

Том 27, № 2. С. 125-404

**2024**

Официальный журнал  
Российского Научного Общества Иммунологов

**РОССИЙСКИЙ  
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ  
ЖУРНАЛ**



**RUSSIAN JOURNAL  
OF IMMUNOLOGY**

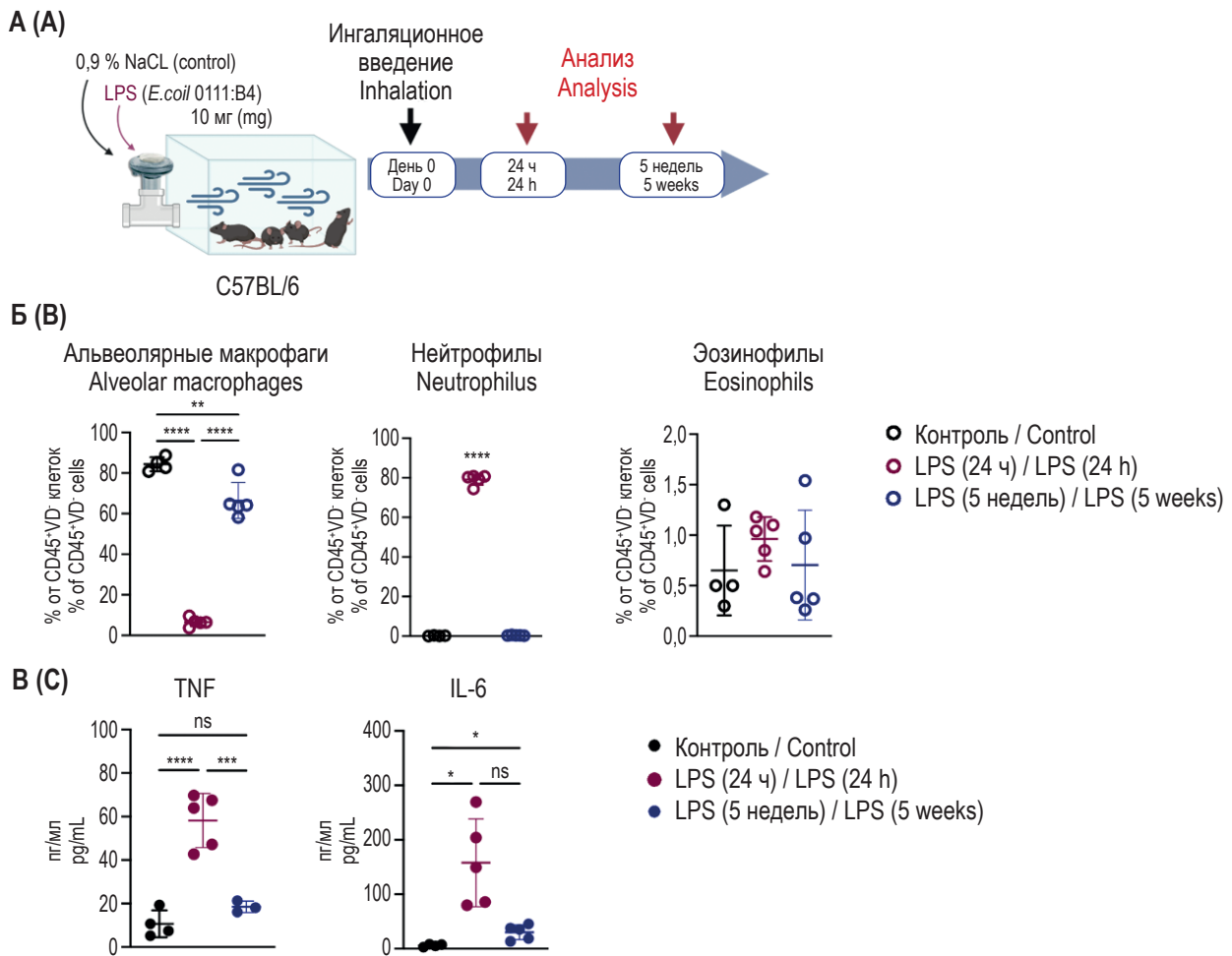
Official Journal  
of Russian Society of Immunology

Volume 27  
Number 2

**2024**

**ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА У МЫШЕЙ, ИНДУЦИРОВАННАЯ ПОСРЕДСТВОМ АЭРОЗОЛЬНОЙ ДОСТАВКИ LPS» (АВТОРЫ: НАМАКАНОВА О.А., ГУБЕРНАТОРОВА Е.О., ЧИЧЕРИНА Н.Р., ЗВАРЦЕВ Р.В., ДРУЦКАЯ М.С. [с. 145-150])**

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "EXPERIMENTAL MOUSE MODEL OF PULMONARY FIBROSIS INDUCED BY NEBULIZED LPS ADMINISTRATION" (AUTHORS: NAMAKANOVA O.A., GUBERNATOROVA E.O., CHICHERINA N.R., ZVARTSEV R.V., DRUTSKAYA M.S. [pp. 145-150])



**Рисунок 1. Воспалительный профиль в легких через 24 ч и 5 недель после однократного ингаляционного введения LPS**

Примечание. А – схема эксперимента. Мышей линии C57BL/6 подвергали ингаляционному воздействию 5 мл LPS в концентрации 2 мг/мл до полного распыления раствора в течение 30 минут, а также 5 мл физраствора (0,9% NaCl) в качестве контроля. В эксперименте участвовало три группы мышей: контрольная группа (через 24 ч после введения физраствора); группа мышей для оценки кратковременных эффектов (через 24 ч после введения LPS); а также группа мышей для исследования долгосрочных эффектов (через 5 недель после введения LPS). Б – процентное содержание альвеолярных макрофагов (SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>), эозинофилов (SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) и нейтрофилов (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) от CD45<sup>+</sup>VD<sup>-</sup> клеток в БАЛ, вызванное воздействием LPS. В – уровень продукции TNF и IL-6 (пг/мл) в БАЛ после аэрозольного введения LPS. Статистический анализ проведен с помощью one-way ANOVA теста, \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01; \*\*\* – p < 0,001; \*\*\*\* – p < 0,0001; ns – нет различия.

