глиобластома (ГБМ) является наиболее злокачественной из глиальных опухолей (степень IV) и составляет более половины всех первичных опухолей головного мозга в США с ежегодной распространенностью примерно 3,19 на 100 000 человек. В педиатрической практике частота возникновения анапластической астроцитомы /глиобластомы составляет 1,1-1,2 новых случаев на 100 000 детей в возрасте до 15 лет [1, 2]. Глиомы головного мозга представляют собой уникальную проблему из-за их высокоинвазивной природы, что приводит к почти 100% частоте рецидивов даже в случаях полной тотальной резекции на основании рентгенологических критериев [3]. Более того, обычно наблюдается плохой ответ на существующее лечение из-за внутрен-

ней гетерогенности опухоли [4, 5]. Несмотря на комбинированное лечение, включающее хирургическое вмешательство, лучевую терапию и химиотерапию, средняя выживаемость этих пациентов остается неудовлетворительной. Средняя выживаемость пациентов с ГБМ составляет примерно 14 месяцев даже при агрессивных режимах лечения [2, 6]. Общая 2-летняя выживаемость (ОВ) у взрослых пациентов, получивших послеоперационную лучевую терапию с последующим назначением темозоламида в адьювантном режиме, составляет 38%, а 3-летняя выживаемость не превышает 10-12% [7, 8, 9]. Общая выживаемость детей с анапластической астроцитомой в течение 1-го года составляет 85,5% и неуклонно снижается в течение следующих 2-го и 3-го года, достигая 70,9% и 27,3% соответственно. Медиана выживаемости пациентов с ГБМ снижается еще более значительно в течение первых 3 лет до 68,1%, 23,7% и 4,3% соответственно [9].

Появление иммунотерапевтических подходов к лечению глиом породило новый оптимизм в отношении лечения злокачественных глиом [10,

11]. Большинство из этих стратегий сосредоточены на индукции специфических иммунных реакций против опухоль-ассоциированных антигенов, либо используют механизмы врожденного противоопухолевого иммунитета [12, 13]. Еще одним важным направлением иммунотерапии, привлекающим большое внимание, является использование дендритных вакцин [14, 15]. Большое количество публикаций и исследований I-II фаз, представленных за последнее десятилетие в специальной литературе, свидетельствуют о том, что применение дендритных вакцин и адоптивной клеточной терапии является привлекательной опцией для пациентов с глиомами головного мозга высокой степени злокачественности,

прежде всего за счет низкой токсичности и минимума побочных эффектов самой терапии. Эффективность иммунотерапии также не вызывает сомнения. Основными проблемами остается поиск мишеней для активации антигенпрезентирующих и цитотоксических клеток и непрогнозируемый характер ответа на иммунотерапию у конкретного пациента.

Мы представляем серию из 5 педиатрических пациентов с глиомами II-IV степени злокачественности, получивших комбинированную иммунотерапию на основе аллогенных иммунокомпетентных клеток от родственного донора и дендритной специфической противоопухолевой вакцины.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ, ВКЛЮЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS INCLUDED IN THE STUDY

№ No.	Пол Gender	Возраст Age	Диагноз Diagnosis	Событийность до включения в протокол Events before being included in the protocol	Проводимое ранее лечение Previous treatment
1	Ж F	3,2	Диффузная опухоль моста Diffuse bridge tumor	Первичный Primary	ЛТ 54 Гр. + ТМЗ Radiation therapy 54 G. + Temozolamide
2	М M	11	АА спинного мозга 2-й рецидив Anaplastic astrocytoma of the spinal cord 2nd relapse	1) Рецидив 1 1) Relapse 1 2) Рецидив 2 2) Relapse 2	Операция + ЛТ 45,8 Гр 1) операция + ТМЗ № 5 2) биопсия Surgery + radiation therapy 45.8 G 1) operation + Temozolamide No. 5 2) biopsy
3	Ж F	5,6	АА головного мозга 1-й рецидив Anaplastic astrocytoma of the brain 1st relapse	1) Рецидив 1 1) Relapse 1	Операция + ЛТ 56 Гр + ТМЗ 1) операция Surgery + radiation therapy 56g + Temozolamide 1) operation
4	М M	2	АА головного мозга 2-й рецидив Anaplastic astrocytoma of the brain 2nd relapse	1) Рецидив 1 1) Relapse 1 2) Рецидив 2 2) Relapse 2	Операция + ТМЗ 1) операция + ПХТ (кармустин + иринотекан) 2) биопсия Operation + Temozolamide 1) surgery + polychemotherapy (carmustine + irinotecan) 2) biopsy
5	М M	16	МГБ, 3-й рецидив Glioblastoma multiforme 3rd relapse	1) Рецидив 1 1) Relapse 1 2) Рецидив 2 2) Relapse 2 3) Рецидив 3 3) Relapse 3	Операция + ЛТ 58 Гр + ТМЗ 1) операция + гамма-нож 25 Гр 2) операция + кибер-нож 20 Гр + ХТ 3) биопсия Surgery + radiation therapy 58 G + Temozolamide 1) operation + gamma knife 25 Gr 2) surgery + cyber knife 20 G + chemotherapy 3) biopsy

Материалы и методы

Исследуемый контингент пациентов

В исследование включено 5 пациентов в возрасте от 2 до 16 лет (средний возраст 7,6 лет), из них у 2 больных диагностирована анапластическая астроцитома (АА) головного мозга, у 1 пациента – АА спинного мозга С7-Th10, у 1 больного – мультиформная глиобластома (МГБ) и у 1 больного – диффузная опухоль моста (табл. 1).

В исследование были включены пациенты с опухолями, прогрессирующими после первичного лечения, или пациенты с рецидивами глиом. В одном случае речь шла о первом рецидиве, в двух случаях о втором рецидиве и у одного пациента был диагностирован третий рецидив МГБ. Все пациенты получили максимально возможную химиолучевую терапию. В одном случае лучевая терапия не проводилась в связи с возрастом пациента. На момент включения в протокол во всех случаях обнаруживалась видимая на МРТ остаточная опухоль. Во всех случаях, кроме пациента с диффузной глиомой ствола, перед включением в исследование проводилась биопсия для получения опухолевого материала. В случае диффузной глиомы ствола опухолевый материал был получен из нескольких образцов опухолевой ткани, хранящейся в биобанке.

Все пациенты должны были подписать письменное информированное согласие, и исследование было одобрено Наблюдательным советом учреждения.

Программа терапии

При лечении пациентов применялась комбинированная схема иммунотерапии, включающая в себя интратекальные (интравентрикулярные) введения аллогенных лимфоцитов от родственного HLA частично-совместимого донора и дендритных вакцин, нагруженных опухолевым лизатом. Общая продолжительность лечения составляла 2 года или продолжалась до момента констатации явного прогрессирования опухоли. С периодичностью 1 раз в 3 месяца проводилась контрольная МРТ головного мозга. Наблюдение за пациентами продолжалось до момента гибели от прогрессирования опухолевого процесса или от других причин. Период наблюдения составил от 3 месяцев до 12 лет.

Получение аллогенных иммунокомпетентных клеток

Близкие родственники пациентов были выбраны в качестве доноров аллогенных иммунокомпетентных клеток (аллоИК) для интратекальных (интравентрикулярных) трансфузий аллогенных лимфоцитов. В 2 случаях донором служила мать пациента, в 2 случаях отец и в 1 случае иммунокомпетентные клетки были полу-

чены от бабушки пациента. Несовместимость в паре донор/пациент по HLA составила 3/6 антигенов в 5 случаях и в 1 случае пара была совместима только по 1 из 6 HLA антигенам. Донорские лимфоциты были собраны методом цитафереза на непрерывно-поточном клеточном сепараторе после 4 дней стимуляции донора Г-КСФ. В среднем обрабатывалось 0,8 (0,75-1,2) объема циркулирующей крови донора. Продукт цитафереза в условиях ламинара был распределен равномерно на 20 доз, замораживался согласно стандартной методике с добавлением диметилсульфоксида (ДМСО) и хранился в криобанке в парах жидкого азота. Субпопуляции аллогенных лимфоцитов оценивали с помощью проточного цитометрического анализа поверхностных маркеров, таких как CD34⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁻/CD56⁺, HLA-DR⁺.

Получение антиген-презентирующих клеток и приготовление дендритных вакцин

Аутологичные дендритные клетки (ДК) были получены из мононуклеарных клеток периферической крови пациентов, которые были собраны методом лейкофереза через 1-2 недели после операции (биопсии). Для сбора 2-3 × 10⁹ мононуклеарных клеток было обработано в среднем 0,7 (0,5-1,3) объема циркулирующей крови пациента. Стандартная методика подготовки ДВ и криоконсервации описана ранее [16, 17]. Зрелые ДК экспрессировали CD80, CD83, CD86, CCR7.

Проведение клеточной терапии

Одна доза ДВ, содержащая в среднем 2,8 (2,5-5,0) × 10⁶ зрелых ДК, вводилась внутрикожно в 4 участка тела вблизи крупных лимфатических коллекторов один раз в две недели в течение первых 3 месяцев, а затем каждые 4 недели в течение следующих 2 лет. АллоИК вводились интратекально путем спинномозговой пункции (интравентрикулярно при наличии резервуара Омайо) еженедельно в течение первых 3 месяцев (всего 12 инъекций), затем один раз в месяц в течение последующих 9 месяцев (всего 9 инъекций) после разморозки на водяной бане и отмывки от ДМСО. Среднее количество введенных CD3⁺, CD56⁺/CD16⁺/CD3⁻ и CD34⁺ клеток составило 6,5 × 10⁸ (3,3-16,3), 1,1 × 10⁸ (0,8-1,7) и 5,2 × 10⁶ (2,1-10,1) соответственно.

Результаты

Трое пациентов (1 с МГБ и 2 с АА головного мозга) прожили более 3 лет без признаков прогрессирования опухоли. Один пациент жив на настоящий момент с периодом наблюдения 13,3 года без признаков опухоли. Период безрецидивного течения у двух пациентов с АА головного мозга составил 67 и 71 месяц, из них 39 и 47 месяцев после окончания иммунотерапии (ИТ). Первый из двух пациентов с АА, взятый в иссле-

дование в возрасте 2 лет и не получивший лучевой терапии, скончался по месту жительства через 70 месяцев от начала ИТ. Смерть наступила скоропостижно от отека мозга на фоне инфекции по данным персональной коммуникации с родителями пациента. У второго пациента развилась вторая опухоль в необлученной анатомической области головного мозга. Биопсия не проводилась. Пациент получал лечение по месту жительства по протоколу НИТ-91 без эффекта и погиб от прогрессирования через 4 месяца от развития рецидива. В обоих случаях патоморфологическое исследование не проводилось в связи с отказом родителей. Двое пациентов (с диффузной опухолью моста АА спинного мозга) не ответили на терапию и погибли от прогрессирования на фоне ИТ через 5 и 6 месяцев от начала терапии соответственно.

Медиана наблюдения за пациентами составила 67 месяцев. Двухлетняя ОВ составила 58% (рис. 1). Всего было проведено 121 введение аллоИК и 105 введений ДВ у 5 пациентов. Следует отметить низкую токсичность терапии. Из побочных эффектов отмечались кожная реакция в виде гиперемии в местах проведения вакцинации у 3 больных, у 2 также отмечалась локальная мышечная болезненность, лихорадка до 38 °С. Специального лечения указанные реакции не требовали и купировались самостоятельно. На 121 интратекальное (интравентрикулярное) введение наблюдалось 8 (7%) эпизодов постпункционного синдрома длительностью не более 24 часов, который был не требовал интенсивного лечения.

В качестве примера приводим клинический случай:

Больной Т., 16 лет, МГБ левой теменной области, третий рецидив. Первично пациенту была выполнена частичная резекция опухоли левой теменной области с последующей лучевой терапией в дозе 58 Гр (2 Гр, 5 дней в неделю) в сочетании с ТМЗ 80 мг/м²/сут, 5 раз в неделю в течение 3 недель. Затем пациент получил 6 курсов ТМЗ в дозе 200 мг/м²/сут в течение 5 дней, с интервалом в 28 дней. Через 15 месяцев констатирован локальный рецидив. После биопсии опухоли была проведена ЛТ «гамма-ножом» (однократная доза 25 Гр на краю поражения, время облучения – 49 мин.). Через 8 месяцев был диагностирован 2-й рецидив ГБМ, сопровождающийся генерализованными и парциальными эпилептическими приступами. Индекс Карновского 40. Была выполнена частичная резекция опухоли и проведена ЛТ по программе «кибер-нож» в дозе 20 Гр. Прогрессирование процесса наблюдалось через 3 месяца после операции на фоне химиотерапии, включающей циклофосфамид 2000 мг/м²/курс, этопозид 500 мг/м²/курс и карбоплатин 500 мг/м²/курс.

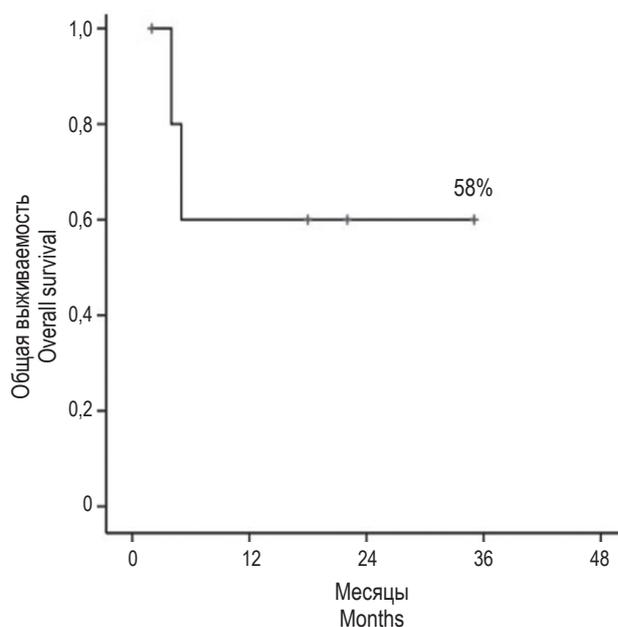


Рисунок 1. Общая двухлетняя выживаемость пациентов с глиомами

Figure 1. Overall two-year survival in patients with gliomas

Наблюдалось ухудшение неврологических симптомов, судорожного синдрома и увеличение объема опухоли на МРТ. Пациент был включен в протокол иммунотерапии. Донором для аллоИК была мать пациента, совместимая по 3 из 6 НЛА антигенам. После 5 инъекций аллоИК и 3 внутрикожных введений ДВ на МРТ отмечена стабилизация заболевания. У пациента течение первых 24 часов после введения ДВ отмечалась реакция гиперчувствительности замедленного типа в местах инъекций, сопровождавшаяся регионарным лимфаденитом. Лимфатические узлы увеличивались до 3-4 см и оставались болезненными в течение последующих 72 часов. Клинически было отмечено уменьшение тяжести и частоты эпилептических приступов, неврологических нарушений и улучшение общего самочувствия. После 4 месяцев иммунотерапии (10 инъекций вакцины аллоИК и 7 инъекций ДВ) по данным МРТ выявлено уменьшение опухоли примерно на 30% при более низком поглощении контраста. Генерализованные приступы полностью купированы, и противоэпилептическая терапия была прекращена. Рецидивов эпилептических припадков у пациента не наблюдалось. После 14 месяцев иммунотерапии (20 инъекций вакцины аллоИК и 12 инъекций ДВ) по данным МРТ отмечается дальнейшая положительная динамика. Индекс Карновского достиг 70. Однако сохраняется очаг повышенного накопления радиофармпрепарата по результатам проведения ПЭТ

с метионином^{11С}. Серия МРТ с интервалом в 3 месяца показала стабилизацию опухоли. Иммуноterapia была закончена через 32 месяца от момента включения в протокол. Пациент получил в общей сложности 40 инъекций вакцины аллоИК и 32 инъекции ДВ. В январе 2009 года (через 30 мес. после начала ИТ) ПЭТ с метионином^{11С} выявил активную ткань в остаточной опухоли, но без признаков прогрессирования. Во время терапии и периода наблюдения пациент был социально адаптирован и поступил в колледж. У пациента сохранялись остаточные неврологические нарушения в виде правостороннего гемипареза (3/5 балла). Период без прогрессирования достиг 47 месяцев по сравнению с 15, 8 и 3 месяцами между предыдущими рецидивами.

В мае 2009 (через 15 месяцев) у пациента развилась диплопия, головная боль, отмечено прогрессирование правостороннего гемипареза до плегии (1/5 балл). На МРТ отмечено увеличение размера опухоли и накопление контраста в левой теменной области. Индекс Карновского снизился до 60. Была проведена биопсия опухоли. Гистологический анализ показал наличие МГБ идентичной по строению с первичной опухолью. В ходе биопсии был проведен забор ткани опухоли для повторного приготовления ДВ и поставлен резервуар Омайю. Было решено произвести смену донора аллоИК. В качестве донора выбран отец пациента, совместимый по 3/6 HLA антигенам. Инъекции аллоИК проводились через резервуар Омайю, расположенный в ложе опухоли. ДВ вводились по прежней схеме внутривожно, в 4 участка тела. После 12 месяцев иммунотерапии (20 инъекций аллоИК и 14 инъекций ДВ) МРТ показала полную регрессию опухоли. Индекс Карновского 80. У пациента сохранялся правосторонний гемипарез (3/5 балла), эпилептических приступов не наблюдалось. Иммуноterapia была прекращена в сентябре 2011 года (через 16 месяцев после возобновления в связи с 4-м рецидивом), поскольку МРТ и ПЭТ с метионином^{11С} не выявили активной опухолевой ткани. Таким образом, период наблюдения за пациентом на фоне иммунотерапии составил в общей сложности 160 месяцев, включая период полной ремиссии, составивший 82 месяца. У пациента сохраняются явления правостороннего гемипареза 3/5 балла, имеются ортопедические нарушения. Интеллектуально пациент полностью сохранен. За кончил экономический факультет и факультет управления одного из московских университетов, успешно занимается бизнесом. Женат.