Figure 1. Lung inflammatory profile in 24 h and 5 weeks after a single inhalation of LPS

Note. A, scheme of the experiment. C57BL/6 mice were inhaled with 5 mL of LPS at a concentration of 2 mg/mL until the solution was completely nebulized for 30 min. Saline (0, 9% NaCl) was administered as a control. Three study groups were designed as follows: control group (24 h after saline administration), a group of mice for evaluation of short-term effects (24 h after LPS administration) and mice for evaluation of long-term effects (5 weeks after LPS injection). B, frequencies (%) of alveolar macrophages (SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>), neutrophils (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) and eosinophils (SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) gated on CD45<sup>+</sup>VD<sup>-</sup> live cells in BALF caused by nebulized LPS. C, protein levels of TNF and IL-6 (pg/mL) in BALF after LPS administration. \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001; \*\*\*\*, p < 0.0001; ns, non-significant (one-way ANOVA test was used).

РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ИММУНОЛОГОВ  
(РНОИ)

---

# РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

апрель-июнь

**2024, том 27**

**№. 2**

---

Основан в 1996 году

## Главный редактор

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

## Заместитель главного редактора

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

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

## Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

**Купраш Дмитрий Владимирович** – член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук, Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгарда РАН, лаборатория передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, главный научный сотрудник, МГУ имени Ломоносова, профессор кафедры иммунологии, Москва, Россия

**Лагарькова Мария Андреевна** – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор МГУ имени М.В. Ломоносова, заведующая лабораторией клеточной биологии Федерального научно-клинического Центра физико-химической медицины, Москва, Россия

**Лядова Ирина Владимировна** – доктор медицинских наук, Центральный НИИ туберкулеза, заведующая лабораторией биотехнологии отдела иммунологии, Москва, Россия

**Невинский Георгий Александрович** – профессор, доктор химических наук, заведующий лабораторией ферментов репарации Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

**Недоспасов Сергей Артурович** – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии МГУ имени М.В. Ломоносова и заведующий отделом молекулярной иммунологии в Институте физико-химической биологии имени Белозерского МГУ, Москва, Россия

**Петров Рэм Викторович** – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунологии Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

**Полторах Александр** – профессор, Школа биомедицинских наук имени Саклера, Университет Тафтса, Бостон, США

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Ответственные секретари:

Ризопулу А.П., д.б.н. (Москва)

Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)

E-mail: rusimmun@gmail.com

## Редактор перевода:

Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)

## Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

**Редакция:** тел./факс (812) 233-08-58

## Адрес для корреспонденции:

Редакция журнала «Российский иммунологический журнал»

197101, Санкт-Петербург, а/я 130

**Электронная версия:** www.rusimmun.ru

© Российский иммунологический журнал

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

Данный материал распространяется по лицензии

Creative Commons Attribution 4.0 License.

**Хайдуков Сергей Валерьевич** – доктор биологических наук, ФГБУН Институт 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

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

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

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

**Топтыгина Анна Павловна** – доктор медицинских наук, НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, заведующая лабораторией цитокинов, ведущий научный сотрудник, Москва, Россия

**Тузанкина Ирина Александровна** – доктор медицинских наук, профессор, Институт иммунологии и физиологии УРО РАН, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления; главный детский иммунолог-аллерголог Минздрава Свердловской области; руководитель регионального Центра клинической иммунологии, Екатеринбург, Россия

**Тутельян Алексей Викторович** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией госпитальных инфекций и эпидемиологического анализа, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

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

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

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

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

## Издательство «Человек»

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

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 21.06.2024 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 35. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.)

Заказ № 048

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 научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук», а также в базу Russian Science Citation Index (RSCI), полностью интегрированную с платформой Web of Science**

RUSSIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY  
(RSI)

---

**RUSSIAN  
JOURNAL OF IMMUNOLOGY**

**ROSSIYSKIY  
IMMUNOLOGICHESKIY  
ZHURNAL**

April-June

**2024, volume 27**

**No. 2**

---

Published since 1996

## Editor-in-chief

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

## Deputy Editor-in-Chief

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

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

## Editorial board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Managing Editors:

Anna Rizopulu, PhD (Biology) (Moscow)

Natalia Rakitianskaia, (St. Petersburg)

E-mail: rusimmun@gmail.com

## Translation editor:

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 21.06.2024. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 35. Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> 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