Обсуждение

В случаях множественных рецидивов глиальных опухолей традиционная терапия, как пра-

вило, неэффективна. Последние исследования иммунотерапевтических подходов продемонстрировали значительный потенциал иммунотерапии для борьбы с ранее устойчивым раком, включая лечение рецидивирующих опухолей ЦНС. В большинстве работ, включая клинические исследования 3 фазы, показали длительную стабилизацию заболевания у ряда пациентов и даже возможность достижения ремиссии глиальных опухолей, устойчивых к лучевой и химиотерапии [13, 18, 19, 20, 21, 22]. Проблемой, ограничивающей эффективность применения дендритных вакцин, является то, что МГБ является одной из самых иммунологически «холодных» опухолей, в которой инфильтрация цитотоксическими Т-клетками минимальна, а инфильтрация макрофагами и клетками микроглии преобладает [23, 24]. Глиомы используют несколько механизмов, чтобы уклониться от контроля со стороны иммунной системы. Клетки МГБ и ее микроокружения способны секретировать ряд цитокинов, например, ССL-2 лиганд, который способствует миграции моноцитов и Т-регуляторных (Treg) клеток в опухоль, снижая таким образом цитотоксическое воздействие CD8⁺ лимфоцитов [25]. Клетки глиом способны экспрессировать лиганд программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) и также опосредовано подавлять функцию Т-клеток. Кроме того, факторы, секретлируемые опухолевыми клетками, подавляют регуляцию молекул HLA-класса I и активируют синтез молекул HLA-класса II, что приводит к недостаточному цитотоксическому Т-клеточному ответу и смещению равновесия в сторону CD4⁺Т-клеточного ответа [26]. Клетки МГБ и АА характеризуются низкой мутационной нагрузкой и низким уровнем дефицита репарации спаренных нуклеотидов [27]. Вместе эти характеристики глиальных опухолей ЦНС объясняют часто неудовлетворительные результаты, полученные при проведении того или иного вида иммунотерапии. В связи со сложностью патофизиологических механизмов и с необходимостью разработки стандартизированных и надежно воспроизводимых подходов к клеточно-опосредованным методам иммунотерапии, основное внимание в этой области уделяется комбинированным методикам, базирующимся на одновременном или последовательном использовании адаптивной Т- и НК-клеточной терапии, различных типов противоопухолевых дендритных вакцин, ингибиторов контрольных точек иммунитета, цитокинов [13, 14, 15].

Наша стратегия иммунотерапии основана на двух концепциях. Во-первых, на индуцировании собственного специфического иммунного ответа пациента путем инъекции аутологичной

противоопухолевой цельноклеточной вакцины, нагруженной лизатом опухолевых клеток самого пациента. Данный подход позволяет дендритным клеткам представлять те антигены опухоли, которые наиболее актуальны для конкретной ситуации и специфически активировать иммунокомпетентные эффекторные клетки. Ярким примером эффективности такой стратегии служит представленный в статье клинический случай, когда дендритная вакцина, приготовленная на базе опухолевого материала после очередного рецидива МГБ, позволила достичь выраженного клинического эффекта.

Wheeler и соавт. провели исследование, в котором 32 пациентам с МГБ (11 – первично диагностированных и 21 – рецидивных) вводили вакцину на основе ДК, нагруженных аутологичным опухолевым лизатом. У 53% пациентов продукция антиген-направленного $IFN\gamma$ прогрессивно увеличивалась после вакцинации, достигая статистической значимости после двух вакцинаций и максимальных уровней после трех вакцинаций. При этом безрецидивный интервал у пациентов, ответивших на вакцинацию, составлял 642 ± 61 день по сравнению с 430 ± 50 дней у лиц, не ответивших на лечение повышением уровня $IFN\gamma$ [28]. Обращает на себя внимание тот факт, что в нашем исследовании у пациентов, ответивших на иммунотерапию, наблюдалась выраженная реакция периферических для зон введения вакцины лимфатических узлов и формирование реакции клеточного иммунитета. Клиническое исследование I/II фазы, проведенное группой японских ученых, показало достоверное увеличение медианы общей выживаемости у 18 пациентов с рецидивирующей МГБ, получивших ДВ, нагруженную опухолевым лизатом, по сравнению с контролем (480 дней против 400 дней). Это исследование также включало подгруппу пациентов, которые получали внутриопухолевое введение ДВ через резервуар Оттава в дополнение к стандартным внутрикожным инъекциям и продемонстрировало безопасность данного метода [29]. В 2013 году Вик-Мо и соавт. исследовали использование аутологичной противоопухолевой вакцины у пациентов с МГБ и обнаружили как наличие иммунного ответа у всех 7 пациентов, так и увеличение интервала до прогрессирования, который в 2,9 раза превышал аналогичный показатель в контрольной группе [30].

Во-вторых, параллельно с ДВ мы применили метод адоптивной клеточной иммунотерапии. Иммунокомпетентные клетки получали от близкородственных доноров и многократно вводили непосредственно через гематоэнцефалический барьер. Нами была выдвинута концепция, что неманипулированный пул иммуноком-

петентных клеток, как различных субпопуляций Т-лимфоцитов, так и НК-клеток от донора, несовместимого по HLA антигенам, способен воздействовать на клетки глиомы как через MHC I и II классов, так и через KIR-активирующие рецепторы. Подобная стратегия с успехом используется при проведении частично-совместимых аллогенных трансплантаций у пациентов с лейкозами, лимфомами и солидными опухолями [31, 32].

Одной из задач было оценить возможность и безопасность инъекций аллогенных клеток непосредственно в спинномозговую жидкость за ГЭБ. В литературе имеется несколько сообщений о безопасных интратуморальных или внутривентрикулярных введениях аутологичных клеток LAK, сгенерированных *in vitro*, цитотоксических лимфоцитов или взвеси аутологичных мононуклеарных клеток [19, 33, 34, 35, 36]. Опыт внедрения аллогенных иммунокомпетентных клеток весьма ограничен. В литературе имеются единичные сообщения об инъекциях аллогенных донорских лимфоцитов непосредственно в спинномозговую жидкость интратекально или через резервуар Омайо [37, 38]. В общей сложности у четырех пациентов, упоминаемых в этих работах, процедура была безопасной, сопровождалась лишь незначительными побочными эффектами, вероятно, вызванными процедурой люмбальной пункции, а не самим введением клеток. Во всех случаях менингеального рецидива острого и хронического лейкозов была достигнута длительная ремиссия заболевания. В нашем исследовании никаких серьезных побочных эффектов, таких как иммуноопосредованная энцефалопатия или отек головного мозга, не наблюдалось после 121 интратекальной (интравентрикулярной) инъекции размороженных HLA-частичносовместимых, неманипулированных иммунокомпетентных клеток крови от родственного донора. В 7% случаев наблюдались транзиторные побочные эффекты, связанные с проведением спинномозговых пункций. Более того, наш протокол терапии обеспечивал высокое качество жизни пациентов, не имел системной токсичности, не требовал госпитализации в стационар и показал очевидную эффективность в ряде случаев.

К сожалению, механизм действия противоопухолевого эффекта этого терапевтического подхода в ЦНС, и особенно в случае внутримозговых опухолей, остается неясным. Мы можем только предложить некоторые возможные объяснения. Во-первых, донорские аллогенные Т-лимфоциты и НК-клетки могут оказывать прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки в результате распознавания специфических антигенов, а также их функции,

опосредованной KIR-рецепторами, связанными с основным комплексом гистосовместимости класса I. Некоторые данные в литературе о роли NK-клеток в противоопухолевом эффекте при внутричерепных новообразованиях подтверждают эту гипотезу [12, 13, 39]. Во-вторых, когда донорские лимфоциты взаимодействуют с опухолевыми макрофагами и другими опухолевыми стромальными клетками, они повышают проницаемость гематоэнцефалического барьера и обнажают клетки глиомы, делая их доступными для стимуляции реакции собственной иммунной системы пациента, которая была избирательно предварительно активирована аутологичной ДВ.

Заключение

Результаты данного исследования указывают, что проведение специфической противоопухолевой иммунотерапии может являться альтернативным методом лечения у пациентов со злокачественными глиальными опухолями головного мозга. На фоне проводимого лечения увеличилась общая и бессобытийная выживаемость у

пациентов с неоднократными рецидивами опухоли. У 3 из 5 пациентов интервал без прогрессирования составил более 3 лет, а один пациент жив без признаков опухоли более 13 лет. В процессе проведения терапии не наблюдалось каких-либо серьезных осложнений у больных, получающих иммунотерапию. Полученные нами данные показывают, что специфическая иммунотерапия имеет высокий лечебный потенциал и позволяет планировать дальнейшие широкомасштабные исследования в этом направлении с привлечением открытий в области молекулярной биологии и генетики последнего десятилетия.

Вклад авторов

Долгополов И.С. — разработка концепции научной работы, статистическая обработка, составление черновика рукописи, окончательное утверждение публикуемой версии рукописи

Рыков М.Ю. — написание текста, анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания, окончательное утверждение публикуемой версии рукописи.

Список литературы / References

1. Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А.А., Тамаева З.Э., Огородникова Е.В., Жордания К.И., Кадагидзе З.Г., Барышников А.Ю. Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения // Российский биотерапевтический журнал, 2002. Т. 1, № 3. С. 56-59. [Chkadua G.Z., Zabolina T.N., Burkova A.A., Tamaeva Z.E., Ogorodnikova E.V., Jordania I., Kadagidze Z.G., Baryshnikov A.Yu. The adaptation of method of generating monocyte derived human dendritic cells for clinical practice. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2002, Vol. 1, no. 3, pp. 56-59. (In Russ.)]
2. Чкадуа Г.З., Борунова А.А., Шоуа И.Б., Долгополов И.С., Пименов Р.И., Михайлова И.Н., Заботина Т.Н., Барышникова М.А. Криоконсервация дендритных клеток человека для клинического применения // Российский биотерапевтический журнал, 2019. Т. 18, № 4. С. 65-75. [Chkadua G.Z., Borunova A.A., Shoua I.B., Dolgopolov I.S., Pimenov R.I., Mikhailova I.N., Zabolina T.N., Baryshnikova M.A. Cryo preservation of human dendritic cells for clinical USE. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2019, Vol. 18, no. 4, pp. 65-75. (In Russ.)]
3. Almuhausen G., Alhalaseh Y., Mansour R., Abu-Shanab A., Al-Ghnamat S., Al-Hussaini M. Frequency of mismatch repair protein deficiency and PD-L1 in high-grade gliomas in adolescents and young adults (AYA). *Brain Tumor Pathol.*, 2021, Vol. 38, no. 1, pp. 14-22.
4. Ardon H., van Gool S.W., Verschuere T. Integration of autologous dendritic cell-based immunotherapy in the standard of care treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma: results of the HGG-2006 phase I/II trial. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 11, pp. 2033-2044.
5. Auffinger B., Thaci B., Nigam P., Rincon E., Cheng Y., Lesniak M. New therapeutic approaches for malignant glioma: in search of the Rosetta stone. *F1000 Med. Rep.*, 2012, Vol. 4, 18. doi: 10.3410/M4-18.
6. Chung D, Shin H, Hong Y. A New Hope in immunotherapy for malignant gliomas: adoptive T cell transfer therapy. *J. Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2014, 326545. doi: 10.1155/2014/326545.
7. Cui Y., Tha K.K., Terasaka S., Yamaguchi S., Wang J., Kudo K. Prognostic Imaging Biomarkers in Glioblastoma: Development and Independent Validation on the Basis of Multiregion and Quantitative Analysis of MR Images. *Radiology*, 2016, Vol. 278, no. 2, pp. 546-553.
8. Eagles M., Nassiri F., Badhiwala J., Suppiah S., Almenawer S., Zadeh G., Aldape K. Dendritic cell vaccines for high-grade gliomas. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2018, Vol. 14, pp. 1299-1313.
9. Ellingson B.M. Radiogenomics and imaging phenotypes in glioblastoma: novel observations and correlation with molecular characteristics. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 2015, Vol. 15, no. 1, 506. doi: 10.1007/s11910-014-0506-0.

10. Frederico S.C., Hancock J.C., Brettschneider E.E.S., Ratnam N.M., Gilbert M.R., Terabe M. Making a cold tumor hot: the role of vaccines in the treatment of glioblastoma. *Front. Oncol.*, 2021, Vol. 11, 672508. doi: 10.3389/fonc.2021.672508.
11. Han S.J., Zygourakis C., Lim M., Parsa A.T. Immunotherapy for glioma: promises and challenges. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, 2012, Vol. 23, no. 3, pp. 357-370.
12. Hanif F., Muzaffar K., Perveen K., Malhi S.M., Simjee Sh.U. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2017, Vol. 18, no. 1, pp. 3-9.
13. Hayes R.L., Koslow M., Hiesiger E.M. Improved long-term survival after intracavitary interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for adults with recurrent malignant glioma. *J. Cancer*, 1995, Vol. 76, no. 5, pp. 840-852.
14. Jacobs S.K., Wilson D.J., Kornblith P.L., Grimm E.A. Interleukin-2 or autologous lymphokine-activated killer cell treatment of malignant glioma: phase I trial. *Cancer Res.*, 1986, Vol. 46, pp. 2101-2104.
15. Jordan J.T., Sun W., Hussain S.F., DeAngulo G., Prabhu S.S., Heimberger A.B. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2008, Vol. 57, no. 1, pp. 123-131.
16. Kang X., Zheng Y., Hong W., Chen X., Li H., Huang B., Huang Z., Tang H., Geng W. Recent advances in immune cell therapy for glioblastoma. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 544563. doi: 10.3389/fimmu.2020.544563.
17. Kitahara T., Watanabe O., Yamaura A., Makino H., Watanabe T., Suzuki G., Okumura K. Establishment of interleukin 2 dependent cytotoxic T lymphocyte cell line specific for autologous brain tumor and its intracranial administration for therapy of the tumor. *J. Neurooncol.*, 1987, Vol. 4, no. 4, pp. 329-336.
18. Kmiecik J., Zimmer J., Chekenya M. Natural killer cells in intracranial neoplasms: presence and therapeutic efficacy against brain tumours. *J. Neurooncol.*, 2014, Vol. 116, pp. 1-9.
19. Liao L.M., Ashkan K., Tran D.D., Campian J.L., Trusheim J.E., Cobbs C.S. First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *J. Transl. Med.*, 2018, Vol. 16, no. 1, 142. doi: 10.1186/s12967-018-1507-6.
20. Lillehei K.O., Mitchell D.H., Johnson S.D., McCleary E.L., Kruse C.A. Long-term follow-up of patients with recurrent malignant gliomas treated with adjuvant adoptive immunotherapy. *Neurosurgery*, 1991, Vol. 28, no. 1, pp. 16-23.
21. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.*, 2016, Vol. 131, no. 6, pp. 803-820.
22. Meuleman N., Ahmad I., Duveillier H. Intrathecal donor lymphocyte infusion for the treatment of suspected refractory lymphomatous meningitis: a case report. *Eur. J. Haematol.*, 2006, Vol. 77, pp. 523-526.
23. Neumann M., Blaw I.W., Burmeister T. Intrathecal application of donor lymphocytes in leukemic meningeosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann. Hematol.*, 2011, Vol. 90, no. 8, pp. 911-916.
24. Ostrom Q.T., Cioffi G., Gittleman H., Patil N., Waite K., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol.*, 2019, Vol. 21, Suppl, 5, pp. v1-v100.
25. Pellegatta S., Eoli M., Cuccarini V., Anghileri E., Pollo B., Pessina S. Survival gain in glioblastoma patients treated with dendritic cell immunotherapy is associated with increased NK but not CD8⁺ T cell activation in the presence of adjuvant temozolomide. *Oncoimmunology*. 2018, Vol. 7, no. 4, e1412901. doi: 10.1080/2162402X.2017.1412901.
26. Poon C., Sarkar S., Yong V., Kelly J. Glioblastoma-associated microglia and macrophages: targets for therapies to improve prognosis. *Brain*, 2017, Vol. 140, no. 6, pp. 1548-1560.
27. Quattrocchi K.B., Miller C.H., Cush S. Pilot study of local autologous tumor infiltrating lymphocytes for the treatment of recurrent malignant gliomas. *J. Neurooncol.*, 1999, Vol. 45, no. 2, pp. 141-157.
28. Rolle C., Sengupta S., Lesniak M. Challenges in clinical design of immunotherapy trials for malignant glioma. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, 2010, Vol. 21, no. 1, pp. 201-214.
29. Ruggeri L., Capanni M., Urbani F. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 2002, Vol. 295, pp. 2097-2100.
30. Stummer W., Reulen H.J., Meinel T., Pichlmeier U., Schumacher W., Tonn J.C. ALA-Glioma Study Group. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*, 2008, Vol. 62, no. 3, pp. 564-576; discussion 564-576.
31. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.*, 2005, Vol. 352, pp. 987-996.
32. Thakkar J.P., Dolecek T.A., Horbinski C., Ostrom Q.T., Lightner D.D., Barnholtz-Sloan J.S., Villano J.L. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2014, Vol. 23, no. 10, pp. 1985-1996.

33. Vik-Mo E.O., Nyakas M., Mikkelsen B.V., Moe M.C., Due-Tønnesen P., Suso E.M. Therapeutic vaccination against autologous cancer stem cells with mRNA-transfected dendritic cells in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013, Vol. 62, no. 9, pp. 1499-1509.
34. Wheeler C.J., Black K.L., Liu G., Mazer M., Zhang X.X., Pepkowitz S. Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients. *Cancer Res.*, 2008, Vol. 68, no. 14, pp. 5955-5964.
35. Willem C., Makanga D.R., Guillaume T., Maniangu B., Legrand N., Gagne K. Impact of KIR/HLA incompatibilities on NK cell reconstitution and clinical outcome after T cell-replete haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with posttransplant cyclophosphamide. *J. Immunol.*, 2019, Vol. 202, no. 7, pp. 2141-2152.
36. Witthayanuwat S., Pesee M., Supaadirek C., Supakalin N., Thamronganantasakul K., Krusun S. Survival analysis of glioblastoma multiforme. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2018, Vol. 19, no. 9, pp. 2613-2617.
37. Yamanaka R., Homma J., Yajima N., Tsuchiya N., Sano M., Kobayashi T. Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: Results of a clinical phase I/II trial. *Clin. Cancer Res.*, 2005, Vol. 11, pp. 4160-4167.
38. Zagzag D., Salnikow K., Chiriboga L., Yee H., Lan L., Ali M.A. Downregulation of major histocompatibility complex antigens in invading glioma cells: stealth invasion of the brain. *Lab. Invest.*, 2005, Vol. 85, no. 3, pp. 328-341.
39. Zakerinia M., Kamgarpour A., Nemati H., Zare H., Ghasemfar M., Rezvani A., Karimi M. Intrathecal autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell therapy in neurological diseases. *Int. J. Organ Transplant. Med.*, 2018, Vol. 9, no. 4, pp. 157-167.

Авторы:

Долгополов И.С. — д.м.н., заведующий кафедрой педиатрии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заместитель главного врача по лечебной работе ГБУЗ Тверской области «Детская областная клиническая больница», г. Тверь, Россия

Рыков М.Ю. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой педиатрии ФГБОУ ВО «Российский государственный социальный университет», Москва, Россия

Authors:

Dolgopolov I.S., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Pediatrics, Pediatric Faculty, Tver State Medical University; Deputy Chief Physician for Medical Work, Children's Regional Clinical Hospital, Tver, Russian Federation

Rykov M.Yu., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Pediatrics, Russian State Social University, Moscow, Russian Federation

Поступила 08.02.2024
Принята к печати 13.03.2024

Received 08.02.2024
Accepted 13.03.2024

ВЫСОКОГОРНАЯ СПЕЛЕОТЕРАПИЯ В ЛЕЧЕНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Иванова О.Н., Иванова И.С.

ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

Резюме. Данная статья посвящена актуальной проблеме – изучению эффективности спелеотерапии у пациентов с бронхиальной астмой. Целью исследования явилось изучение эффективности лечения спелеотерапией в группе больных с бронхиальной астмой.

Проведено наблюдение над 51 пациентом с бронхиальной астмой (БА) в возрасте от 18 до 50 лет, которые получили курс лечения на базе частного центра «Солевик» города Якутска в отделении алергологии и иммунологии. Всем обследованным пациентам был поставлен диагноз «бронхиальная астма, атопическая форма, средней степени тяжести». Все пациенты получали базисную терапию: препараты «Симбикорт» и «Серетид» и находились на диспансерном учете у терапевта, пульмонолога и аллерголога. Все пациенты были осмотрены до и после курса лечения специалистами: терапевтом, аллергологом-иммунологом и пульмонологом. Всем пациентам до и после лечения было проведено исследование: общий анализ крови и уровень общего сывороточного иммуноглобулина Е. При осмотре пациентов после курса спелеотерапии было выявлено исчезновение и уменьшение приступов бронхиальной астмы (до 1 приступа в месяц) у 80% обследованных. Всем пациентам до и после спелеотерапии проводился общий анализ крови. Был проведен анализ уровня эозинофилов у пациентов до и после курса спелеотерапии. Так, средний уровень содержания эозинофилов до курса спелеотерапии был $12 \pm 0,4\%$, после курса спелеотерапии уровень снизился до $5,5 \pm 0,2\%$. Всем пациентам до и после спелеотерапии проводилось исследование общего иммуноглобулина Е. Были выявлены следующие результаты: у пациентов до терапии средний уровень показателя составил $500 \pm 0,8$ Ед/мл, после проведенной терапии показатель снизился до $80 \pm 0,3$ Ед/мл.

Спелеотерапия оказывает положительное влияние на течение бронхиальной астмы и достоверно повышает эффективность лечения больных.

Ключевые слова: спелеотерапия, бронхиальная астма, пациент, эффективность, лечение, поликлиника

Адрес для переписки:

Иванова Ольга Николаевна
ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный
университет имени М.К. Аммосова»
677018, Россия, Республика Саха (Якутия),
г. Якутск, ул. Крупской, 37.
Тел.: 8 (914) 290-61-25.
E-mail: olgadoctor@list.ru

Address for correspondence:

Olga N. Ivanova
M. Ammosov Northeastern Federal University
37 Krupskaya St
Yakutsk
Republic of Sakha (Yakutia)
677018 Russian Federation
Phone: +7 (914) 290-61-25.
E-mail: olgadoctor@list.ru

Образец цитирования:

О.Н. Иванова, И.С. Иванова «Высокогорная
спелеотерапия в лечении бронхиальной астмы»
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,
№ 1. С. 95-100.
doi: 10.46235/1028-7221-13539-HAS

© Иванова О.Н., Иванова И.С., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.N. Ivanova, I.S. Ivanova "High-altitude speleotherapy
in the treatment of bronchial asthma", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024,
Vol. 27, no. 1, pp. 95-100.
doi: 10.46235/1028-7221-13539-HAS

© Ivanova O.N., Ivanova I.S., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-13539-HAS

HIGH-ALTITUDE SPELEOTHERAPY IN THE TREATMENT OF BRONCHIAL ASTHMA

Ivanova O.N., Ivanova I.S.

M. Ammosov Northeastern Federal University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation

Abstract. The present study concerns clinical effects of speleotherapy in bronchial asthma. The aim of our work was to study the efficiency of speleotherapy in a group of patients with bronchial asthma. We observed a group of 51 patients with bronchial asthma (BA) aged 18 to 50 years, who received a course of treatment at the private center "Solevik" (Yakutsk City), carried out at the Department of Allergology and Immunology. All the examined patients were diagnosed with atopic bronchial asthma, of moderate severity. Basic therapy in all cases included Symbicort and Seretide treatment. The patients were managed and monitored before and after the course of treatment by a therapist, pulmonologist and allergologist-immunologist at the outpatient center. Laboratory parameters included general blood tests and the levels of total serum IgE. Examination of patients after a course of speleotherapy revealed disappearance and reduction of asthma attacks (up to 1 attack per month) in 80% of the examined. General blood testing before and after speleotherapy showed decreased levels of blood eosinophils after the course of treatment. I.e., the average initial level of blood eosinophils before treatment was $12 \pm 0.4\%$, being decreased after the course of speleotherapy to $5.5 \pm 0.2\%$. Measurements of total IgE before and after speleotherapy revealed the following results: in patients before therapy, the average level of this index was 500 ± 0.8 units/mL. After a course of speleotherapy, this parameter decreased to 80 ± 0.3 units/mL.

Speleotherapy shows a positive effect on the clinical course of the patients with bronchial asthma and significantly increases the efficiency of treatment.

Keywords: speleotherapy, bronchial asthma, patient, efficiency, treatment, polyclinic

Введение

Спелеотерапия является эффективным методом лечения с использованием природных факторов. Суть метода заключается в лечении длительным пребыванием в условиях своеобразного микроклимата пещер, гротов, соляных копей, шахт. Спелеотерапия применяется в лечении пациентов с бронхиальной астмой, хроническим бронхитом, системными заболеваниями и т. д. [1, 3, 4, 5]. Курс лечения составляет 20-25 процедур [1, 3, 4, 5]. В городе Якутске в настоящее время действует три лечебно-оздоровительных центра с применением спелеотерапии: частные центры «Солевик» и «Космо-соль», а также комната, оборудованная для спелеотерапии, имеется в первой муниципальной поликлинике города Якутска [2, 4, 6, 7]. В данных медико-профилактических учреждениях пациенты проходят курс спелеотерапии из 25-30 процедур по 30 минут. Терапия проводится в удобное для пациентов время. Пациент во время спелеотерапии принимает удобную позу в мягком кресле, звучит приятная музыка, которая помогает боль-

ному забыть на время о повседневных заботах и проблемах. Применение спелеотерапии является наиболее физиологичным методом лечения бронхиальной астмы, изучение данного метода является актуальным вопросом современной терапии [2, 4, 6, 7].

Цель исследования – изучить эффективность лечения спелеотерапией в группе больных с бронхиальной астмой.

Материалы и методы

Проведено наблюдение над 51 пациентом с бронхиальной астмой (БА) в возрасте от 18 до 50 лет. Критерии соответствия: больные отобраны методом сплошной выборки, нерандомизированное исследование. Далее пациенты были разделены на обследуемую группу (25 пациентов) и контрольную группу (25 пациентов). Все пациенты обследуемой группы получали базисную терапию: препараты «Симбикорт» и «Серетид» и находились на диспансерном учете у терапевта, пульмонолога и аллерголога. Группа обследуемых больных получала сеансы спелеотерапии 3 раза

в неделю по 30 минут в течение одного месяца. Пациенты контрольной группы получали только базисную терапию без спелеотерапии.

Все пациенты были осмотрены до и после курса лечения специалистами: терапевтом, аллергологом-иммунологом и пульмонологом в частной клинике «Аврора». Всем пациентам до и после лечения было проведено исследование: общий анализ крови и уровень общего сывороточного иммуноглобулина Е и спирометрия, уровень сывороточных иммуноглобулинов. После лечения определены средние показатели в каждой из групп. При проведении статистического анализа использовали SPSS. Достоверность математических результатов определяли с помощью программы SPSS.

Результаты

Всем обследованным пациентам был поставлен диагноз «бронхиальная астма, атопическая форма, средней степени тяжести, персистирующее течение».

Пациентам назначен курс спелеотерапии: 3 сеанса в неделю по 30 мин в день в течение одного месяца. Через месяц обследуемые были осмотрены терапевтом, пульмонологом и аллергологом-иммунологом и проведено повторное обследование. Один курс составил от 10 до 25

сеансов продолжительностью от 10 до 60 минут. Первый раз время минимальное и увеличивалось с каждым посещением. В качестве поддерживающей терапии практиковалось дополнительное нахождение в «пещере» 2 раза в месяц. Для достижения максимального эффекта рекомендовали пациентам расслабиться, принять удобную позу, дышать медленно и размеренно [3]. При осмотре после курса спелеотерапии у пациентов обследуемой группы было выявлено исчезновение и уменьшение приступов бронхиальной астмы (до 1 приступа в месяц) у 80% пациентов, у 70% лиц прекратился кашель, переносимость физической нагрузки улучшилась у всех пациентов (100%). Сами пациенты указывали на улучшение самочувствия (100%), улучшение сна (80%). У пациентов контрольной группы (пациенты, получающие базисную терапию без спелеотерапии) были выявлены следующие результаты: у 60% прекратился кашель, переносимость физической нагрузки у 80%, уменьшение приступов бронхиальной астмы у 60% обследованных.

Всем пациентам проводилось исследование общего иммуноглобулина Е. Были выявлены следующие результаты: у пациентов до терапии средний уровень показателя составил $500 \pm 0,8$ Ед/мл, после проведенной терапии (базисная терапия + спелеотерапия) показатель снизился до $80 \pm 0,3$ Ед/мл. Средней уровень им-

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ИММУНОГЛОБУЛИНА Е У ПАЦИЕНТОВ КОНТРОЛЬНОЙ И ОБСЛЕДУЕМОЙ ГРУПП ПОСЛЕ КУРСА СПЕЛЕОТЕРАПИИ

TABLE 1. DYNAMICS OF CHANGES IN THE CONTENT OF IMMUNOGLOBULIN E AND PERIPHERAL BLOOD EOSINOPHILS IN PATIENTS BEFORE AND AFTER SPELEOTHERAPY

	До лечения Before treatment	После лечения в обследуемой группе After treatment in the study group	После лечения в контрольной группе After treatment in the control group	p
Уровень общего содержания иммуноглобулина Е Level of total immunoglobulin E	$500,0 \pm 0,8$ Ед/мл 500.0 ± 0.8 units/mL	$80,0 \pm 0,3$ Ед/мл* 80.0 ± 0.3 units/mL*	$120,0 \pm 0,5$ Ед/мл 120.0 ± 0.5 units/mL	* < 0,05
Уровень эозинофилов в периферической крови Level of eosinophils in peripheral blood	12,0 ± 0,4%	5,5 ± 0,2*	6,50 ± 0,21	* < 0,05

Примечание. p – достоверность различий показателей между группами пациентов до и после терапии рассчитана согласно непараметрическому критерию Вилкоксона, различия считаются достоверными и статистически значимыми при $p < 0,05$.

Note. p, significance of differences in indicators between groups of patients before and after therapy is calculated according to the non-parametric Wilcoxon test, the differences are considered reliable and statistically significant when $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИИ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ У БОЛЬНЫХ БА ПОСЛЕ КУРСА СПЕЛЕОТЕРАПИИ

TABLE 2. DYNAMICS OF CHANGES IN INDICATORS OF EXTERNAL RESPIRATION FUNCTION IN BA PATIENTS AFTER A COURSE OF SPELEOTHERAPY

Наименование показателя Name of the indicator	Сроки исследования Terms of the study	Название группы Group name		p
		Больные обследуемой группы Patients of the examined	Больные контрольной группы Patients of the control group	
ЖЕЛ ZHEL	До лечения Before treatment	3,1±0,1	3,1±0,1	* < 0,05
	После лечения After treatment	3,60±0,02*	3,26±0,01	
ОФВ1 OFV1	До лечения Before treatment	1,88±0,03	1,88±0,03	* < 0,05
	После лечения After treatment	3,11±0,05*	3,01±0,01	
МОС 25 MOS 25	До лечения Before treatment	3,12±0,02	3,12±0,02	* < 0,05
	После лечения After treatment	3,98±0,02*	3,41±0,03	
МОС 50 MOS 50	До лечения Before treatment	2,23±0,03	2,23±0,03	* < 0,05
	После лечения After treatment	3,90±0,03*	3,60±0,01	
МОС 75 MOS 75	До лечения Before treatment	1,24±0,04	1,24±0,04	* < 0,05
	После лечения After treatment	2,70±0,01*	2,30±0,02	

Примечание. См, примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БА ПОСЛЕ КУРСА СПЕЛЕОТЕРАПИИ

TABLE 3. DYNAMICS OF CHANGES IN BLOOD IMMUNOGLOBULIN INDICES IN BA PATIENTS AFTER A COURSE OF SPELEOTHERAPY

Наименование показателя Name of the indicator	До терапии Before therapy (M±m)	После терапии обследуемой группы After therapy of the examined group (M±m)	После терапии контрольной группы After therapy of the control group (M±m)	Референсный интервал Reference interval	Достоверность Reliability
IgA	0,18±0,03	1,43±0,02	1,20±0,01	0,21-2,82 г/л 0.21-2.82 g/L	< 0,05
IgG	0,67±0,04	1,67±0,01	1,30±0,02	0,47-2,40 мг/мл 0.47-2.40 mg/mL	< 0,05
IgM	7,80±0,02	12,20±0,03	10,00±0,03	4,83-12,26 мг/мл 4.83-12.26 mg/mL	< 0,05

муноглобулина у пациентов контрольной группы после курса базисной терапии выявил уровень $120 \pm 0,5$ Ед/мл. Данные свидетельствуют о снижении сенсибилизации организма пациентов после комбинированного курса базисной терапии и спелеотерапии. Всем пациентам проводился общий анализ крови. Так, средний уровень содержания эозинофилов до курса спелеотерапии был $12 \pm 0,4\%$, после курса комбинированной терапии: базисная терапия и спелеотерапия уровень снизился до $5,5 \pm 0,2$. У пациентов контрольной группы уровень содержания эозинофилов снизился до $6,5 \pm 0,21$.

Анализ результатов после лечения показал следующее: достоверно увеличился объем жизненной емкости легких (ЖЕЛ), объем форсированного выдоха 1 (ОФВ1), максимальная объемная скорость экспираторного потока (МОС) у пациентов после курса спелеотерапии (табл. 1). Данные показатели свидетельствуют об улучшении функции внешнего дыхания у пациентов после комбинированного курса: базисной терапии и спелеотерапии.

Всем пациентам было проведено изучение уровня иммуноглобулинов крови – IgA, IgG, IgM (табл. 2). Как видно из таблицы 2, наибольшие изменения уровня иммуноглобулинов наблюда-

ются у пациентов обследуемой группы: спелеотерапия и базисная терапия.

Данное исследование может свидетельствовать об улучшении адаптационных механизмов и нормализации показателей иммунной системы у пациентов после курса спелеотерапии (табл. 3).

Таким образом, микроклимат соляных пещер благотворно влияет на сердечно-сосудистую систему; прохождение курса спелеотерапии способствует повышению иммунитета; нахождение в пещерах оказывает успокаивающее действие на нервную систему, снижается агрессивность и уровень тревожности; нахождение в соляных пещерах способствует разжижению мокроты и ее выведению, а также очищению всей дыхательной системы, включая бронхиолы.

Выводы

1. Изучив свойства саногенного эффекта спелеотерапии, можно сделать вывод, что следует внести эту процедуру в качестве дополнительного лечения для больных БА.

2. Спелеотерапия активизирует ослабленные компенсаторные и защитные механизмы больного, что способствует восстановлению гомеостаза организма в нормальное состояние.

Список литературы / References

1. Абдумаликова И.А., Захаров Г.А., Шидаков Ю.Х.-М. Механизмы лечебного эффекта высокогорной спелеотерапии при бронхиальной астме // Клиническая патофизиология, 2013. № 1-3. С. 76-79. [Abdumalikova I.A., Zakharov G.A., Shidakov Yu.Kh.-M. Mechanisms of the therapeutic effect of high-altitude speleotherapy for bronchial asthma. *Klinicheskaya patofiziologiya = Clinical Pathophysiology*, 2013, no. 1-3, pp. 76-79. (In Russ.)]
2. Вишневецкая Н.Л. Спелеотерапия в оздоровлении промышленных рабочих // Успехи современного естествознания, 2007. № 10. С. 126-127. [Vishnevskaya N.L. Speleotherapy in the rehabilitation of industrial workers. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya = Successes of Modern Natural Science*, 2007, no. 10, pp. 126-127. (In Russ.)]
3. Восканян А.Г., Восканян А.А. Спелео-терапевтическая рекреация – нетрадиционный метод лечения бронхиальной астмы и других респираторных аллергозов // Международный журнал экспериментального образования, 2015. № 10-1. С. 8-12. [Voskanyan A.G., Voskanyan A.A. Speleo-therapeutic recreation is an unconventional method of treatment of bronchial asthma and other respiratory allergoses. *Mezhdunarodnyy zhurnal eksperimentalnogo obrazovaniya = International Journal of Experimental Education*, 2015, no. 10-1, pp. 8-12. (In Russ.)]
4. Гринченков Д.В., Косяченко Г.Е., Мохов В.А., Тишкевич Г.И., Левченко П.А. Анализ аспектов развития системы наземного спелеолечения // Современные проблемы науки и образования, 2015. № 5. С. 16-20. [Grinchenkov D.V., Kosyachenko G.E., Mokhov V.A., Tishkevich G.I., Levchenko P.A. Analysis of development aspects of ground speleo treatment. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2015, no. 5, pp. 16-20. (In Russ.)]