### Краткие сообщения

Бязрова М.Г., Сухова М.М., Михайлов А.А., Прилипов А.Г., Филатов А.В. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПЕРВИЧНЫХ В-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ В ЗАРОДЫШЕВЫХ ЦЕНТРАХ .....	133
Журавлев А.Д., Верховая С.С., Кубекина М.В. ЦИБРИДНЫЕ ЛИНИИ НА ОСНОВЕ TNR-1 С РАЗЛИЧНЫМ МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ ГЕНОМОМ ИМЕЛИ РАЗНЫЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ .....	139
Намаканова О.А., Губернаторова Е.О., Чичерина Н.Р., Зварцев Р.В., Друцкая М.С. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА У МЫШЕЙ, ИНДУЦИРОВАННАЯ ПОСРЕДСТВОМ АЭРОЗОЛЬНОЙ ДОСТАВКИ LPS .....	145
Уракова М.А., Мустаев В.Р., Каримова Г.Р., Кузнецова М.Г., Рахматуллина Э.Н., Оленева С.А., Уракова К.В. СУРФАКТАННАЯ СИСТЕМА ЛЕГКИХ ПРИ АНТИФОСФОЛИПИДНОМ СИНДРОМЕ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ ИММУНОСУПРЕССОРА FTY-720 .....	151
Григорьева Е.А., Гордова В.С., Сергеева В.Е., Смородченко А.Т., Смирнова Н.В. АВИДИН-ПОЗИТИВНЫЕ ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВОДОРАСТВОРИМОГО КРЕМНИЯ В ТЕЧЕНИЕ ДЕВЯТИ МЕСЯЦЕВ .....	157
Саркисян Н.Г., Катаева Н.Н., Хохрякова Д.А., Меликян А.Г., Осипова И.М. АНАЛИЗ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛЮСТИ КРЫСЫ В МОДЕЛИ ПАРОДОНТИТА .....	161
Долматова Л.С., Караулова Е.П. ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ГОЛОТУРИЙ С ПОВЕРХНОСТНОЙ РАНОЙ НА АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ .....	167
Жданова О.Б., Андреев О.Н., Мартусевич А.К., Часовских О.В. К ВОПРОСУ ОБ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ИНВАЗИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ ПРИ НЕМАТОДОЗАХ .....	175
Костоломова Е.Г., Лозовая П.Б., Полянских Е.Д., Тимохина Т.Х., Паромова Я.И. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СУПЕРНАТАНТОВ <i>BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM</i> И КЛЕТОК КУРИНОГО ЭМБРИОНА НА МОДЕЛИ ОПИСТОРХОЗНОЙ ИНВАЗИИ .....	181
Насибов Т.Ф., Горохова А.В., Порохова Е.Д., Старосветская А.А., Бариев У.А., Носов В.Е., Литвинова Л.С., Авдеева Е.Ю., Белоусов М.В., Хлусов И.А. МОДЕЛИРОВАНИЕ <i>IN SITU</i> И <i>IN SILICO</i> ГЕМОПОЭЗИНДУЦИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ХЕЛИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ .....	187
Гейн С.В., Кадочникова Я.А. ВЛИЯНИЕ ЭНДОМОРФИНОВ-1, 2 НА ОСОБЕННОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ Т- И В-ЛИМФОЦИТАМИ <i>IN VIVO</i> .....	197
Куклина Е.М. МЕХАНИЗМЫ ROR $\alpha$ -ЗАВИСИМЫХ ЭФФЕКТОВ МЕЛАТОНИНА .....	203
Королевская Л.Б., Шмагель К.В. ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ CD4 <sup>+</sup> Т-ЛИМФОЦИТОВ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ .....	207
Зотова Н.В., Журавлева Ю.А. МАРКЕРЫ СИСТЕМНОЙ АКТИВАЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ В ОЦЕНКЕ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ .....	213
Чудаков Д.Б., Шустова О.А., Коновалова М.В., Величинский Р.А., Фаттахова Г.В. ИНГИБИРОВАНИЕ TLR4 И NLRP3-РЕЦЕПТОРОВ УСИЛИВАЕТ ПРОДУКЦИЮ АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE-АНТИТЕЛ В МОДЕЛЯХ АЛЛЕРГИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОДКОЖНОГО И ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ АНТИГЕНА СООТВЕТСТВЕННО .....	219
Иванова О.Н., Иванова И.С. АЛЛЕРГИЯ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ (НА ПРИМЕРЕ КЛИНИЧЕСКОГО НАБЛЮДЕНИЯ) .....	227
Соколова Т.Ф., Щеглова Е.Л., Соколов Е.Ю., Емельянов Ю.В. ВЫЯВЛЕНИЕ IgE-ОПОСРЕДОВАННОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ У ДЕТЕЙ МЕТОДАМИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО И ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА .....	231
Терещенко С.Ю., Смольникова М.В., Горбачева Н.Н. РАСТВОРИМЫЙ РЕЦЕПТОР КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ КАК НОВЫЙ БИОМАРКЕР БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ: КРАТКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ .....	237
Кологривова И.В., Дмитриюков А.А., Нарыжная Н.В., Кошельская О.А., Харитонова О.А., Выросткова А.И., Евтушенко В.В., Крапивина А.С., Рябченко П.Е., Сусллова Т.Е. СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ В ЭПИКАРДИАЛЬНОЙ, ТИМУСНОЙ И ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ ВЫРАЖЕННОМ КОРОНАРНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА .....	243
Киселева Д.Г., Зиганшин Р.Х., Фотин Д.П., Маркин А.М. ПРОАТЕРОГЕННЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ЛПНП, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ: ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ .....	253
Кириченко Т.В., Юдина И.Ю., Лукина М.В., Андрущишина Т.Б., Живодерников И.В., Маркина Ю.В. ВЛИЯНИЕ ПРИЕМА СТАТИНОВ НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ МОНОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ .....	259