5. Шидаков Ю. Х-М., Абдумаликова И.А., Захаров Г.А. Механизмы саногенного эффекта высокогорной спелеотерапии бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких // Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета, 2014. Т. 14, № 1. С. 202-205. [Shidakov Yu. X-M., Abdumalikova I.A., Zakharov G.A. Mechanisms of the sanogenic effect of high-altitude speleotherapy of bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Vestnik Kyrgyzsko-Rossiyskogo Slavyanskogo universiteta = Bulletin of the Kyrgyz-Russian Slavic University*, 2014, Vol. 14, no. 1, pp. 202-205. (In Russ.)]

Авторы:

Иванова О.Н. — д.м.н., главный внештатный аллерголог-иммунолог Министерства здравоохранения Республики Саха (Якутия), профессор кафедры педиатрии и детской хирургии, Медицинский институт ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

Иванова И.С. — студентка 3-го курса ЛД, Медицинский институт ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

Authors:

Ivanova O.N., PhD, MD (Medicine), Mainly Freelance Allergist-Immunologist of the Ministry of Health of the Republic of Sakha (Yakutia), Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Surgery, Medical Institute, M. Ammosov Northeastern Federal University, Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation

Ivanova I.S., 3rd year Student, Medical Institute, M. Ammosov Northeastern Federal University, Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023

ВЗАИМОСВЯЗЬ БИОМАРКЕРОВ И АГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ НА ФОНЕ СЕРОВОДОРОДА У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Трубачева О.А.¹, Гусакова А.М.², Шнайдер О.Л.², Бирулина Ю.Г.¹,
Чумакова С.П.¹, Петрова И.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Томск, Россия

² Научно-исследовательский институт кардиологии – филиал ФГБНУ «Томский национальный
исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Резюме. Исследование биологической значимости сероводорода (H₂S) в регуляции функций тромбоцитов и в развитии тромбоза проводятся, но нет единого мнения о роли сероводорода в этих процессах. Тромбоциты очень чувствительны к различным медиаторам, высвобождающимся из сосудов и клеток крови. Множественные провоспалительные молекулы могут оказывать непосредственное влияние на состояние сердечно-сосудистой системы. Так, дисбаланс продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов повышает риск тромбообразования и может приводить к эндотелиальной дисфункции, нестабильности и разрыву атеросклеротической бляшек.

Целью исследования являлось определить концентрации и выявить взаимосвязь биомаркеров (LIGHT, PIGF, IFN α 2, TNF α β , IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17F, MIP-1 α , CXCL16) с показателями коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов на фоне действия сероводорода у пациентов с ишемической болезнью сердца.

Проведено одномоментное простое сравнительное исследование. В исследование включено 22 пациента с ишемической болезнью сердца (ИБС). Уровень биомаркеров определяли методом мультиплексного анализа (xMAP-технология). Агрегационную активность тромбоцитов исследовали турбодиметрическим методом. Все образцы исследовали на фоне 30 минутной преинкубации с сероводородом, с добавлением индуктора агрегации коллагена в концентрации 2 мкмоль/л. В качестве донора сероводорода использовали гидросульфид натрия в концентрации 10⁻⁶ М. Результаты сравнительного и корреляционного анализа считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Пациенты были разделены на две группы: 1-я группа (n = 10) – степень агрегации или размер агрегатов снижались на фоне преинкубации с сероводородом и 2-я группа (n = 12) – преинкубация

Адрес для переписки:

Трубачева Оксана Александровна
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2.
Тел.: 8 (909) 544-99-16.
E-mail: otrubacheva@inbox.ru

Address for correspondence:

Oksana A. Trubacheva
Siberian State Medical University
2 Moskovsky tract
Tomsk
634050 Russian Federation
Phone: +7 (909) 544-99-16.
E-mail: otrubacheva@inbox.ru

Образец цитирования:

О.А. Трубачева, А.М. Гусакова, О.Л. Шнайдер,
Ю.Г. Бирулина, С.П. Чумакова, И.В. Петрова
«Взаимосвязь биомаркеров и агрегационной
активности тромбоцитов на фоне сероводорода
у пациентов с ишемической болезнью сердца»
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,
№ 1. С. 101-108.
doi: 10.46235/1028-7221-16577-RBB

© Трубачева О.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.A. Trubacheva, A.M. Guskova, O.L. Schneider,
Yu.G. Birulina, S.P. Chumakova, I.V. Petrova “Relationship
between biomarkers and platelet aggregation activity in
presence of hydrogen sulfide in patients with coronary
heart disease”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 1, pp. 101-108.
doi: 10.46235/1028-7221-16577-RBB

© Trubacheva O.A. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16577-RBB

с сероводородом приводила к увеличению степени или размеров агрегатов. Концентрации лиганда фактора некроза опухоли (LIGHT), интерферона $IFN\alpha 2$, интерлейкинов IL-3, IL-8, IL-15, IL-17F, хемокина CCL3/MIP-1 α были значимо повышены во 2-й группе пациентов, у которых коллаген-индуцированная агрегация увеличивалась на фоне преинкубации с сероводородом, по сравнению с пациентами 1-й группы. Проведенный корреляционный анализ выявил, что в 1-й группе пациентов обнаружены положительные корреляционные связи между концентрациями MIP-1 α ($R_s = 0,56$, $p = 0,03$; $R_s = 0,69$, $p = 0,01$), IL-5 ($R_s = 0,83$, $p = 0,01$; $R_s = 0,73$, $p = 0,01$) и IL-8 ($R_s = 0,60$, $p = 0,02$; $R_s = 0,95$, $p = 0,01$) соответственно, как с размером агрегатов, так и с показателем степени агрегации тромбоцитов. Кроме того, выявлены корреляционные связи размера агрегатов с концентрацией IL-6 ($R_s = 0,53$, $p = 0,04$). Во 2-й группе пациентов выявлены корреляционные связи с размером агрегатов и PIGF ($R_s = 0,59$, $p = 0,04$) и с CXCL16 как с размером агрегатов ($R_s = 0,58$, $p = 0,04$), так и со степенью агрегации ($R_s = 0,65$, $p = 0,04$). Таким образом, установлено, что у 2-й группы пациентов с ишемической болезнью сердца с повышением коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов, на фоне преинкубации с сероводородом, выявляются более высокие концентрации биомаркеров воспаления ($IFN\alpha 2$, IL-3, IL-8, IL-15, IL-17F, MIP-1 α). Вероятно, именно более выраженный провоспалительный статус в данной группе пациентов приводит к инертности тромбоцитов в отношении ингибирующего действия сероводорода. В 1-й же группе пациентов выявлены множественные корреляции параметров агрегации с показателями маркеров воспаления (IL-5, IL-6, IL-8, MIP-1 α), что может обуславливать использование различной коррекционной терапии для пациентов этих групп.

Ключевые слова: биомаркеры, агрегация, тромбоцит, сероводород, ишемическая болезнь сердца

RELATIONSHIP BETWEEN BIOMARKERS AND PLATELET AGGREGATION ACTIVITY IN PRESENCE OF HYDROGEN SULFIDE IN PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE

Trubacheva O.A.^a, Gusakova A.M.^b, Schneider O.L.^b, Birulina Yu.G.^a, Chumakova S.P.^a, Petrova I.V.^a

^a Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

^b Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Biological significance of hydrogen sulfide (H_2S) in regulation of platelet functions and in development of thrombosis is being studied, but there is no consensus on the role of H_2S in these physiological processes. The platelets are very sensitive to various mediators released from blood vessels and blood cells. Multiple pro-inflammatory molecules may exert direct effects on the state of cardiovascular system. Thus, an imbalance in the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines increases the risk of thrombosis, and it can lead to endothelial dysfunction, instability and rupture of atherosclerotic plaques. The aim of our study was to determine concentrations and identify the relationships between certain biomarkers (LIGHT, PIGF, $IFN\alpha 2$, $TNF\alpha\beta$, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17F, MIP-1 α , CXCL16) and collagen-induced platelet aggregation in presence of hydrogen sulfide exposure in patients with coronary heart disease. We performed a simple one-step comparative study which included 22 patients with coronary artery disease (CHD). The level of biomarkers was determined by multiplex analysis (xMAP technology). Platelet aggregation activity was studied by the turbidimetric assay. All samples were examined against the background of a 30-min pre-incubation with hydrogen sulfide, with the addition of an aggregation inducer (collagen, 2 mmol/L). Sodium hydrosulfide at a concentration of 10^{-6} M was used as a hydrogen sulfide donor. The results of comparative and correlation analysis were considered reliable at a statistical significance level of $p < 0.05$. The patients were divided into two groups, i.e., group 1 ($n = 10$) showed a reduced aggregation or a decreased size of aggregates against the background of preincubation with H_2S . In group 2 ($n = 12$), preincubation with H_2S was followed by increased degree or size of platelet aggregates. The concentrations of tumor necrosis factor ligand (LIGHT), interferon $IFN\alpha 2$, interleukins IL-3, IL-8, IL-15, IL-17F, chemokine CCL3/MIP-1 α were significantly increased in group 2 patients, where collagen-induced platelet aggregation increased upon preincubation H_2S , as compared

with patients in group 1. The correlation analysis revealed positive correlations found that in the 1st group of patients between the concentrations of MIP-1a ($R_s = 0.56$, $p = 0.03$; $R_s = 0.69$, $p = 0.01$), IL-5 ($R_s = 0.83$, $p = 0.01$; $R_s = 0.73$, $p = 0.01$), and IL-8 ($R_s = 0.60$, $p = 0.02$; $R_s = 0.95$, $p = 0.01$), respectively, and with both size of aggregates and the index of the platelet aggregation degree. Moreover, distinct correlations between the aggregate size and the concentration of IL-6 ($R_s = 0.53$, $p = 0.04$) were revealed. In the 2nd group of patients, correlations were found with the size of aggregates and PIGF ($R_s = 0.59$, $p = 0.04$), and between CXCL16 values and the size of aggregates ($R_s = 0.58$, $p = 0.04$), like as with the degree of aggregation ($R_s = 0.65$, $p = 0.04$). Thus, we have found that, in 2 groups of patients with coronary heart disease with increased collagen-induced platelet aggregation, preincubated with H₂S, higher concentrations of inflammatory biomarkers (IFN α 2, IL-3, IL-8, IL-15, IL-17F, MIP-1 α) were detected. One may suggest that the more pronounced proinflammatory state in this group of patients may cause platelet resistance to inhibitory effect of hydrogen sulfide. In the 1st group of patients, we revealed multiple correlations of aggregation parameters with values of inflammatory markers (IL-5, IL-6, IL-8, MIP-1 α), which may be a pre-requisite for different corrective therapies for the patients of these groups.

Keywords: biomarkers, aggregation, platelets, hydrogen sulfide, coronary heart disease

Введение

Хроническое субклиническое воспаление сопровождается некоторыми из наиболее распространенных и изнуряющих заболеваний человека, таких как сердечно-сосудистые заболевания и атеросклероз [4]. Исследование биологической значимости сероводорода (H₂S) в регуляции функций тромбоцитов и в развитии тромбоза проводятся, но нет единого мнения о роли сероводорода в этих процессах. Тромбоциты очень чувствительны к различным медиаторам, высвобождающимся из сосудов и клеток крови, в частности к цитокинам. Цитокины продуцируются различными клетками организма и являются факторами взаимодействия между клетками всех органов и систем [6]. Считается доказанным, что риск развития как собственно острого коронарного события, так и его осложнений, опосредован дисбалансом между про- и противовоспалительными цитокинами [12]. Продуктами тромбоцитов, относящимися к семейству цитокинов и их рецепторов, признаны лиганды и рецепторы суперсемейства фактора некроза опухоли TNF и LIGHT, интерлейкин IL-8 и растворимый рецептор IL-6 [6, 7]. Множественные провоспалительные молекулы могут оказывать непосредственное влияние на состояние сердечно-сосудистой системы. Так, дисбаланс продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов повышает риск тромбообразования и может приводить к эндотелиальной дисфункции, нестабильности и разрыву атеросклеротической бляшки [6, 7, 8, 12]. Перспективным направлением в этом отношении является изучение антиагрегационной активности H₂S.

Цель – определить концентрации и выявить взаимосвязь биомаркеров (LIGHT, PIGF, IFN α 2, TNF α и β , IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17F, MIP-1 α , CXCL16) с показателями коллаген-ин-

дуцированной агрегации тромбоцитов на фоне действия H₂S у пациентов с ишемической болезнью сердца.

Материалы и методы

Проведено одномоментное простое сравнительное исследование. В исследование включено 22 пациента с ишемической болезнью сердца (ИБС). Набор пациентов проводился в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. В исследование включены пациенты в возрасте от 43 до 70 лет. Все обследованные пациенты получали комбинированную базисную терапию в соответствии с рекомендациями для лечения ИБС. Критерии включения в исследование: стабильная форма ИБС и непрерывный прием антиагрегационной терапии в течение 6 месяцев (кардиомагнил, 75 мг). Критерии исключения из исследования: сочетанная антиагрегантная терапия, острые сосудистые осложнения давностью менее 6 месяцев; тяжелая сопутствующая патология; клинические и лабораторные признаки острого воспаления; отказ от участия в исследовании. Для выделения суспензии тромбоцитов периферическую кровь пациентов, стабилизированную 3,8% цитратом натрия в соотношении 6:1, центрифугировали при скорости 1700 об/мин в течение 7 мин при комнатной температуре. Определение параметров коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов проводили методом Борна Г. в модификации Габбасова З.А. на двухканальном лазерном анализаторе (220 LA «НПФ Биола», Россия). Все образцы исследовали на фоне 30-минутной прединкубации с сероводородом, с добавлением индуктора агрегации коллагена в концентрации 2 мкмоль/л. В качестве донора сероводорода использовали гидросульфид натрия (NaHS) в концентрации 10⁻⁶ М. О степени агрегации тромбоцитов (%) судили по

максимальной величине светопропускания, а о размере агрегата – по кривой среднего размера агрегатов (отн. ед.). Образцы плазмы крови хранили при -40°C . Исследование по определению концентрации биомаркеров проходило методом мультиплексного иммуноанализа (FLEXMAP 3D на платформе Luminex Corporation, США) с использованием панели Human Cytokine Growth Factor Panel A (48 аналитов) (Merck KGaA, Германия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием статистических пакетов SPSS (версия 19), STATISTICA 10.0. Для оценки распределения количественных признаков был использован критерий Шапиро–Уилка. Статистическую значимость различий для двух независимых выборок оценивали с использованием U-критерия Манна–Уитни. Для сравнения с заданным значением по одному признаку использовали t-тест Стьюдента, после применения метода преобразования данных Бокса–Кокса. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена (ρ) использовали для оценки взаимосвязи между переменными. Данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом – $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$. Результаты сравнительного и корреляционного анализа считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Несмотря на то, что хорошо известна способность сероводорода снижать агрегацию тромбоцитов [1, 5], в нашем исследовании ответ на добавление сероводорода к образцам проб пациентов с ИБС перед проведением исследования коллаген-индуцированной агрегации был неоднозначным. У части пациентов (группа 1, $n = 10$) степень агрегации или размер агрегатов снижались на фоне преинкубации с сероводородом, в то время как у остальных пациентов (группа 2, $n = 12$) преинкубация с сероводородом приводила к увеличению степени или размеров агрегатов при исследовании коллаген-индуцированной агрегации. Показатели агрегации тромбоцитов у пациентов, отнесенных к 1-й и 2-й группе, значимо отличались на фоне преинкубации с сероводородом. Так, степень агрегации в 1-й группе составила 8,35 (6,24-9,45) %, во 2-й группе – 17,83 (12,71-19,29) % ($p = 0,01$), размер агрегатов также отличался в обеих группах: 2,24 (1,89-3,68) отн. ед. в первой и 6,61 (5,59-8,62) отн. ед. во второй группе ($p = 0,00$) соответственно, при этом исходные значения коллаген-индуцированной агрегации не различались. Группы пациентов значимо не различались по возрасту, стажу заболевания ИБС, количеству перенесенных инфарктов миокарда и медикаментозной

терапии (аспирин, антагонисты кальция, статины, диуретики, нитриты, блокаторы рецепторов к ангиотензину II, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента). У обследованных пациентов двух групп были представлены следующие факторы сердечно-сосудистого риска: курение – 22 (100%) пациента, избыточная масса тела и ожирение – 22 (100%) пациента, артериальная гипертензия – 22 (100%) пациента, дислипидемия – 22 (100%) пациента, сахарный диабет 2-го типа – 12 (65%) пациентов. Преобладали пациенты со стенокардией напряжения ФК III – 15 (68%) и ФК II – 7 (31%). В анамнезе 8 (36%) пациентов перенесли инфаркт миокарда (ИМ) давностью ≥ 6 мес. В большинстве случаев у включенных в исследование пациентов диагностировали многососудистое поражение коронарных артерий 19 (86%).

Концентрации TNF β и интерлейкина (IL) 15, в обеих группах пациентов с ИБС были выше максимальных референсных значений (табл. 1).

Концентрации лиганда фактора некроза опухоли (LIGHT), интерферона IFN $\alpha 2$, IL-3, IL-8, IL-15, IL-17F, хемокина CCL3-MIP-1 α были значимо повышены во 2-й группе пациентов, у которых коллаген-индуцированная агрегация увеличивалась на фоне преинкубации с сероводородом, по сравнению с пациентами 1-й группы (табл. 1).

Проведенный корреляционный анализ выявил, что в 1-й группе пациентов обнаружилось положительные корреляционные связи между концентрациями MIP-1 α ($R_s = 0,56$, $p = 0,03$; $R_s = 0,69$, $p = 0,01$), IL-5 ($R_s = 0,83$, $p = 0,01$; $R_s = 0,73$, $p = 0,01$) и IL-8 ($R_s = 0,60$, $p = 0,02$; $R_s = 0,95$, $p = 0,01$) соответственно, как с размером агрегатов, так и с показателем степени коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов, на фоне преинкубации с сероводородом. Кроме того, выявлены корреляционные связи размера агрегатов с концентрацией IL-6 ($R_s = 0,53$, $p = 0,04$) в 1-й группе пациентов с ИБС. Во 2-й группе пациентов была выявлена корреляционная связь с размером агрегатов и PIGF ($R_s = 0,59$, $p = 0,04$) и с CXCL16 как с размером агрегатов ($R_s = 0,58$, $p = 0,04$), так и со степенью агрегации ($R_s = 0,65$, $p = 0,04$).

Настоящая работа носила характер открытого одноцентрового одномоментного наблюдения. В проведенном исследовании установлено, что у пациентов с ИБС 2-й группы значимо повышались факторы (табл. 1), способствующие нестабильности бляшек – LIGHT [2], и маркеры воспаления (IFN $\alpha 2$, IL-8, IL-15, MIP-1 α , IL-17F) [3], которые могут способствовать росту атеросклеротических бляшек и ишемическому повреждению, что доказывает наличие высокого

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИИ БИОМАРКЕРОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИБС И ИХ РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

TABLE 1. CONCENTRATIONS OF BIOMARKERS IN PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE AND THEIR REFERENCE VALUES

Биомаркеры Biomarkers	1-я группа с ИБС Group 1 with coronary heart disease	2-я группа с ИБС Group 2 with coronary heart disease	Референсные значения Reference values
CXCL16, пг/мл CXCL16, pg/mL	535,57 (535,08-537,60)	511,06 (438,27-627,66)	547,3 (430,0-766,0)
PIGF, пг/мл PIGF, pg/mL	12,02 (9,61-12,20)	9,3 (4,42-15,07)	8,72 (0,00-39,98)
LIGHT, пг/мл LIGHT, pg/mL	150,05 (137,12-163,20)	168,48 (150,05-179,05), p = 0,04	337,66 (0,0-1627,0)
IFNα2, пг/мл IFN α 2, pg/mL	9,61 (9,35-10,39)	27,53 (10,39-35,51), p = 0,01	52,5 (0,00-75,50)
IL-3, пг/мл IL-3, pg/mL	0,07 (0,03-0,14)	0,42 (0,03-0,68), p = 0,01	46,2 (0,00-53,30)
IL-5, пг/мл IL-5, pg/mL	3,53 (1,72-6,45)	3,16 (2,52-5,88)	20,40 (0-55)
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	3,56 (2,99-4,16)	4,34 (3,56-6,34)	30,20 (0-124)
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	2,21 (1,59-2,92)	2,98 (1,96-3,95), p = 0,02	24 (1,51-116,00)
IL-15, пг/мл IL-15, pg/mL	12,43 (8,04-16,58)	17,54 (16,58-17,75), p = 0,01	3,60 (0,00-8,86)
MIP-1α, пг/мл MIP-1 α , pg/mL	11,48 (10,46-14,23)	17,60 (14,23-20,62), p = 0,03	78,50 (0-724)
TNFα, пг/мл TNF α , pg/mL	48,18 (36,08-66,47)	46,26 (35,76-56,04)	21,10 (5,7-39,8)
TNFβ, пг/мл TNF β , pg/mL	2,88 (2,55-10,72)	5,10 (1,83-10,72)	3,40 (0,00-3,38)
IL-17F, пг/мл IL-17F, pg/mL	7,98 (7,11-13,78)	19,22 (7,11-29,15) p = 0,02	–

Примечание. p – уровень значимости различий между группами пациентов; Лиганд 16 хемокина CXC – CXCL16; фактор роста плаценты – PIGF; лиганд фактора некроза опухоли – LIGHT; интерферон – IFN; интерлейкин – IL; белок, относящийся к семейству CC-хемокинов – MIP; фактор некроза опухолей – TNF.

Note. p is the significance level of differences between patient groups; chemokine ligand 16 CXC – CXCL16; placenta growth factor – PIGF; tumor necrosis factor ligand – LIGHT; interferon – IFN; interleukin – IL; protein belonging to the CC chemokine family – MIP; tumor necrosis factor – TNF.

остаточного риска у пациентов с ИБС. По данным обсервационных исследований показано, что биомаркеры воспаления являются лучшими предикторами тяжести и прогноза при сердечной недостаточности [3]. Хроническое системное воспаление запускает процессы фиброобразования, на фоне которых кровотоки в покое могут повышаться из-за диффузного фиброза миокарда, сосудов и компенсаторного эндотелий-за-

висимого увеличения периферического сосудистого сопротивления, что может приводить к активации тромбоцитов [14]. Также в нашем исследовании у пациентов 2-й группы повышены концентрации факторов (табл. 1) преимущественно, клеточного иммунного ответа, активации фагоцитов и НК-клеток (TNF α , IL-8, IL-15, IL-17F, MIP- α) [3, 10, 14]. Избыток медиаторов воспаления в крови у пациентов 2-й группы про-

водит к гиперагрегации тромбоцитов (табл. 1), на которую преинкубация с сероводородом может уже не оказывать своего ингибирующего действия, поскольку механизмы внутриклеточной трансдукции ингибирующего сигнала при действии сероводорода, вероятно, имеют общие звенья с таковыми для провоспалительных стимулов и активированы их избытком. Ранее Zhong и соавт. [15] в 2014 году установили, что ингибирование агрегации было связано со снижением секреции, нарушением мобилизации кальция из внутриклеточных запасов и снижением ряда индуцированных коллагеном сигнальных событий. Видимо, в этом процессе и участвует сероводород при его действии на тромбоциты 1-й группы пациентов. Но, когда тромбоцит гиперактивирован цитокинами, то избыток кальция в клетке может быть вызван активацией цитокиновых рецепторов или другими факторами, а преинкубация с сероводородом оказывается неэффективной. Возможно, именно этот феномен мы и выявили во 2-й группе пациентов. В нашем исследовании установлена связь CXCL16 с показателями агрегации во 2-й группе. Известно, что CXCL16 регулирует воспаление, повреждение тканей и фиброз. Клетки сосудистой стенки, лейкоциты и тромбоциты экспрессируют и высвобождают CXCL16 под действием медиаторов воспаления [6, 7, 9], что нашло подтверждение и в нашем исследовании.

В исследовании установлено значимое повышение концентрации маркеров, продуцируемых тромбоцитами, относящимися к семейству цитокинов и их рецепторов, такие как рецептор суперсемейства TNF-LIGHT и интерлейкина IL-8, во 2-й группе пациентов. В настоящее время показатель LIGHT используется как маркер, отражающий нестабильность атеросклеротической бляшки. Известно, что LIGHT способствует атерогенезу и дестабилизации бляшки. В ряде работ высокий уровень экспрессии LIGHT наблюдали у пациентов с атеросклерозом и хронической сердечной недостаточностью [2, 11], что нашло доказательно и в нашем исследовании. В то же время в исследовании установлены корреляционные связи PIGF с параметрами агрегации тромбоцитов во 2-й группе пациентов. Экспрессия PIGF при атеросклеротических поражениях активирует моноциты и макрофаги, которые впоследствии продуцируют воспалительные и ангиогенные медиаторы, что приводит к возрастающему риску разрыва бляшки [2, 11]. Возможно, именно взаимодействие активированных тромбоцитов с моноцитами в крови и формирование комплексов моноцитов с тромбоцитами является основной причиной тромботических и

воспалительных осложнений у пациентов с сосудистыми заболеваниями.

Тромбоциты модулируют функцию лимфоцитов как при прямом межклеточном взаимодействии, так и с помощью растворимых медиаторов [6, 7]. Увеличение концентрации IL-17F, IL-8 и IFN установлено в нашем исследовании. IL-17F экспрессируется активированными Т-клетками и, как было показано, стимулирует выработку нескольких других цитокинов, включая IL-6 и IL-8, которые являются одним из основных медиаторов воспалительной реакции [13]. В нашем исследовании установлено повышение MIP-1 α (CCL3) и IL-8 (CXCL8) во 2-й группе пациентов, что говорит о наибольшем влиянии на лейкоциты и нейтрофилы активности тромбоцитов у наших пациентов. В α -гранулах тромбоцитов хранятся хемокины классов CC и CXC, которые высвобождаются после активации тромбоцитов, такие как CCL3 (MIP-1 α), привлекают и активируют лейкоциты [6, 7]. В нашем исследовании концентрация MIP-1 α была выше во 2-й группе пациентов, что еще раз доказывает повышение активности тромбоцитов. Содержание хемокина IL-8 повышалось во 2-й группе пациентов, что косвенно свидетельствует об активации нейтрофилов и подавлении их апоптоза, например, цитокином IL-15. Увеличение концентрации IL-17F в нашем исследовании свидетельствует об активации аутоиммунных процессов у пациентов 2-й группы. Известно, что при ИБС фиксация жирных кислот в интиме сосудов и поглощение их макрофагами способствует развитию аутореактивного иммунного ответа, направленного на уничтожение клеток, несущих модифицированные липиды. Причем, вероятно, путем апоптоза, так как LIGHT повышен больше, чем IL-8.

В проведенном исследовании впервые выявлены множественные корреляции между показателями агрегации тромбоцитов на фоне преинкубации с сероводородом с концентрациями биомаркеров воспаления (IFN α 2, IL-3, IL-8, IL-15, IL-17F, MIP-1 α), что свидетельствует о хроническом воспалении у пациентов с ИБС. Терапия во 2-й группе пациентов с ИБС требует назначения комплекса мер по снижению интенсивности системной воспалительной реакции, например, использование антицитокиновых препаратов.

Заключение

Выявлено, что у 2-й группы пациентов с ишемической болезнью сердца с повышением коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов, на фоне преинкубации с сероводородом, выявляются более высокие концентрации биомаркеров воспаления (IFN α 2, IL-3, IL-8, IL-15, IL-17F,

MIP-1 α). Вероятно, именно более выраженный провоспалительный статус в данной группе пациентов приводит к инертности тромбоцитов в отношении ингибирующего действия сероводорода. В 1-й же группе пациентов выявлены многочисленные корреляции параметров агрегации с показателями маркеров воспаления (IL-5, IL-6, IL-8, MIP-1 α), что может обуславливать использование различной коррекционной терапии для пациентов этих групп.

Список литературы / References

1. Козлов В.А. Определяющая роль тимуса в иммунопатогенезе аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 39-58. [Kozlov V.A. Determining role of thymus in immune pathogenesis of autoimmune, oncological and infectious diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 39-58. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-DRO-2591.
2. Bando S., Fukuda D., Soeki T., Nishimoto S., Uematsu E., Matsuura T., Ise T., Tobiume T., Yamaguchi K., Yagi S., Iwase T., Yamada H., Wakatsuki T., Shimabukuro M., Sata M. Expression of NLRP3 in subcutaneous adipose tissue is associated with coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2015, Vol. 242, no. 2, pp. 407-414.
3. Cipolletta D., Cohen P., Spiegelman B.M., Benoist C., Mathis D. Appearance and disappearance of the mRNA signature characteristic of Treg cells in visceral adipose tissue: age, diet, and PPAR γ effects. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, no. 2, pp. 482-487.
4. Dai X., Zhang D., Wang C., Wu Z., Liang C. The pivotal role of thymus in atherosclerosis mediated by immune and inflammatory response. *Int. J. Med. Sci.*, 2018, Vol. 15, no. 13, pp. 1555-1563.
5. Ferreira R.C., Simons H.Z., Thompson W.S., Rainbow D.B., Yang X., Cutler A.J., Oliveira J., Castro Dopico X., Smyth D.J., Savinykh N., Mashar M., Vyse T.J., Dunger D.B., Baxendale H., Chandra A., Wallace C., Todd J.A., Wicker L.S., Pekalski M.L. Cells with Treg-specific FOXP3 demethylation but low CD25 are prevalent in autoimmunity. *J. Autoimmun.*, 2017, Vol. 84, pp. 75-86.
6. Gadekar T., Dudeja P., Basu I., Vashisht S., Mukherji S. Correlation of visceral body fat with waist-hip ratio, waist circumference and body mass index in healthy adults: A cross sectional study. *Med. J. Armed Forces India*, 2020, Vol. 76, no. 1, pp. 41-46.
7. Gao Z., Xu X., Li Y., Sun K., Yang M., Zhang Q., Wang S., Lin Y., Lou L., Wu A., Liu W., Nie B. Mechanistic Insight into PPAR γ and Tregs in Atherosclerotic Immune Inflammation. *Front. Pharmacol.*, 2021, Vol. 12, 750078. doi: 10.3389/fphar.2021.750078.
8. Gensini G.G. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.*, 1983, Vol. 51, no. 3, 606. doi: 10.1016/s0002-9149(83)80105-2.
9. Iacobellis G. Epicardial adipose tissue in contemporary cardiology. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2022, Vol. 19, pp. 593-606.
10. Ni X., Kou W., Gu J., Wei P., Wu X., Peng H., Tao J., Yan W., Yang X., Lebid A., Park B.V., Chen Z., Tian Y., Fu J., Newman S., Wang X., Shen H., Li B., Blazar B.R., Wang X., Barbi J., Pan F., Lu L. TRAF6 directs FOXP3 localization and facilitates regulatory T-cell function through K63-linked ubiquitination. *EMBO J.*, 2019, Vol. 38, no. 9, e99766. doi: 10.15252/embj.201899766.
11. Sima P., Vannucci L., Vetricka V. Atherosclerosis as autoimmune disease. *Ann. Transl. Med.*, 2018, Vol. 6, no. 7, 116. doi: 10.21037/atm.2018.02.02
12. Wang Q., Wu H. T cells in adipose tissue: critical players in immunometabolism. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2509. doi: 10.3389/fimmu.2018.02509.
13. Yang H., Youm Y.H., Dixit V.D. Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 5, pp. 3040-3052.
14. Yu Y., Bai H., Wu F., Chen J., Li B., Li Y. Tissue adaptation of regulatory T cells in adipose tissue. *Eur. J. Immunol.*, 2022, Vol. 52, no. 12, pp. 1898-1908.
15. Zeng Q., Sun X., Xiao L., Xie Z., Bettini M., Deng T. A unique population: adipose-resident regulatory T cells. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2075. doi: 10.3389/fimmu.2018.02075.

Авторы:

Трубачева О.А. — к.м.н., доцент кафедры физической культуры и здоровья ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия
Гусакова А.М. — к.фарм.н., старший научный сотрудник отделения клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии — филиал ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Authors:

Trubacheva O.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Physical Culture and Health, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation
Gusakova A.M., PhD (Pharmacy), Senior Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Шнайдер О.Л. — младший научный сотрудник отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии — филиал ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Бирулина Ю.Г. — к.б.н., доцент кафедры биофизики и функциональной диагностики ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Чумакова С.П. — д.м.н., профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Петрова И.В. — д.б.н., профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Schneider O.L., Junior Research Associate, Department of Atherosclerosis and Chronic Ischemic Heart Disease, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Birulina Yu.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Chumakova S.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Petrova I.V., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Biophysics and Functional Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 05.03.2023
Принята к печати 13.03.2023

Received 05.03.2023
Accepted 13.03.2023

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ПРО- И ПРОТИВО- ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ЖЕНЩИН С ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ

Невежкина Т.А.¹, Маркелова Е.В.¹, Кныш С.В.¹, Тулупова М.С.²,
Матюшкина Л.С.¹

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

² ООО «Парацельс», г. Владивосток, Россия

Резюме. Группа папилломавирусов является одной из наиболее распространенных вирусных инфекций среди заболеваний, передающихся половым путем у молодого населения. Длительный, вялотекущий воспалительный процесс значительно ухудшает адекватную прегравидарную подготовку. Наряду с папилломавирусной инфекцией наиболее частыми ассоциациями выступают герпесвирусная и хламидийная инфекции. Многие авторы считают, что при ПВИ выявляется дисрегуляция про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови. В настоящее время не существует единых стандартов ведения и лечения женщин с папилломавирусной инфекцией без выраженных клинических проявлений для предупреждения морфофункциональных нарушений мочеполовой системы, ведущих к репродуктивным нарушениям. Но большинство авторов считают, что применение противовирусных и иммуномодулирующих препаратов является основным методом терапии против размножения патогенов в организме.

Цель исследования — сравнить изменения уровня IL-17, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13 и TGF-β1 в сыворотке крови у женщин с папилломавирусной инфекцией до и после терапии Inosine pranobex (IP) и Solanum tuberosum (ST).

Проведено обследование 137 пациенток с папилломавирусной инфекцией, получавших терапию препаратами с действующим веществом Inosine pranobex и Solanum tuberosum. Определение уровней IL-17, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13, TGF-β1 в сыворотке крови проводили с помощью специфических реактивов фирмы R&D Diagnostics Inc. (США).

Изменения про- и противовоспалительных цитокинов до терапии: снижение — IL-12 p70, p40, повышение — IL-13, IL-17 и TGF-β1. После терапии в группе пациенток исключительно с ПВИ-инфекцией

Адрес для переписки:

Невежкина Татьяна Андреевна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.
Тел.: 8 (914) 672-89-45.
E-mail: www.tanya.ru9292@mail.ru

Address for correspondence:

Tatyana A. Nevezhkina
Pacific State Medical University
2 Ostryakov Ave
Vladivostok
690002 Russian Federation
Phone: +7 (914) 672-89-45.
E-mail: www.tanya.ru9292@mail.ru

Образец цитирования:

Т.А. Невежкина, Е.В. Маркелова, С.В. Кныш,
М.С. Тулупова, Л.С. Матюшкина «Изменение уровня
про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке
крови у женщин с папилломавирусной инфекцией
до и после терапии» // Российский иммунологический
журнал, 2024. Т. 27, № 1. С. 109-118.
doi: 10.46235/1028-7221-1127-CIS

© Невежкина Т.А. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.A. Nevezhkina, E.V. Markelova, S.V. Knysh,
M.S. Tulupova, L.S. Matyshkina “Changes in serum levels
of pro- and anti-inflammatory cytokines in women with
papillomavirus infection before and after therapy”, *Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal*, 2024, Vol. 27, no. 1, pp. 109-118.
doi: 10.46235/1028-7221-1127-CIS

© Nevezhkina T.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-1127-CIS

при применении препарата синтетического происхождения IP выявлены следующие изменения: повысились уровни IL-12 p70, IL-12 p40 и снижение IL-13 и TGF-β1, в то время как при терапии ST: повышение IL-12 p70, IL-12 p40 и снижение IL-13 и TGF-β1. При терапии IP у пациенток с ПВИ + ГВИ зарегистрировано повышение IL-12 p70, IL-12 p40 и снижение IL-13, в то время как TGF-β1 не изменялся, а при терапии ST также увеличились IL-12 p70, IL-12 p40 и снизился IL-13, TGF-β1 остался без изменений. В группе женщин с ПВИ + хламидийная инфекция показано повышение IL-12 p70, IL-12 p40 и снижение IL-13 и TGF-β1 при терапии IP и повышение IL-12 p70, IL-12 p40 и снижение IL-13 и TGF-β1 при терапии ST. Во всех группах пациенток IL-17 оставался высоким после терапии без статистически значимой разницы между подгруппами. В группах пациенток, получавших лечение IP, регистрировалась преимущественная нормализация степени иммунных нарушений.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, цитокины, противовирусная терапия, Inosine pranobex, Solanum tuberosum, прегравидарная подготовка

CHANGES IN SERUM LEVELS OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN WOMEN WITH PAPILOMAVIRUS INFECTION BEFORE AND AFTER THERAPY

Nevezhkina T.A.^a, Markelova E.V.^a, Knysh S.V.^a, Tulupova M.S.^b,
Matyshkina L.S.^a

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Paracelsus LLC, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Papillomavirus infections (PVI) are among the most common sexually transmitted diseases in the young population. A long, sluggish inflammatory process sufficiently worsens adequate preparation for normal pregnancy. Herpesvirus and Chlamydia infections are the most frequent associations with papillomavirus infection. Many authors believe that PVI may cause dysregulation of pro- and anti-inflammatory cytokines revealed in blood serum. Currently, there are no uniform standards for management and treatment of women with papillomavirus infection without pronounced clinical manifestations, in order to prevent morphofunctional disorders of genitourinary system leading to reproductive disorders. However, most authors believe that antiviral and immunomodulatory drugs are the main tool of therapy against expansion of pathogens in the body. The aim of our study was to compare changes in the levels of IL-17, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13 and TGF-β1 in blood serum of women with papillomavirus infection before and after therapy with Inosine pranobex (IP) and Solanum tuberosum (ST).