Сафронова Э.А. <b>ДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ В-ЛИМФОЦИТОВ С ФЕНОТИПОМ CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>, БОЛЕВШИХ И НЕ БОЛЕВШИХ COVID-19</b> .....	267
Борукаева И.Х., Абазова Э.Х., Иванов А.Б., Шагаумов К.Ю., Шаваева Ф.В., Молов А.А., Тхабисимова И.К., Кипкеева Т.Б., Шокуева А.Г., Ашагре С.М., Лигидова Д.Р., Кузотов А.М. <b>ВЛИЯНИЕ ИНТЕРВАЛЬНОЙ ГИПОКСИТЕРАПИИ НА ИММУННЫЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ</b> .....	273
Жиемуратова Г.К., Арипова Т.У., Камалов З.С., Мамбеткаримов Г.А. <b>ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ ЖЕЛЕЗА И ИММУННЫМИ ДИСФУНКЦИЯМИ У ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ РЕГИОНА ПРИАРАЛЬЯ</b> .....	281
Каббани М.С., Щёголева Л.С., Шашкова Е.Ю. <b>СООТНОШЕНИЕ ИММУННЫХ ИНДЕКСОВ У ЖЕНЩИН СЕМИАРИДНОГО РЕГИОНА</b> .....	287
Лысенко О.В., Бресский А.Г., Огризко И.Н. <b>ИММУНОТЕРАПИЯ – НОВАЯ ВОЗМОЖНОСТЬ ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОК С «ТОНКИМ» ЭНДОМЕТРИЕМ В ЦИКЛАХ ПЕРЕНОСА РАЗМОРОЖЕННЫХ ЭМБРИОНОВ</b> .....	293
Тюмина О.В., Давыдкин И.Л., Гриценко Т.А., Трусова Л.М., Тюмин И.В., Богош В.В., Соколова В.В., Гусарова Е.А., Чибашова А.В., Лимарева Л.В. <b>ТРАНСФУЗИЯ АЛЛОГЕННОЙ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТАМ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ: АНАЛИЗ БЕЗОПАСНОСТИ И ВЛИЯНИЕ НА ИММУНОФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В РАННИЙ ПЕРИОД</b> .....	299
Нестерова И.В., Ковалева С.В., Пиктурно С.Н., Чулкова А.М., Куранова Н.Н., Пирогова А.И., Поезжаев Е.А. <b>ПЛЕЙОТРОПНОСТЬ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ВЛИЯНИЙ СИНТЕТИЧЕСКОГО ТИМИЧЕСКОГО ГЕКСАПЕПТИДА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ИММУНОКОМПРОМИТИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН</b> .....	307
Челурнова Н.С., Кныш С.В., Ющук В.Н., Лебедев С.В., Харченко А.А. <b>УРОВЕНЬ НЕКОТОРЫХ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С ИХ ГЕНЕТИЧЕСКИМ ПОЛИМОРФИЗМОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА</b> .....	317
Агеева Е.С., Аблаева Р.Н., Рымаренко Н.В., Белоглазов В.А., Яцков И.А., Жукова А.А. <b>ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ C-589T IL4 И G-1082A IL10 У ДЕТЕЙ С НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ</b> .....	323
Быков Ю.В., Быкова А.Ю., Беккер Р.А. <b>АУТОИММУННО ОБУСЛОВЛЕННОЕ СУИЦИДАЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ</b> .....	329
Маркова Е.В., Княжева М.А. <b>ЦЕНТРАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ МОДУЛИРОВАННЫХ EX VIVO КОФЕИНОМ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В МЕХАНИЗМАХ РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОГО ПОВЕДЕНИЯ</b> .....	335
Пашнин С.Л., Давыдова Е.В., Альтман Д.Ш. <b>НЕЙРОЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ ВЕТЕРАНОВ СОВРЕМЕННЫХ БОЕВЫХ КОНФЛИКТОВ С ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИМ СТРЕССОВЫМ РАССТРОЙСТВОМ</b> .....	343
Савчук К.С., Рябова Л.В. <b>НАРУШЕНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИЕЙ</b> .....	351
Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Шарафетдинов Х.Х. <b>АКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ АЛИМЕНТАРНО-ЗАВИСИМЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ (ОЖИРЕНИЕМ, САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА)</b> .....	357
Ручкин М.П., Маркелова Е.В., Федяшев Г.А. <b>СИСТЕМНЫЙ ДИСБАЛАНС ИЗОФОРМ TGF-<math>\beta</math> У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ</b> .....	363
Бельтюков П.П., Токарев А.Ю., Смирнова А.С., Бельтюкова М.Е. <b>О СВЯЗИ МЕЖДУ УРОВНЯМИ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ КОМПЛЕМЕНТА</b> .....	369
Осиков М.В., Коробкин Е.А., Федосов А.А., Димов Г.П. <b>ВЗАИМОСВЯЗЬ ФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ПРИЗНАКОВ ОСТЕОПЕНИИ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ</b> .....	375
Богомолова И.А., Долгова Д.Р., Антонеева И.И., Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Удалов Ю.Д. <b>ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ФАКТОРА РОСТА ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ НЕМЕТАСТАТИЧЕСКОМ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ</b> .....	383
Саркисян Н.Г., Тузанкина Н.А., Катаева Н.Н., Меликян А.Г., Осипова И.М. <b>ЗУБОЧЕЛЮСТНЫЕ АНОМАЛИИ ПРИ ВРОЖДЕННЫХ ОШИБКАХ ИММУНИТЕТА</b> .....	391
Головизнин М.В., Моисеев В.И., Тимофеев В.Т., Лахонина Н.С., Булдакова Ю.Р. <b>ИММУНОЛОГИЯ В МИРЕ ИДЕЙ И В МИРЕ ВЕЩЕЙ: ЭВОЛЮЦИОННЫЙ СПУСК И ПРОБЛЕМЫ СКОНСТРУИРОВАННОЙ РЕАЛЬНОСТИ</b> .....	397
<b>АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ</b> .....	403
<b>ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ</b> .....	404