We conducted a survey of 137 patients with papillomavirus infection treated with drugs containing Inosine pranobex and Solanum tuberosum as active substances. The levels of IL-17, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13, and TGF-β1 in blood serum were determined using specific reagents from R&D Diagnostics Inc. (USA).

Changes in pro- and anti-inflammatory cytokines before therapy were as follows: decreased levels were found for IL-12 p70, p40; increased values were revealed for IL-13, IL-17, and TGF-β1. After the courses of therapy, we have registered the following changes in PVI-infected patients treated with synthetic drug Inosine pranobex (IP): the levels of IL-12 p70, IL-12 p40 were increased, along with decrease in IL-13 and TGF-β1. Meanwhile, ST therapy was associated with increase in IL-12 p70, IL-12 p40, and a decrease in IL-13 and TGF-β1. With IP therapy, patients with combined HPV + HV infection showed an increase in IL-12 p70, IL-12 p40 and a decrease in IL-13, while TGF-β1 did not change. Following ST therapy, these patients exhibited higher IL-12 p70, IL-12 p40, decreased IL-13, whereas TGF-β1 remained unchanged. In the group of women with HPV + Chlamydia infection, an increase in IL-12 p70, IL-12 p40 and a decrease in IL-13 and TGF-β1 was associated with IP therapy. An increase in IL-12 p70, IL-12 p40 and a decrease in IL-13 and TGF-β1 were shown after ST therapy. In all groups of patients, IL-17 remained at high levels after therapy without significant differences between the mentioned subgroups. In the groups of patients treated with IP, we have recorded a general normalization of immune disorders.

Keywords: human papillomavirus, cytokines, antiviral therapy, Inosine pranobex, Solanum tuberosum, pregravidar preparation

Введение

Группа папилломавирусов является одной из наиболее распространенных вирусных инфекций среди заболеваний, передающихся половым путем у молодого населения [1]. Длительный, вялотекущий воспалительный процесс значительно ухудшает адекватную прегравидарную подготовку. Однако если беременность и наступает, возникает ряд акушерских и перинатальных проблем: бесплодие, невынашивание беременности, нарушения развития плода, преждевременные роды и др. [26].

Наряду с папилломавирусной инфекцией (ПВИ) наиболее частыми ассоциациями выступают герпесвирусная (ГВИ) и хламидийная инфекции, что не только усугубляет нарушение репродуктивного потенциала женщины, но и повышает вероятность онкогенеза [14]. Вирус простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ1/2) имеет способность поражать эндометрий, что на фоне уже имеющейся ПВИ-инфекции, может препятствовать имплантации плодного яйца в полости матки [4]. Также выдвигалась гипотеза о стимуляции ПВИ герпетической инфекцией, способствующей интеграции генома вируса папилломы человека (ВПЧ) в клетку хозяина [4, 11, 16, 17]. Особенностью хламидийной инфекции является бессимптомное продуктивное воспаление с поражением эпителиальной оболочки органов малого таза, что приводит к спаечному процессу, в том числе и маточных труб, способствуя развитию бесплодия по трубному фактору [13]. В исследовании S. Bellaminutti и соавт. (2014) было показано, что наиболее часто хламидийная инфекция выявляется у пациенток молодого возраста до 25 лет в моноварианте (22%), а при ассоциации с ПВИ показатель достигал 45,8% [18]. Также эти данные подтвердили D. Panatto и соавт. (2015), которые отметили частое сочетание хламидий и ВПЧ в более молодом возрасте: если в целом в популяции указанная комбинация была обнаружена у 57% пациенток, то среди женщин до 25 лет – у 69,7% [23].

Многие авторы считают, что при ПВИ является дисрегуляция про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови [8, 15]. При рецидивирующем течении ПВИ обнаружено повышение IL-10, IL-13 и протеина, вызывающего деградацию межклеточного матрикса с превалированием смешанного (Т1/Т2) типа иммунного ответа. При нерезидивирующем течении выявлен Т1 тип иммунного ответа [9]. В 2019 году Т.В. Poston и соавт. определили, что CXCL10, TNF α и IL-17A относятся к цитокинам, связанным с повышенными шансами инфицирования эндометрия при хламидийной инфекции. Было продемонстрировано, что передача сигналов IFN

I типа у мышей стимулирует продукцию CXCL10, продлевая хламидийную инфекцию, что способствует патологии фаллопиевых труб [24, 27].

В настоящее время не существует единых стандартов ведения и лечения женщин с ПВИ без выраженных клинических проявлений для предупреждения морфофункциональных нарушений мочеполовой системы, ведущих к репродуктивным нарушениям. Но большинство авторов считают, что применение противовирусных и иммуномодулирующих препаратов является основным методом терапии против размножения патогенов в организме [3, 6].

Дальнейшие исследования иммунологических нарушений при папилломавирусной инфекции позволят расширить представления об иммунопатогенезе болезни и оценить механизмы эффективности терапии.

Цель работы – сравнить изменения уровня IL-17, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13 и TGF- β 1 в сыворотке крови у женщин с папилломавирусной инфекцией до и после терапии Inosine pranobex и Solanum tuberosum.

Материалы и методы

В исследование были включены 137 человек, разделенных на основную группу – 107 женщин и группу контроля – 30 практически здоровых женщин.

На первом этапе исследования основная группа была разделена на 3 группы, в зависимости от этиологии: I группа с ПВИ, II группа – ассоциация ПВИ и ГВИ и III группа – ассоциация ПВИ и хламидийная инфекции. На втором этапе исследования 3 группы методом случайной выборки были разделены на подгруппы: I подгруппа (А) женщин получала терапию препаратом с действующим веществом Inosine pranobex (IP), II подгруппа (В) – действующим веществом Solanum tuberosum (ST) и основную терапию у II и III группы пациенток – при ГВИ в сочетании с Валацикловиром и в группе с хламидийной инфекцией – Доксициклин. Исследование было проведено дважды. Исходно – до терапии и через 1 месяц после терапии. Определение уровней IL-17, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13, TGF- β 1 в сыворотке крови проводили с помощью специфических реактивов фирмы R&D Diagnostics Inc. (США) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Учет результатов осуществлен с помощью иммуноферментного анализатора Multiscan (Финляндия). Расчеты количества цитокина проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Количество выражали в пг/мл и нг/мл. Степень иммунных наруше-

ний (СИН) рассчитывалась по А.М. Земскову и соавт. (1994) [5, 10].

Анализ полученных результатов проводился при помощи программы SPSS v. 22. методом вариационной статистики с использованием двухвыборочного t-критерия Стьюдента и критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Количественные признаки, не имеющие нормального распределения, оценивались с помощью непараметрических методов и представлены в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартиля ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$) %. Статистически достоверным считали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При анализе уровня исследуемых про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови у пациенток до и через 1 месяц после терапии продемонстрированы закономерности и различия (табл. 1).

Было установлено разнонаправленное изменение про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови пациенток в исследуемых группах до лечения. Уровень IL-17A был повышен в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$) у пациенток всех основных групп. При этом не установлено статистически значимой разницы в его содержании в сыворотке крови между группами.

В основных группах женщин было выявлено снижение IL-12 субтипа p70 при дефиците IL-12 p40 в сравнении с группой контроля. При этом у пациенток II группы (с ПВИ и ГВИ) определен дефицит IL-12 p70 ($p < 0,01$) как в сравнении с группой контроля, так и с группами с бактериальной инфекцией ($p_{2,3} = 0,003$) и моноинфекцией ($p_{1,2} = 0,002$). IL-12 p40 во II группе также был наиболее низким как по отношению к контрольной группе ($p < 0,001$), так и к группам с хламидийной инфекцией ($p_{2,3} = 0,002$) и I группе ($p_{1,2} = 0,004$).

Значения IL-13 были повышены в сыворотке крови во всех группах пациенток в сравнении с группой контроля ($p < 0,05 - 0,01$). Наиболее высокие показатели зарегистрированы в группе с вирусной и бактериальной ассоциацией в сравнении с I ($p_{1,3} = 0,002$) и II ($p_{2,3} = 0,003$) группами пациенток. Межгрупповых различий между I и II группами выявлено не было.

TGF- β 1 был повышен в 1,5-2 раза в сыворотке крови у женщин во всех основных исследуемых группах в сравнении с группой контроля ($p < 0,01$).

При анализе про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови пациенток через 1 месяц после терапии продемонстрирован ряд изменений. В группе I, в обеих подгруппах, в целом

выявлена тенденция к восстановлению, однако без достижения контрольных значений. При терапии IP (подгруппа IA) было определено увеличение уровней IL-12 p70 в среднем в 2 раза, IL-12 p40 – 2,5 раза и снижение показателей IL-13 и TGF- β 1 – в 1,5 раза, относительно значений до терапии. У пациенток подгруппы IВ отмечалась аналогичная тенденция, однако более выраженная и отличающаяся от подгруппы IA по значениям субтипов IL-12: IL-12 p70 – в 5 раз, IL-12 p40 – 3 раза. IL-13 и TGF- β 1 в среднем стали ниже в сравнении со значениями до терапии в 1,5 раза, в той же мере и без достоверных отличий от результатов подгруппы IA. Контрольные значения IL-12 p40, IL-13, TGF- β 1 не были достигнуты в обеих подгруппах, значения IL-12 p70 стали достоверно выше как в подгруппе IA, так и в подгруппе IВ по сравнению с референсными величинами.

В группе II была установлена практически идентичная картина динамики всех цитокинов в сыворотке крови, за исключением отсутствия динамики в содержании TGF- β 1, который не изменялся после терапии и оставался выше контрольных значений. В подгруппе IIA было задокументировано существенное увеличение IL-12 p70 – в среднем в 13 раз, IL-12 p40 – 77 раз. Тогда как уровень IL-13, напротив, снизился и стал в 1,4 раза меньше, а TGF- β 1 в сыворотке крови в сравнении с показателями до терапии не изменился. В подгруппе IIB у пациенток, получавших терапию ST, также были зарегистрированы подобные изменения уровня цитокинов в виде повышения, в среднем – IL-12 p70 – в 33 раза, IL-12 p40 – 63 раза, IL-13 напротив, снизился в среднем в 1,3 раза, а TGF- β 1 в динамике лечения не изменялся. Достоверные отличия между подгруппами были выявлены лишь в содержании IL-12 p70 и IL-12 p40. Уровни цитокинов, соответствующие значениям контрольной группы, достигнуты не были.

В группе III изменения содержания цитокинов в сыворотке крови были несколько иными, а также были выявлены различия между подгруппами. В сыворотке крови подгруппы IIIA после терапии IP были зафиксированы изменения в виде увеличения содержания IL-12 p70 в среднем в 3,2 раза, IL-12 p40 – 1,4 раза, IL-13 понизился в среднем в 1,9 раза и TGF- β 1 снизился в 1,7 раза. В то время как в сыворотке пациенток из подгруппы IIIB увеличивался уровень IL-12 p70 в среднем в 10 раз, IL-12 p40 – 1,2 раза и снижались значения IL-13 – в 1,2 раза и TGF- β 1 – 1,3 раза. При сравнении подгрупп между собой зафиксированы более высокие значения IL-12 p70 – в подгруппе IIIB и IL-12 p40 – в подгруппе IIIA, и снижение содержания IL-13 – в подгруппе IIIA. Только в подгруппе IIIA было достигнуто значе-

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИНАМИКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОК РАЗНЫХ ГРУПП

TABLE 1. COMPARATIVE RESULTS OF THE DYNAMICS OF THE CYTOKINE PROFILE OF BLOOD SERUM BEFORE AND AFTER THERAPY IN PATIENTS OF DIFFERENT GROUPS

Показатели, Ме (Q _{0,25} -Q _{0,75}) Indicators, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	Группа контроля Control Group (n = 30)	Группа I ВПЧ Group I HPV (n = 21) 1	Группа II ВПГ + ВПЧ Group II HSV + HPV (n = 47) 2	Группа III ВПЧ + хлам Group III HPV + chlam (n = 39) 3	Уровни достоверности Levels of significance (p)
IL-17 до терапии, пг/мл IL-17 before therapy, pg/mL	2,8 (0,5-6,3)	7,39* (6,29-7,82) p _{до-IA} = 0,071 p _{до-IB} = 0,067	7,04 * (5,48-7,63) p _{до-IIA} = 0,091 p _{до-IIB} = 0,066	8,91* (7,04-10,14) p _{до-IIIA} = 0,12 p _{до-IIIB} = 0,24	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ > 0,05
Inosine pranobex (A)		7,85* (7,15-8,54) p _{IA-IB} = 0,128	5,56* (5,06-6,60) p _{IIA-IIB} = 0,085	9,24* (6,82-13,42) p _{IIIA-IIIB} = 0,65	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ < 0,05
Solanum tuberosum (B)		6,11* (6,01-6,87)	6,93* (5,99-8,86)	7,82* (6,55-9,10)	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ > 0,05
IL-12 p70 до терапии, пг/мл IL-12 p70 before therapy, pg/mL	6,85 (2,86-20,59)	4,18* (3,27-11,56) p _{до-IA} = 0,045 p _{до-IB} < 0,001	1,03** (0,11-8,96) p _{до-IIA} = 0,006 p _{до-IIB} < 0,001	3,27* (1,94-3,43) p _{до-IIIA} = 0,008 p _{до-IIIB} < 0,001	p ₁₋₂ = 0,002 p ₂₋₃ = 0,048 p ₁₋₃ > 0,05
Inosine pranobex (A)		9,18* (8,36-20,01) p _{IA-IB} = 0,021	14,36* (12,39-18,85) p _{IIA-IIB} < 0,001	10,72* (8,67-18,43) p _{IIIA-IIIB} < 0,001	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ > 0,05
Solanum tuberosum (B)		24,45** (10,66-28,10)	34,61** (11,79-37,45)	32,77** (19,15-36,4)	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ > 0,05
IL-12 p40 до терапии, пг/мл IL-12 p40 before therapy, pg/mL	106,0 (69,2-151,0)	12,92** (1,28-30,76) p _{до-IA} = 0,036 p _{до-IB} = 0,007	0,36*** (0,29-11,96) p _{до-IIA} = 0,008 p _{до-IIB} = 0,007	9,60*** (1,28-12,92) p _{до-IIIA} = 0,025 p _{до-IIIB} = 0,045	p ₁₋₂ < 0,01 p ₂₋₃ = 0,002 p ₁₋₃ = 0,004
Inosine pranobex (A)		33,26** (26,43-40,12) p _{IA-IB} = 0,038	27,93** (18,71-34,97) p _{IIA-IIB} = 0,027	14,22*** (1,04-16,40) p _{IIIA-IIIB} = 0,028	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ < 0,01 p ₁₋₃ < 0,01
Solanum tuberosum (B)		50,10** (32,12-61,13)	22,68** (11,63-36,04)	12,43*** (1,41-13,45)	p ₁₋₂ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001 p ₁₋₃ < 0,001
IL-13 до терапии, пг/мл IL-13 before therapy, pg/mL	39,61 (11,36-72,45)	76,28* (50,40-77,55) p _{до-IA} = 0,047 p _{до-IB} = 0,028	73,17* (69,02-76,28) p _{до-IIA} = 0,006 p _{до-IIB} = 0,031	90,82** (69,02-141,83) p _{до-IIIA} = 0,007 p _{до-IIIB} = 0,002	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ = 0,003 p ₁₋₃ = 0,002
Inosine pranobex (A)		48,45* (39,30-56,80) p _{IA-IB} = 0,45	48,85* (43,31-54,53) p _{IIA-IIB} = 0,33	46,21* (40,83-76,70) p _{IIIA-IIIB} = 0,017	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ > 0,05
Solanum tuberosum (B)		48,62* (29,11-56,11)	53,45* (45,61-61,45)	71,8** (48,44-75,21)	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ < 0,05 p ₁₋₃ < 0,05

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатели, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) Indicators, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	Группа контроля Control Group Group (n = 30)	Группа I ВПЧ Group I HPV (n = 21) 1	Группа II ВПГ + ВПЧ Group II HSV + HPV (n = 47) 2	Группа III ВПЧ + хлам Group III HPV + chlam (n = 39) 3	Уровни достоверности Levels of significance (p)
TGF-β1 до терапии нг/мл TGF-β1 before therapy, pg/mL	16,5 (10,7-20,8)	32,65** (31,65-33,47) P _{до-IA} = 0,033 P _{до-IB} = 0,042	24,21** (23,61-25,65) P _{до-IIA} = 0,08 P _{до-IIB} = 0,12	32,62** (32,61-33,47) P _{до-IIIA} = 0,007 P _{до-IIIB} = 0,024	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ > 0,05
Inosine pranobex (A)		20,43* (16,75-24,10) P _{IA-IB} = 0,064	20,11** (17,10-23,11) P _{IIA-IIB} = 0,072	18,41 (16,12-24,62) P _{IIIA-IIIB} = 0,022	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ > 0,05
Solanum tuberosum (B)		20,41* (19,35-35,10)	24,10** (13,13-43,40)	23,55** (20,70-26,40)	p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05 p ₁₋₃ > 0,05

Примечание. 1. Статистическая достоверность различий с группой контроля: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,00.
2. Статистическая достоверность между группами: p₁₋₂ – I и II группы – с ВПЧ и ВПЧ + ВПГ; p₂₋₃ – II и III группы – с ВПЧ + ВПГ и ВПЧ + хламидии; p₁₋₃ – III и I группа – с ВПЧ + хламидии и ВПЧ.
3. Статистическая достоверность между подгруппами: P_{до-IA} – до терапии и I подгруппа с Inosine pranobex (IA) – с ПВИ; P_{до-IB} – до терапии и II подгруппа с Solanum tuberosum (IB) – с ПВИ; P_{IA-IB} – IA и IB подгруппы – с ПВИ; P_{до-IIA} – до терапии и I подгруппа с Inosine pranobex (IIA) – с ПВИ + ГВИ; P_{до-IIB} – до терапии и II подгруппа с Solanum tuberosum (IIB) – с ПВИ; P_{IIA-IIB} – IIA и IIB подгруппы – с ПВИ + ГВИ; P_{до-IIIA} – до терапии и III подгруппа с Inosine pranobex (IIIA) – с ПВИ + хламидийная инфекция; P_{до-IIIB} – до терапии и III подгруппа с Solanum tuberosum (IIIB) – с ПВИ + хламидийная инфекция; P_{IIIA-IIIB} – IIIA и IIIB подгруппы – с ПВИ + хламидийная инфекция.

Note. 1. Statistical significance of differences with the control group: *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

2. Statistical significance between groups: p₁₋₂, groups I and II – with HPV and HPV + HSV; p₂₋₃, groups II and III – with HPV + HSV and HPV + chlamydia; p₁₋₃, group III and I – with HPV + chlamydia and HPV.

3. Statistical significance between subgroups: P_{до-IA}, before therapy and subgroup I with Inosine pranobex (IA) – with PVI; P_{до-IB}, before therapy and subgroup II with Solanum tuberosum (IB) – with PVI; P_{IA-IB}, IA and IB subgroups – with PVI; P_{до-IIA}, before therapy and subgroup I with Inosine pranobex (IIA) – with PVI + GVI; P_{до-IIB}, before therapy and subgroup II with Solanum tuberosum (IIB) – with PVI; P_{IIA-IIB}, IIA and IIB subgroups – with PVI + GVI; P_{до-IIIA}, before therapy and subgroup III with Inosine pranobex (IIIA) – with PVI + chlamydia infection; P_{до-IIIB}, before therapy and subgroup III with Solanum tuberosum (IIIB) – with PVI + chlamydia infection; P_{IIIA-IIIB}, IIIA and IIIB subgroups – with PVI + chlamydia infection.

ние TGF-β1, не отличавшееся от аналогичного показателя добровольцев из контрольной группы.

Оценивая содержание IL-17 в сыворотке крови пациенток всех групп, не было выявлено никаких динамических изменений: цитокин сохранялся на повышенном уровне относительно контрольных значений, вне зависимости от проведенной терапии и характера инфекции.

Для определения изменения состояния иммунной системы и сравнительной характеристики эффективности противовирусной и иммуномодулирующей терапии у пациенток с ПВИ были рассчитаны степени иммунных нарушений.

При расчете степени иммунных расстройств до и после терапии в основных группах установлено, при применении IP и ST, во всех группах пациенток, IL-17 оставался без динамики. По уровню IL-12 p70 при применении IP в I группе пациенток СИН изменилась с -2 до +1, во II группе – с -3 до +2 и в III группе пациенток – с -2

до +1. В то время как при терапии с ST в I группе – с -2 до +2, во II группе – с -3 до +3 и в III группе пациенток – с -2 до +3. Также отмечено изменение СИН по IL-12 p40 – при терапии IP – в I и II группе пациенток значение уменьшились с -3 до -2, но в III группе пациенток СИН оставалась без изменений. При терапии ST в I группе показатели СИН изменились с -3 до -2, тогда как во II и III группе остались без изменений. IL-13 у всех групп пациенток до терапии имела степень +3, после применения IP и ST во всех группах пациенток степень снизилась до +1, за исключением III группы, где при терапии с ST СИН изменилась до +2. Установлены различия в СИН по уровню TGF-β1: при терапии с IP в I группе определены изменения с +3 до +1, во II группе – с +2 до +1 и в III группе пациенток с +3 до 0. Терапия с ST также способствовала снижению СИН с +3 до +1 в исследуемых группах, за исключением II группы, где СИН оставалась без изменений.

Статистически значимое увеличение в сыворотке крови уровня IL-17A у женщин до терапии, в основных исследуемых группах, может свидетельствовать об обширной тканевой реакции, приводящей, в том числе, к миграции нейтрофилов в воспалительную зону и о важной роли этих клеток в патогенезе ПВИ, не исключено также и включение аутоиммунного компонента [12, 15].

Дефицит IL-12 и его субтипов p40 и p70 был зарегистрирован у всех пациенток обследуемых групп, однако наибольшее снижение показателя было выявлено при ассоциациях вирусных инфекций, вероятно, за счет персистенции ДНК вирусов.

Повышенный уровень IL-13 до проведения лечения способствует ингибированию продукции других цитокинов, стимулирующих воспалительный процесс, что, вероятно, свидетельствует об активации компонентов иммунной системы, направленных на элиминацию вируса и снижение воспалительного процесса в организме. Однако, учитывая плейотропность действия этого цитокина, он также может вызывать и пролонгировать воспалительный процесс [3]. Преобладание Th2-типа и гиперактивации Th17 иммунного ответа ассоциируются с хронизацией воспалительного процесса и фиброзом с дисбалансом регуляторных Т-лимфоцитов и Т-хелперов, что приводит к экспрессии профибриногенных цитокинов [21].

Повышенный уровень TGF-β1 до терапии может свидетельствовать как об активации компенсаторных противовоспалительных механизмов, так и об иммуносупрессии у обследованных пациенток. Поскольку цитокин обладает способностью препятствовать эффективной индукции ответа типа I антигенпрезентирующими клетками, он может вносить вклад в предрасположенность к канцерогенезу шейки матки. Также в ряде исследований было показано, что при оценке промотора TGF-β1 в опухолевых клетках, экспрессирующих E6 и E7 ВПЧ, было обнаружено увеличение экспрессии репортерного гена по сравнению с неэкспрессирующими E6 и E7 опухолевыми клетками. Трансактивация промотора TGF-β1 была несколько повышена в клетках с экспрессией E7 по сравнению с клетками с экспрессией E6. Эти данные подтверждают мнение о том, что активация промотора TGF-β1 с помощью E6 и E7 ВПЧ-16 может иметь патофизиологическое значение, особенно при трансформации и иммортализации клеток [19, 25].

Также TGF-β1 является лигандом рецепторов суперсемейства TGF-β и важным цитокином, который регулирует функции яичников, включая развитие фолликулов, овуляцию, лютеинизацию и фертильность женщины [20]. Однако в 2020 году T. Nongbuaab и соавт. показали, что вы-

сокая продукция TGF-β1 влияет на развитие эмбриона, останавливая его еще на стадии морулы, что способствует репродуктивным потерям [22]. Как уже отмечалось выше, он относится к профибриногенным факторам и это может вносить вклад в процессы нарушения репродукции. IL-13 и TGF-β1, участвуя в фиброгенезе, проявляют прямую фиброгенную активность. TGF-β1-продуцирующие Tregs могут также индуцировать фиброз, однако причины проявления про- или антифиброгенной активности не ясны, роль Tregs в фиброзных заболеваниях остается спорной [7].

При анализе про- и противовоспалительных цитокинов установлено, что в группе пациенток исключительно с ПВИ и в группе с ассоциацией ПВИ и хламидийная инфекции при применении препаратов синтетического (IP) и природного происхождения (ST) выявлены следующие изменения: повысились уровни IL-12 p70, IL-12 p40 при снижении IL-13 и TGF-β1. При терапии IP у пациенток с ПВИ + ГВИ зарегистрировано повышение IL-12 p70, IL-12 p40 и снижение IL-13, в то время как TGF-β1 не изменялся, а при терапии ST также увеличились IL-12 p70, IL-12 p40 и снизился IL-13, TGF-β1 остался без изменений. Во всех группах пациенток IL-17 оставался высоким после терапии без статистически значимой разницы между подгруппами.

При анализе степени иммунных расстройств было установлено, что до терапии в целом наблюдалась гиперпродукция исследуемых цитокинов, за исключением выявленного дефицита IL-12 p70 и IL-12 p40 во всех группах. В результате терапии в большей степени происходила нормализация в отношении TGF-β1 и индукция продукции IL-12 p70 во всех исследуемых подгруппах основных групп.

Выводы

Проведение терапии препаратом Inosine pranobex или Solanum tuberosum способствовало улучшению показателей цитокинового статуса на системном уровне. Оба препарата показали эффективность при ПВИ, как в моноварианте, так и в ассоциациях с ГВИ и хламидийной инфекциями. Однако в группах пациенток, получавших лечение IP, регистрировалась преимущественная нормализация СИН. Требуются дальнейшие комплексные исследования по мониторингу системы цитокинов и матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов для уточнения типа иммунного ответа и его изменений на фоне терапии для обеспечения качественной преградной подготовки.

Список литературы / References

1. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Таточенко В.К., Вишнёва Е.А., Федосеенко М.В., Селимзянова Л.Р., Чемакина Д.С., Лобзин Ю.В., Харит С.М., Брико Н.И., Лопухов П.Д., Сухих Г.Т., Уварова Е.В., Прилепская В.Н., Поляков В.Г., Гомберг М.А., Краснополский В.И., Зароченцева Н.В., Костинов М.П., Белоцерковцева Л.Д., Мельникова А.А., Батыршина Л.Р. Вакцинопрофилактика заболеваний, вызванных вирусом папилломы человека: позиции доказательной медицины. Обзор клинических рекомендаций // Вопросы современной педиатрии // 2017. Т. 16, № 2. С.107-117. [Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Tatochenko V.K., Vishneva E.A., Fedoseenko M.V., Selimzianova L.R., Chemakina D.S., Lobzin Yu.V., Kharit S.M., Briko N.I., Lopukhov P.D., Sukhikh G.T., Uvarova E.V., Prilepskaya V.N., Polyakov V.G., Gomberg M.A., Krasnopolskiy V.I., Zarochentseva N.V., Kostinov M.P., Belotserkovtseva L.D., Melnikova A.A., Batyrshina L.R. Vaccination of diseases caused by the human papillomavirus: positions of evidence-based medicine. Review of clinical recommendations. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Issues of Modern Pediatrics*, 2017, Vol. 16, no. 2, pp.107-117. (In Russ.)]
2. Баранов И.И., Зароченцева Н.В., Малиновская В.В., Выжлова Е.Н. Неинвазивные методы лечения пациенток с ВПЧ-инфекцией и цервикальными интраэпителиальными неоплазиями: систематический обзор и метаанализ // Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучение, 2021. Т. 9, № 1. С. 31-43. [Baranov I.I., Zarochentseva N.V., Malinovskaya V.V., Vyzhlova E.N. Noninvasive methods of treatment of patients with HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Akusherstvo i ginekologiya: Novosti. Mneniya. Obucheniye = Obstetrics and Gynecology: News. Opinions. Training*, 2021, Vol. 9, no. 1, pp. 31-43. (In Russ.)]
3. Варламов Е.Е., Пампура Е.Е., Сухоруков А.Н. Значение цитокинов в патогенезе атопического // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2018. Т. 63, № 1. С. 28-33. [Varlamov E.E., Pampura E.E., Sukhorukov A.N. The significance of cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2018, Vol. 63, no. 1, pp. 28-33. (In Russ.)]
4. Дюдюна 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.)]
5. Земсков А.М., Караулов А.В., Земсков В.М. Комбинированная иммунокоррекция: монография. Отделение физиологии РАН, Акад. естественных наук, Институт биомедицинских исследований и терапии. М.: Наука, 1994. 260 с. [Zemskov A.M., Karaulov A.V., Zemskov V.M. Combined immunocorrection: monograph. Department of Physiology of the Russian Academy of Sciences. Acad. Natural Sciences. Institute of Biomedical Research and Therapy]. Moscow: Nauka, 1994. 260 p.
6. Ивлева Н.Ф., Чижкова Г.В., Пермина Н.Е. Сравнительная эффективность различных методов лечения заболеваний шейки матки // Дальневосточный медицинский журнал, 2013. № 3. С. 46-49. [Ivleva N.F., Chizhkova G.V., Permina N.E. Comparative effectiveness of various methods of treatment of cervical diseases. *Dalnevostochnyy meditsinskiy zhurnal = Far Eastern Medical Journal*, 2013, no. 3, pp. 46-49. (In Russ.)]
7. Игнатович Т.В., Зафранская М.М. Иммунопатогенез фиброза // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2019. № 1. С. 6-17. [Ignatovich T.V., Zafranskaya M.M. Immunopathogenesis of fibrosis. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2019, no. 1, pp. 6-17. (In Russ.)]
8. Караулов А.В., Афанасьев М.С., Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С. Микробные патогены при урогенитальной инфекции беременных // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2019. № 6. С. 13-20. [Karaulov A.V., Afanasyev M.S., Nesvizh Yu.V., Afanasyev S.S. Microbial pathogens in urogenital infection of pregnant women. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 6, pp. 13-20. (In Russ.)]
9. Кизей И.Н., Наумчик Г.А., Серeda Н.Б. Современные представления об этиопатогенезе папилломавирусной инфекции // Тихоокеанский медицинский журнал, 2010. № 3. С. 10-15. [Kizey I.N., Naumchik G.A., Sereda N.B. Modern ideas about the etiopathogenesis of papillomavirus infection. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2010, no. 3, pp. 10-15. (In Russ.)]
10. Клиническая иммунология: учебник для студентов медицинских вузов / Под ред. А.В. Караулова. М.: МИА, 1999. 604 с. [Clinical Immunology: Textbook for Students of Medical Universities / Ed. A.V. Karaulov]. Moscow: MIA, 1999. 604 p.
11. Кустова М.А. Папилломавирусная и сопутствующая инфекция гениталий у беременных с ВИЧ-отрицательным и ВИЧ-положительным статусом // Проблемы здоровья и экологии, 2012. № 2. С. 77-84. [Kustova M. Papillomavirus and concomitant infection of the genitals in pregnant women with HIV-negative and HIV-positive status. *Problemy zdorovya i ekologii = Problems of Health and Ecology*, 2012, no. 2, pp. 77-84. (In Russ.)]
12. Мельников В.Л., Митрофанова Н.Н., Мельников Л.В. Аутоиммунные заболевания: учебное пособие. Пенза: Изд-во ПГУ, 2015. 68 с. [Melnikov V.L., Mitrofanova N.N., Melnikov L.V. Autoimmune diseases: textbook]. Penza: Penza State University, 2015. 68 p.
13. Николенко И.Н., Ризаева Н.А., Оганесян М.В., Гольшикина М.С. Трубно бесплодие как фактор снижения овариального резерва: психоэмоциональный и социальный аспекты // Крымский журнал

экспериментальной и клинической медицины, 2020. Т.10, № 3, С. 110-111. [Nikolenko V.N., Rizaeva N.A., Oganessian M.V., Golyshkina M.S. Tubal infertility as a factor in reducing ovarian reserve: psychoemotional and social aspects. *Krymskiy zhurnal eksperimentalnoy i klinicheskoy meditsiny = Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 2020, Vol. 10, no. 3, pp. 110-111. (In Russ.)]

14. 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 treatment of urogenital infections in pregnant women. *Lechashchiy vrach = Attending Physician*, 2021, no. 1, pp. 31-36. (In Russ.)]

15. Хаитов Р.М., Гариб Ф.Ю. Иммунология: атлас. 2-е изд., обновленное. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 416 с. [Khaitov R.M., Garib F.Yu. Immunology: Atlas. 2nd ed., updated]. Moscow: GEOTAR-Media, 2020. 416 p.

16. Шульженко А.Е., Щубелко 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.)]

17. Шульженко А.Е., Зуйкова И.Н. Персистирующая папилломавирусная инфекция: цитокиновый дисбаланс и подходы к терапии. Эффективная фармакотерапия // Акушерство и гинекология, 2013. № 2. С. 54-60. [Shulzhenko A.E., Zhukov I.N. Persistent papillomavirus infection: cytokine imbalance and approaches to therapy. Effective pharmacotherapy. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2013, no. 2, pp. 54-60. (In Russ.)]

18. Bellaminutti S., Seraceni S., de Seta F., Gheit T., Tommasino M., Comar M. HPV and Chlamydia trachomatis co-detection in young asymptomatic women from high incidence area for cervical cancer. *J. Med. Virol.*, 2014, Vol. 86, no. 11, pp. 1920-1925.

19. Cao T., Xing Y., Yang Y., Mei H.. Correlation between matrix metalloproteinase expression and activation of the focal adhesion kinase signaling pathway in herpes stromal keratitis. *Exp. Ther. Med.*, 2014, Vol. 7, Iss. 1, pp. 280-286.

20. Du X., Wang L., Li Q., Wu W. miR-130a/TGF- β 1 axis is involved in sow fertility by controlling granulosa cell apoptosis. *Theriogenology*, 2020, Vol. 157, pp. 407-417.

21. Marks E., Naudin C., Nolan G., Goggins B.J. Autoimmunity, IBD, and cancer Regulation of IL-12p40 by HIF controls Th1/Th17 responses to prevent mucosal inflammation. *Mucosal Immunol.*, 2017, Vol. 10, pp. 1224-1236.

22. Nongbuaab T., Guoa Y., Ntallarisa T., Rubérc M. Bull seminal plasma stimulates in vitro production of TGF- β , IL-6 and IL-8 from bovine endometrial epithelial cells, depending on dose and bull fertility. *J. Reprod. Immunol.*, 2020, Vol. 142, pp. 103-179.

23. Panatto D., Amicizia D., Bianchi S., Rosanna Frati E. Chlamydia trachomatis prevalence and chlamydial/HPV co-infection among HPV-unvaccinated young Italian females with normal cytology. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2015, Vol. 11, no. 1, pp. 270-276.

24. Poston T.B., Lee D.E., Darville T., Zhong W., Dong L., O'Connell C.M., Wiesenfeld H.C., Hillier S.L., Sempowski G.D., Zheng X. Cervical cytokines associated with chlamydia trachomatis susceptibility and protection. *J. Infect. Dis.*, 2019, Vol. 220, no. 2, pp. 330-339.