## CONTENTS

### Short communications

<i>Byazrova M.G., Sukhova M.M., Mikhailov A.A., Prilipov A.G., Filatov A.V.</i> <b>GENETIC MODIFICATION OF PRIMARY HUMAN B CELLS TO MODEL THE PROCESS OF B CELL DEVELOPMENT IN GERMINAL CENTERS</b> .....	133
<i>Zhuravlev A.D., Verkhova S.S., Kubekina M.V.</i> <b>THP1-BASED CYBRID CELLS WITH VARIOUS MTDNA MUTATIONS DIFFER BY THE ABILITY TO FORM INFLAMMATORY RESPONSE</b> .....	139
<i>Namakanova O.A., Gubernatorova E.O., Chicherina N.R., Zvartsev R.V., Drutskaya M.S.</i> <b>EXPERIMENTAL MOUSE MODEL OF PULMONARY FIBROSIS INDUCED BY NEBULIZED LPS ADMINISTRATION</b> .....	145
<i>Urakova M.A., MustaeV V.R., Karimova G.R., Kuznetsova M.G., Rakhmatullina E.N., Oleneva S.A., Urakova K.V.</i> <b>SURFACTANT SYSTEM OF THE LUNGS IN ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME UNDER THE CONDITIONS OF ADMINISTRATION OF THE IMMUNOSUPPRESSIVE AGENT FTY-720</b> .....	151
<i>Grigoryeva E.A., Gordova V.S., Sergeeva V.E., Smorodchenko A.T., Smirnova N.V.</i> <b>AVIDIN-POSITIVE MAST CELLS OF THE LIVER WHEN EXPOSED TO WATER-SOLUBLE SILICON FOR NINE MONTHS</b> .....	157
<i>Sarkisyan N.G., Kataeva N.N., Khokhryakova D.A., Melikyan A.H., Osipova I.M.</i> <b>ANALYSIS OF RAT JAW BONE TISSUE ELEMENTAL COMPOSITION IN A MODEL OF PERIODONTITIS</b> .....	161
<i>Dolmatova L.S., Karaulova E.P.</i> <b>EFFECT OF PROTEINS FROM THE COELOMIC FLUID OF SUPERFICIALLY WOUNDED HOLOTHURIANS ON THE ACTIVITY OF PHAGOCYTES</b> .....	167
<i>Zhdanova O.B., Andreyanov O.N., Martusevich A.K., Chasovskikh O.V.</i> <b>ON THE ISSUE OF EXPERIMENTAL MODELING OF INVASIONS AND PROSPECTS FOR THE USE OF IMMUNOSTIMULANTS IN NEMATODES</b> .....	175
<i>Kostolomova E.G., Lozovaya P.B., Polyanskikh E.D., Timokhina T.Kh., Paromova Ya.I.</i> <b>STUDYING THE ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM SUPERNATANTS AND CHICKEN EMBRYO CELLS ON A MODEL OF OPISTHOCHIC INVASION</b> .....	181
<i>Nasibov T.F., Gorokhova A.V., Porokhova E.D., Starosvetskaya A.A., Bariev U.A., Nosov V.E., Litvinova L.S., Avdeeva E.Yu., Belousov M.V., Khlusov I.A.</i> <b>IN SITU AND IN SILICO MODELING OF THE HEMATOPOIESIS-INDUCING EFFECT OF CHELIDONIC ACID</b> .....	187
<i>Gein S.V., Kadochnikova Ya.A.</i> <b>INFLUENCE OF ENDOMORPHINS-1, 2 ON GLUCOSE UPTAKE BY T- AND B-LYMPHOCYTES IN VIVO</b> .....	197
<i>Kuklina E.M.</i> <b>MECHANISMS OF ROR<math>\alpha</math>-DEPENDENT EFFECTS OF MELATONIN</b> .....	203
<i>Korolevskaya L.B., Shmagel K.V.</i> <b>FEATURES OF MITOCHONDRIAL STATE IN CD4<sup>+</sup>T LYMPHOCYTE SUBSETS</b> .....	207
<i>Zotova N.V., Zhuravleva Yu.A.</i> <b>MARKERS OF SYSTEMIC LEUKOCYTE ACTIVATION FOR ASSESSING ACUTE AND CHRONIC SYSTEMIC INFLAMMATION</b> .....	213
<i>Chudakov D.B., Shustova O.A., Konovalova M.V., Velichinskii R.A., Fattakhova G.V.</i> <b>INHIBITION OF TLR4 AND NLRP3 LEADS TO THE EXACERBATION OF IgE SPECIFIC ANTIBODIES IN MOUSE ALLERGIC MODELS BASED ON SUBCUTANEOUS OR INTRANASAL IMMUNIZATION RESPECTIVELY</b> .....	219
<i>Ivanova O.N., Ivanova I.S.</i> <b>ALLERGY IN HIV-INFECTED PATIENTS (ON THE EXAMPLE OF CLINICAL OBSERVATION)</b> .....	227
<i>Sokolova T.F., Scheglova E.L., Sokolov E.Yu., Emelyanov Yu.V.</i> <b>IDENTIFICATION OF IgE-MEDIATED SENSITIZATION IN CHILDREN BY ENZYME IMMUNOASSAY AND IMMUNOFLOURESCENCE METHODS</b> .....	231
<i>Tereshchenko S.Yu., Smolnikova M.V., Gorbacheva N.N.</i> <b>SOLUBLE RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS (SRAGE) AS A NEW BIOMARKER OF ASTHMA IN CHILDREN: A BRIEF REVIEW OF THE LITERATURE AND OUR OWN FINDINGS</b> .....	237
<i>Kologrivova I.V., Dmitriukov A.A., Naryzhnaya N.V., Koshelskaya O.A., Kharitonova O.A., Vyrostkova A.I., Evtushenko V.V., Krapivina A.S., Riabchenko P.E., Suslova T.E.</i> <b>LYMPHOCYTE SUBSETS IN EPICARDIAL, THYMIC AND SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE DURING ADVANCED CORONARY ATHEROSCLEROSIS IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE</b> .....	243
<i>Kiseleva D.G., Ziganshin R.Kh., Fotin D.P., Markin A.M.</i> <b>PROATHEROGENIC PROTEOMIC PROFILE OF LDL ISOLATED FROM PLASMA OF PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS: IMMUNOLOGICAL ASPECTS</b> .....	253
<i>Kirichenko T.V., Yudina I.Yu., Lukina M.V., Andrushchishina T.B., Zhivodernikov I.V., Markina Yu.V.</i> <b>EFFECT OF STATIN ADMINISTRATION ON THE INFLAMMATORY RESPONSE OF MONOCYTES IN PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS</b> .....	259