25. Shulzhenko A.L., Zuikova I.N. Genital herpes: clinical features, diagnosis, treatment. Cervix, vagina, vulva. Physiology, pathology, colposcopy, aesthetic correction. Guidelines for clinicians. Ed. S.I. Rogovskaya, E.V. Lipova. Moscow: StatusPraesens, 2014. pp. 456-475.

26. Zacharis K., Messini Ch.I., Anifandis G., Koukoulis G. Human papilloma virus (HPV) and fertilization: A mini review. *Medicina (Kaunas)*, 2018, Vol. 54, Iss. 4, 50. doi: 10.3390/medicina54040050.

27. Zheng X., O'Connell C.M., Zhong W. Discovery of blood transcriptional endotypes in women with pelvic inflammatory disease. *J. Immunol.*, 2018, no. 200, pp. 2941-2956.

Авторы:

Невежкина Т.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

Authors:

Nevezhkina T.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

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

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

Тулупова М.С. — к.м.н., главный врач ООО «Парацельс», г. Владивосток, Россия

Tulupova M.S., PhD (Medicine), Chief Physician, Paracelsus LLC, Vladivostok, Russian Federation

Матюшкина Л.С. — к.м.н., доцент, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Matyshkina L.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Obstetrics and Gynecology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 14.05.2022
Принята к печати 29.05.2022

Received 14.05.2022
Accepted 29.05.2022

ПАМЯТИ ИРИНЫ СОЛОМООНОВНЫ ФРЕЙДЛИН



Российская наука понесла тяжелую утрату. 23 января 2024 г. ушла из жизни доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ Ирина Соломоновна Фрейдлин.

И.С. Фрейдлин родилась 7 марта 1936 г. в Ленинграде. В 1959 г. она окончила Первый Ленинградский медицинский институт им. акад. И.П. Павлова по специальности «Лечебное дело». В стенах этого учебного заведения Ирина Соломоновна начала свою научную деятельность, обучалась в аспирантуре при кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии и в 1961 г. успешно защитила кандидатскую диссертацию «Фагоцитоз в противомикробной защите». Дальнейшая научно-педагогическая деятельность И.С. Фрейдлин также была тесно связана с Первым Санкт-Петербургским государственным медицинским университетом им. И.П. Павлова. С 1961 г. на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии И.С. Фрейдлин занимала должность ассистента, доцента (с 1968 г.) и профессора (с 1987 г.). В 1974 г. она успешно защитила докторскую диссертацию «Функции макрофагов и иммуногенез».

Все иммунологи страны знали Ирину Соломоновну как яркого специалиста и педагога. Ее многочисленные труды затрагивали разные области иммунологии и всей медицины. Они всегда были связаны с самыми актуальными и значимыми для фундаментальной науки и клиники проблемами, которые оказывались в разные годы в фокусе всеобщего внимания исследователей по всему миру. Уникальность подхода Ирины Соломоновны к решению любой научной проблемы состояла в ее удивительном даре сочетать в проводимых исследованиях огромную широту, видение самых далеких горизонтов любой проблемы с предельной методической тщательностью и бескомпромиссностью в анализе полученных результатов. Она порой вспоминала, что этот стиль был привит ей уже в самом начале ее научного пути, сразу после окончания Первого Ленинградского медицинского института,

во время стажировки по инфекционной иммунологии в Институте Пастера в Париже, куда она поехала по приглашению великого Пьера Грара.

Работы 1960-1970-х гг., посвященные системе моноклеарных фагоцитов, намного опередили свое время. Сама постановка вопроса об огромной роли врожденного иммунитета в развитии всех форм иммунитета приобретенного казалась парадоксальной в то время, когда только формировались первые концепции межклеточной кооперации. Но развитие мировой науки, в том числе труды Ирины Соломоновны, в последующие годы доказали справедливость этого подхода и ее талант научного предвидения, когда на рубеже тысячелетий Ч. Дженуэем и Р. Меджитовым были раскрыты механизмы активации макрофагов и их регуляторных воздействий на формирование реакций приобретенного иммунитета.

В 1970-е гг. И.С. Фрейдлин организовала факультативный курс по фундаментальной и клинической иммунологии, который регулярно читала для студентов на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии (до 2015 г.), в дальнейшем (с 2015 г.) — на кафедре иммунологии ПСПБГМУ им. И.П. Павлова.

Не менее важное место в жизни И.С. Фрейдлин занимал Институт экспериментальной медицины. В июне 1991 г. И.С. Фрейдлин возглавила отдел иммунологии Института, научный фундамент которого был заложен академиком РАМН В.И. Иоффе. Научный потенциал и организаторский талант Ирины Соломоновны придали мощный импульс развитию отдела, которым она руководила на протяжении 23 лет — до 2014 г., после чего продолжила работу в Институте в должности главного научного сотрудника.

Именно с периодом работы Ирины Соломоновны в Институте экспериментальной медицины связаны ее важнейшие успехи и достижения. Труды И.С. Фрейдлин внесли огромный вклад в развитие фундаментальных представлений о функционировании иммунной системы. Работы учеников ее школы легли в основу концепции сетевой цитокиновой регуляции, ставшей мейнстримом фундаментальной иммунологии и чрезвычайно востребованной всеми клиницистами. В 1997 г. И.С. Фрейдлин была удостоена почетного звания «Заслуженный деятель науки Российской Федерации», в 1999 г. ее избрали членом-корреспондентом Российской академии медицинских наук, с 2014 г. она стала членом-корреспондентом Российской академии наук.

В 1997 г. И.С. Фрейдлин стала первым председателем Правления Санкт-Петербургского регионального отделения Российской Ассоциации аллергологов и клинических иммунологов и возглавляла эту организацию более четверти века. Последние 30 лет входила в состав Президиума Российского Научного Общества Иммунологов. В 1999 г. И.С. Фрейдлин организовала и по настоящее время являлась главным редактором научного журнала «Медицинская иммунология», членом редколлегий журналов «Цитокины и воспаление», «Иммунология», «Российский иммунологический журнал», «Инфекция и иммунитет».

Благодаря ее инициативе в Санкт-Петербурге стали регулярно проводить масштабные иммунологические форумы. При этом она не оставляла преподавательскую деятельность, которую искренне любила и считала едва ли не главным делом своей жизни. Несмотря на сложный период в жизни страны и падение престижа научной работы, она смогла обеспечить приток научной молодежи, укрепить материально-техническую базу исследований, создать новые направления научной работы. Ирина Соломоновна создала научную школу по иммунологии, которая многие годы была одной из ведущих в стране. При ее научном консультировании и научном руководстве было выполнено 6 докторских и 28 кандидатских диссертаций. Ее ученики работают в ведущих научных и клинических центрах нашей страны и за рубежом. До последних лет своей жизни она продолжала читать блестящие лекции для заинтересованных в получении знаний студентов профильных вузов. И.С. Фрейдлин является автором и соавтором более 235 печатных работ в ведущих отечественных и зарубежных журналах, 12 монографий и 5 учебников.

Все, кто имел счастье вместе работать и общаться с Ириной Соломоновной, знают, сколь интересным и вдохновляющим было это общение. Будучи жителем блокадного Ленинграда и пережив ужасы первой блокадной зимы, она не понаслышке знала, насколько важны подбадривающее слово или дружеский совет в трудную минуту. Любой сотрудник отдела мог рассчитывать на реальную помощь и поддержку со стороны Ирины Соломоновны в научных и в житейских делах. Ее открытость для общения, неподдельная доброта и высочайший уровень культуры располагали к ней всех собеседников. Особой поддержкой И.С. Фрейдлин всегда пользовалась научная молодежь.

Светлая память об Ирине Соломоновне Фрейдлин навсегда останется в сердцах коллег, учеников, близких людей. Ее научное наследие войдет в золотой фонд российской и мировой иммунологии.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://rusimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Российский иммунологический журнал» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше. Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную

информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64–69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64–69. (In Russ.)]

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503–5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем

количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота – 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца – 82 мм, для 2 столбцов – 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарицательные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Российский иммунологический журнал» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Рукопись может быть возвращена авторам, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Российский иммунологический журнал» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии.

Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.

2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.

3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:

1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):

- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).

- Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).

- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.

- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.

- Полное название статьи, направляемой в редакцию.

- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.

- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.

- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);

- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);

- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (В случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное

учреждение. Для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);

• сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);

• не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках (на русском и английском языках);

• адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).

6) Файл в формате .doc, .docx, ttf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, в начале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) — редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

4. Текст набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям, описанным в Правилах для авторов, расположенных на странице «О Журнале».

6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать из раздела Рецензирование, на странице «О Журнале».

Авторские права

Авторы, публикующие в данном журнале, соглашаются со следующим:

1. Авторы сохраняют за собой авторские права на работу и предоставляют журналу право первой публикации работы на условиях лицензии Creative Commons Attribution License, которая позволяет другим распространять данную работу с обязательным сохранением ссылок на авторов оригинальной работы и оригинальную публикацию в этом журнале.

2. Авторы сохраняют право заключать отдельные контрактные договоренности, касающиеся неэксклюзивного распространения версии работы в опубликованном здесь виде (например, размещение ее в институтском хранилище, публикацию в книге), со ссылкой на ее оригинальную публикацию в этом журнале.

3. Авторы имеют право размещать их работу в сети Интернет (например, в институтском хранилище или персональном сайте) до и во время процесса рассмотрения ее данным журналом, так как это может привести к продуктивному обсуждению и большему количеству ссылок на данную работу (См. The Effect of Open Access).

Приватность

Имена и адреса электронной почты, введенные на сайте этого журнала, будут использованы исключительно для целей, обозначенных этим журналом, и не будут использованы для каких-либо других целей или предоставлены другим лицам и организациям.

Вы можете оформить подписку на журнал «Российский иммунологический журнал» через отделения связи:

Каталог «Пресса России» — индекс 15590.

Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Антонов А.В.	33	Иванова И.С.	95	Рыков М.Ю.	85
Ахматова Э.А.	15	Иванова О.Н.	95	Савченко А.А.	59
Байрамов П.В.	33	Иккес Л.А.	59	Самойликов П.В.	23
Беленюк В.Д.	59	Калиниченко Е.О.	15	Синицкая А.В.	71
Бирулина Ю.Г.	101	Кныш С.В.	109	Сорокина Е.В.	15
Бишева И.В.	15	Колпинский Г.И.	33	Столпникова В.Н.	15
Борисов А.Г.	59	Конаныхина С.Ю.	23	Сходова С.А.	15
Васильева Г.В.	23	Мамаева Т.А.	49	Топтыгина А.П.	49
Вержбицкая Н.Е.	33	Маркелова Е.В.	109	Трубачева О.А.	101
Гейн С.В.	7	Мартынова Г.П.	59	Тулупова М.С.	109
Глушков А.Н.	33	Матюшкина Л.С.	109	Чумакова С.П.	101
Гордеева Л.А.	33	Метельская В.А.	49	Шабалдин А.В.	71
Гришачева Е.О.	71	Невежкина Т.А.	109	Шабалина Е.В.	71
Гусакова А.М.	101	Петрова И.В.	101	Шаравьева И.Л.	7
Деева Н.С.	71	Поддубиков А.В.	23	Шмулевич С.А.	71
Долгополов И.С.	85	Поленок Е.Г.	33	Шнайдер О.Л.	101
Жердева П.Е.	49	Рубальская Т.С.	49		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

агрегация	102	рак молочной железы	34
адоптивная терапия аллогенными клетками	85	сероводород	102
анти-антитела	34	соя	24
антитела	34, 49, 72	спелеотерапия	95
астроцитомы	85	спленоциты	8
биомаркеры	102	степень avidности IgG	49
бронхиальная астма	95	стероидные рецепторы	34
вирус папилломы человека	110	тромбоцит	102
возраст детей	60	фагоцитоз	8
воспаление	16	фенотип	60
врожденные пороки сердца	72	фракции гамма-глобулина	72
вторичный тип иммунного ответа	49	функциональная активность	60
глиобластома	85	холодовой стресс	8
дендритная вакцина	85	цитокины	16, 110
имиквимод	16	экспрессия рецепторов	60
иммунотерапия	85	эстрадиол	34
инфекционный мононуклеоз	60	эффективность	95
ИФА	49	Gly m 4	24
ишемическая болезнь сердца	102	Gly m 5	24
корь	49	Gly m 6	24
лечение	95	HLA-DR	72
мышцы	8	HLA-G	72
нейтрофилы	60	IFN γ	8
опиоидные рецепторы	8	IgE	24
пациент	95	IgG	49
первичный тип иммунного ответа	49	IgM	49
перекрестная реакция	24	IL-2	8
поликлиника	95	IL-4	8
прегравидарная подготовка	110	Inosine pranobex	110
прогестерон	34	Solanum tuberosum	110
противовирусная терапия	110	Toll-like рецепторы	16
псориаз	16		

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ПОЛУЧЕНИЕ ДОНОРСКОГО ГАММА-ГЛОБУЛИНА ОТ МНОГОРОЖАВШИХ ЖЕНЩИН И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ЭКСПРЕССИЮ МОЛЕКУЛ HLA-G И HLA-DR ЛИМФОЦИТОВ ЖЕНЩИН, ИМЕЮЩИХ ДЕТЕЙ С СЕПТАЛЬНЫМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА» (АВТОРЫ: ШАБАЛДИН А.В., СИНИЦКАЯ А.В., ШМУЛЕВИЧ С.А., ГРИШАЧЕВА Е.О., ШАБАЛДИНА Е.В., ДЕЕВА Н.С. [с. 71-84])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "ISOLATION OF DONOR GAMMA GLOBULIN OBTAINED FROM MULTIPAROUS WOMEN AND ITS EFFECTS UPON EXPRESSION OF HLA-G AND HLA-DR MOLECULES ON LYMPHOCYTES FROM MOTHERS OF CHILDREN WITH SEPTAL CONGENITAL HEART DEFECTS" (AUTHORS: SHABALDIN A.V., SINITSKAYA A.V., SHMULEVICH S.A., GRISHACHEVA E.O., SHABALDINA E.V., DEEVA N.S. [pp. 71-84])

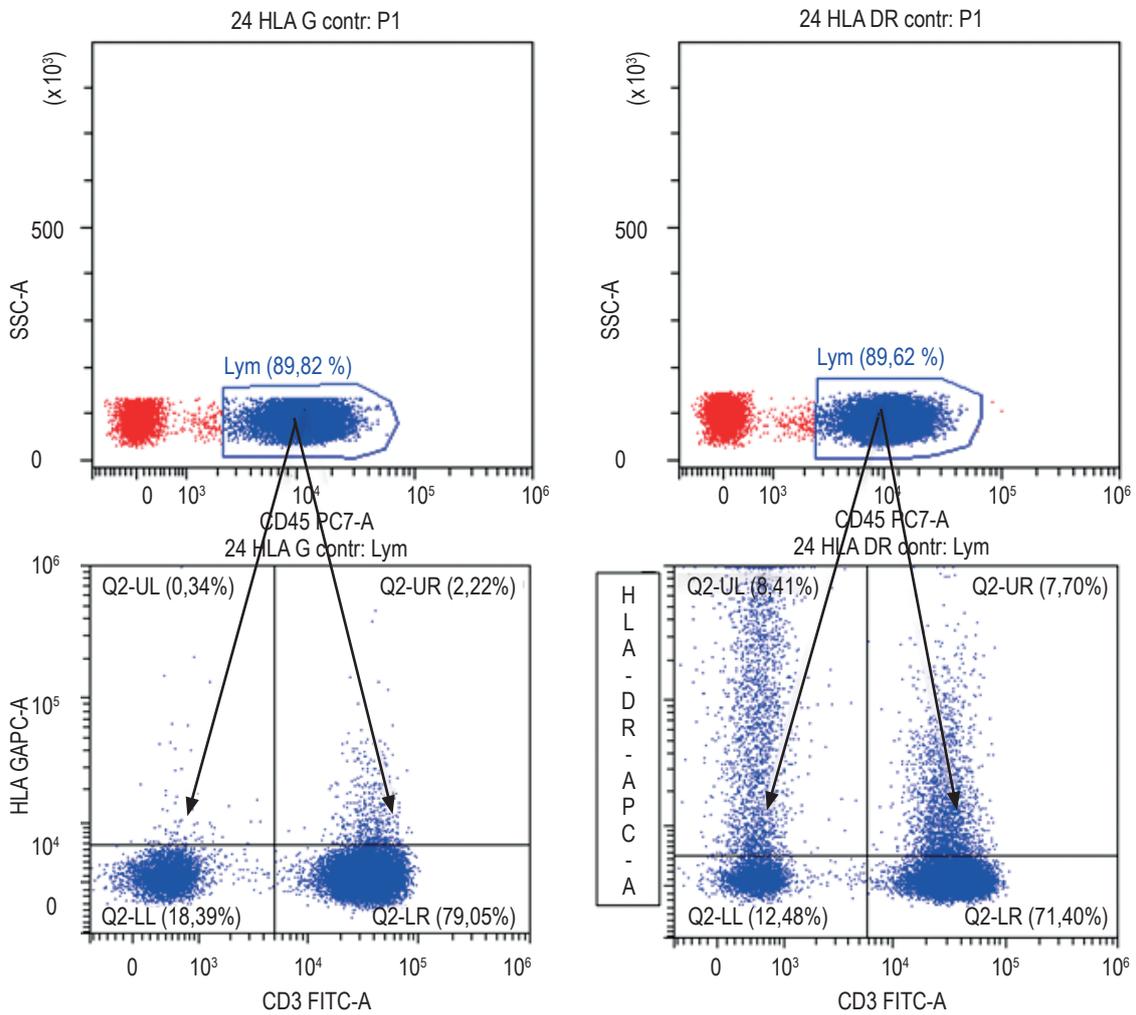


Рисунок 5. Протокол проточной цитофлуометрии для анализа экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин и детей в полной среде (сбор клеток прекращался при достижении 10 000 лимфоцитов по гейту SSC-A/CD45 PC-7A)

Figure 5. Flow cytometry protocol for analyzing the expression of HLA-G and HLA-DR molecules on lymphocytes from women and children in complete medium (cell collection stopped when reaching 10,000 lymphocytes using the SSC-A/CD45 PC-7A gate)

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
ПРЕССА РОССИИ – 15590**

ISSN 1028-7221



9 771234 567898