Safronova E.A. <b>DYNAMIC FEATURES OF THE HUMORAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME DEPENDING ON THE CONTENT OF B LYMPHOCYTES WITH THE CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> PHENOTYPE, WHO HAVE AND HAVE NOT COVID-19</b> .....	267
Borukaeva I.Kh., Abazova Z.Kh., Ivanov A.B., Shkhagumov K.Yu., Shavaeva F.V., Molov A.A., Tkhabisimova I.K., Kipkeeva T.B., Shokueva A.G., Ashagre S.M., Ligidova D.R., Kugotov A.M. <b>EFFECT OF INTERVAL HYPOXYTHERAPY ON THE IMMUNE STATUS OF HYPERTENSIVE PATIENTS</b> .....	273
Jiemuratova G.K., Aripova T.U., Kamalov Z.S., Mambetkarimov G.A. <b>INTERRELATIONS BETWEEN IRON CONTENT AND IMMUNE DYSFUNCTIONS IN FREQUENTLY ILL CHILDREN OF THE ARAL SEA REGION</b> .....	281
Kabbani M.S., Shchegoleva L.S., Shashkova E.Yu. <b>RATIO OF IMMUNE INDICES IN WOMEN OF THE SEMI-ARID REGION</b> .....	287
Lysenko O.V., Bresski A.G., Ogryzko I.N. <b>IMMUNOTHERAPY IS A NEW OPPORTUNITY FOR MANAGING PATIENTS WITH “THIN” ENDOMETRIUM IN CYCLES OF TRANSFER OF THAWED EMBRYOS</b> .....	293
Tyumina O.V., Gritsenko T.A., Davydkin I.L., Trusova L.M., Tyumin I.V., Bogush V.V., Sokolova V.V., Gusarova E.A., Chibashova A.V., Limareva L.V. <b>TRANSFUSION OF ALLOGENIC CORD BLOOD TO PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA: SAFETY ANALYSIS AND INFLUENCE ON THE IMMUNOPHENOTYPE OF BLOOD LYMPHOCYTES IN THE EARLY PERIOD</b> .....	299
Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Pikurno S.N., Chulkova A.M., Kuranova N.N., Pirogova A.I., Poezhaev E.A. <b>PLEIOTROPICITY OF IMMUNOMODULATING EFFECTS OF SYNTHETIC THYMIC HEXAPEPTIDE IN CHRONIC INFECTIOUS AND INFLAMMATORY DISEASES OF THE GENITAL TRACT IN IMMUNOCOMPROMIZED WOMEN</b> .....	307
Chepurnova N.S., Knysh S.V., Yushchuk V.N., Lebedev S.V., Kharchenko A.A. <b>LEVEL OF SOME MATRIX METALLOPROTEINASES IN BLOOD SERUM IN RELATION TO THEIR GENETIC POLYMORPHISM DEPENDING ON AGE</b> .....	317
Ageeva E.S., Ablaeva R.N., Rymarenko N.V., Beloglazov V.A., Yatskov I.A., Zhukova A.A. <b>FREQUENCY OF POLYMORPHISM OF THE C-589T IL4 AND G-1082A IL10 GENES IN CHILDREN WITH NEW CORONAVIRUS INFECTION</b> .....	323
Bykov Yu.V., Bykova A.Yu., Bekker R.A. <b>AUTOIMMUNE MEDIATED SUICIDAL BEHAVIOR</b> .....	329
Markova E.V., Knyazheva M.A. <b>CENTRAL EFFECTS OF EX VIVO CAFFEINE-MODULATED IMMUNE CELLS IN THE MECHANISMS OF EDITING DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOR</b> .....	335
Pashnin S.L., Davydova E.V., Altman D.Sh. <b>NEUROCYTOKINE BLOOD PROFILE OF VETERANS OF MODERN COMBAT CONFLICTS WITH POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER</b> .....	343
Savchuk K.S., Ryabova L.V. <b>DISTRIBUTION OF THE T CELL ELEMENT OF THE IMMUNE SYSTEM IN POST-COVID PATIENTS WITH FIRST IDENTIFIED HYPERGLYCEMIA</b> .....	351
Trushina E.N., Mustafina O.K., Sharafetdinov Kh.Kh. <b>ACTIVITY OF CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH NUTRITION-DEPENDENT DISEASES (OBESITY, TYPE 2 DIABETES)</b> .....	357
Ruchkin M.P., Markelova E.V., Fedyashev G.A. <b>SYSTEMIC IMBALANCE OF TGF-<math>\beta</math> ISOFORMS IN PATIENTS WITH VARIOUS MANIFESTATIONS OF DIABETIC RETINOPATHY</b> .....	363
Beltyukov P.P., Tokarev A.Yu., Smirnova A.S., Beltyukova M.E. <b>RELATIONSHIP BETWEEN SERUM URIC ACID LEVELS AND COMPLEMENT FUNCTIONAL ACTIVITY</b> .....	369
Osikov M.V., Korobkin E.A., Fedosov A.A., Dimov G.P. <b>RELATIONSHIP OF THE PHENOTYPE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AND SIGNS OF OSTEOPENIA IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA</b> .....	375
Bogomolova I.A., Dolgova D.R., Antoneeva I.I., Abakumova T.V., Gening T.P., Udalov Yu.D. <b>PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR IN NON-METASTATIC COLORECTAL CANCER</b> .....	383
Sarkisyan N.G., Tuzankina I.A., Kataeva N.N., Melikyan A.H., Osipova I.M. <b>DENTAL ANOMALIES IN CONGENITAL ERROR OF IMMUNITY</b> .....	391
Goloviznin M.V., Moiseev V.I., Timofeev V.T., Lakhonina N.S., Buldakova Yu.R. <b>IMMUNOLOGY OF THE “SENSIBLE WORLD” AND OF THE “INTELLIGIBLE WORLD”: THE EVOLUTIONARY DECLINE AND THE “CONSTRUCTED REALITY”</b> .....	397
<b>AUTHOR INDEX</b> .....	403
<b>SUBJECT INDEX</b> .....	404

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПЕРВИЧНЫХ В-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ В ЗАРОДЫШЕВЫХ ЦЕНТРАХ

Бязрова М.Г.<sup>1,2</sup>, Сухова М.М.<sup>1,3</sup>, Михайлов А.А.<sup>1,3</sup>, Прилипов А.Г.<sup>1</sup>, Филатов А.В.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА, Москва, Россия

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

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

**Резюме.** Основные этапы созревания антиген-специфических В-клеток протекают в герминативных центрах лимфоузлов. Здесь наивные В-клетки проходят процесс соматического гипермутагенеза, а также переключение классов синтезируемых антител. В процессе дифференцировки принимается решение, по какому пути В-клетки будут развиваться далее. Они либо превратятся в короткоживущие плазмбласты, либо в В-клетки памяти или плазматические клетки. Взаимоотношение этих процессов очень важно для развития продуктивного гуморального иммунного ответа. Имеется насущная необходимость в более детальном изучении отмеченных процессов. Целью работы являлось создание системы, которая *ex vivo* способна моделировать процессы, протекающие в герминативных центрах. В качестве исходного материала мы использовали первичные В-клетки из периферической крови человека. После иммуномагнитной сепарации В-лимфоциты стимулировали *in vitro* с помощью фидерных клеток, несущих молекулы CD40L. Другим стимулирующим фактором являлся рекомбинантный растворимый IL-21. При IL-21/CD40L стимуляции В-лимфоциты изменяли свою морфологию, поверхностный фенотип, а также функциональную активность. После активной экспансии в течении 10 дней дальнейший рост клеток останавливался, и через некоторое время они погибали. Для получения стабильно пролиферирующих В-клеток мы использовали лентивирусную трансдукцию IL-21/CD40L стимулированных IgM<sup>+</sup> В-лимфоцитов. Для этого были получены препараты лентивируса, которые несли кассету, состоящую из генов *BCL6* и *BCL2L1*, разделенных последовательностью кодирующей саморазрезаемый пептид P2A, а также репортерный ген *GFP*, отделенный от целевых генов элементом IRES. Используемая кассета обеспечивала в клетках-мишенях синтез транскрипционного фактора Bcl-6 и белка Bcl-XL. Репрессор Bcl-6 не позволял В-клеткам уходить в терминальную дифференцировку и превращаться в плазматические клетки, а белок Bcl-XL оказывал анти-апоптотическое действие. Трансдуцированные В-клетки пролиферировали более месяца и сохраняли фенотип плазмбластов. При этом через 42 дня после начала стимуляции трансдуцированные В-клетки оставались GFP-позитивными, коэкспрессировали антигены CD27 и CD38, несли поверхностный CD20 и IgM, внутриклеточный Bcl-6, Bcl-XL и IgM, сохраняли секрецию IgM, но оставались негативными по поверхностному и внутриклеточному IgG. Таким образом, длительное культивирование

### Адрес для переписки:

Филатов Александр Васильевич  
ФГБУН «Государственный научный центр  
«Институт иммунологии»» ФМБА  
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24.  
Тел.: 8 (495) 177-77-65.  
E-mail: avfilat@yandex.ru

### Address for correspondence:

Alexander V. Filatov  
Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency  
24 Kashirskoye Highway  
Moscow  
115522 Russian Federation  
Phone: +7 (495) 177-77-65.  
E-mail: avfilat@yandex.ru

### Образец цитирования:

М.Г. Бязрова, М.М. Сухова, А.А. Михайлов, А.Г. Прилипов, А.В. Филатов «Генетическая модификация первичных В-клеток человека для моделирования процессов в зародышевых центрах» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 133–138.  
doi: 10.46235/1028-7221-16622-GMO

© Бязрова М.Г. и соавт., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

M.G. Byazrova, M.M. Sukhova, A.A. Mikhailov, A.G. Prilipov, A.V. Filatov "Genetic modification of primary human B cells to model the process of B cell development in germinal centers", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 133–138.  
doi: 10.46235/1028-7221-16622-GMO

© Byazrova M.G. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.46235/1028-7221-16622-GMO

В-клеток не приводило к переключению класса синтезируемого Ig. Отработанная система стимуляции позволит имитировать ключевые аспекты развития В-клеток в зародышевых центрах для изучения формирования В-клеточной памяти, что в конечном счете будет способствовать разработке эффективных вакцин.

*Ключевые слова:* наивные В-клетки, В-клетки памяти, плазматические клетки, IL-21, CD40L, Bcl-6, Bcl-XL

## GENETIC MODIFICATION OF PRIMARY HUMAN B CELLS TO MODEL THE PROCESS OF B CELL DEVELOPMENT IN GERMINAL CENTERS

Byazrova M.G.<sup>a, b</sup>, Sukhova M.M.<sup>a, c</sup>, Mikhailov A.A.<sup>a, c</sup>, Prilipov A.G.<sup>a</sup>, Filatov A.V.<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup> Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

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

<sup>c</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The main stages of maturation of antigen-specific B cells occur in the germinal centers of the lymph nodes. During the process of differentiation, a decision is made on which path the B cells will take to develop further. They will either turn into short-lived plasmablasts or memory B cells or plasma cells. The relationship between these processes is very important for the development of a productive humoral immune response. The goal of the work was to create a system that is capable of simulating *ex vivo* processes occurring in germinal centers. We used primary B cells from human peripheral blood as starting material. B lymphocytes were stimulated *in vitro* using feeder cells carrying CD40L molecules and recombinant IL-21. Upon IL-21/CD40L stimulation, B lymphocytes changed their morphology, surface phenotype, and functional activity. After active expansion for 10 days, further cell growth stopped, and after some time they died. To generate stably proliferating B cells, we used lentiviral transduction of IL-21/CD40L stimulated IgM<sup>+</sup> B cells. For this purpose, lentivirus preparations were obtained that carried a cassette consisting of the *BCL6* and *BCL2L1* genes, separated by a sequence encoding the self-cutting peptide P2A, as well as a *GFP* reporter gene separated from the target genes by an IRES element. The cassette used ensured the synthesis of the Bcl-6 transcription factor and the Bcl-XL protein in target cells. The Bcl-6 repressor prevented B cells from undergoing terminal differentiation and becoming plasma cells, and the Bcl-XL protein had an anti-apoptotic effect. Transduced B cells proliferated for more than a month and maintained a plasmablast phenotype. Forty-two days after the start of stimulation, transduced B cells remained GFP-positive, coexpressed CD27 and CD38 antigens, carried surface CD20 and IgM, intracellular Bcl-6, Bcl-XL and IgM, retained IgM secretion, but remained negative for surface and intracellular IgG. The proven stimulation system will allow us to simulate key aspects of B cell development in germinal centers to study the formation of B cell memory, which will ultimately facilitate the development of effective vaccines.

*Keywords:* naive B cells, memory B cells, plasma cells, IL-21, CD40L, Bcl-6, Bcl-XL

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00289).

### Введение

При первичном В-клеточном ответе происходит активация наивных антиген-специфических В-клеток и их дифференцировка в одну из следующих популяций: плазмбласты, клетки памяти и плазматические клетки [6]. Этот важный этап в развитии В-лимфоцитов проходит в герминативных центрах лимфоузлов. Дифференцировка В-клеток сопровождается переключением синтеза Ig и созреванием аффинности антител [5]. Для изучения процессов дифференцировки в зароды-

шевых центрах применяют несколько модельных систем, в частности используются генетически модифицированные мыши. Очевидно, что этот подход имеет серьезные ограничения; связанные, главным образом, с тем, что мыши не всегда точно отражают иммунологические процессы, проходящие у человека. Привлекательным решением является создание системы, которая позволит *ex vivo* моделировать процессы, происходящие в зародышевых центрах. В светлой зоне зародышевых центров присутствуют клетки, которые одновременно экспрессируют BCR и секретируют антитела [7]. Для создания модельной системы эти клетки наиболее интересны, поскольку они представляют популяцию пре-плазмбластов,

готовых к переходу как в В-клетки памяти, так и в плазматические клетки.

Важную роль в созревании В-лимфоцитов играют фолликулярные Т-хелперы (Tfh), которые несут на своей поверхности молекулу CD40L, взаимодействие которой с рецептором CD40 на В-лимфоците приводит к запуску NF-κB пути активации. В дополнении к этому Tfh стимулируют созревание В-клеток с помощью секретируемых цитокинов, среди которых наиболее мощным драйвером дифференцировки В-клеток является IL-21, который инициирует STAT3 путь активации [4]. Совместное действие IL-21 и CD40L является минимальной комбинацией сигналов, которая обеспечивает надежную активацию В-лимфоцитов. Однако эта система имеет существенный недостаток: активированные клетки быстро достигают терминальной дифференцировки, которая сопровождается остановкой клеточного цикла. Решить эту проблему возможно с помощью трансгенеза. В настоящей работе получены генетически модифицированные В-клетки крови человека, которые в течении двух месяцев поддерживались в состоянии преплазмабластов.

## Материалы и методы

Плазмиды MSCV-Vcl6 (#31391) и pMIG-Vcl-xL (#3541), кодирующие белки Vcl-6 и Vcl-XL, были получены из Addgene (США). Используя эти плазмиды, была получена кассета, которая состояла из генов *BCL6* и *BCLXL*, разделенных последовательностью саморазрезаемого пептида P2A. В качестве репортерного гена использовали GFP, который был отделен от целевых генов последовательностью IRES. Кассету клонировали в лентивирусный вектор pUHR (#110661, Addgene, США).

Для получения лентивирусных частиц клетки HEK293 временно трансфицировали тремя плаزمидами: трансферной pUHR-Vcl6-Vcl-XL-IRES-GFP, упаковочной 8.2R и плазмидой, кодирующей поверхностный гликопротеин вируса везикулярного стоматита VSV-G (#14888, AddGene, США). Через 4 дня после трансфекции лентивирусные частицы собирали из культуральных супернатантов и концентрировали методом ультрацентрифугирования.

Образцы цельной крови собирали в гепаринизированные вакутейнерные пробирки (Sarstedt, Германия). Мононуклеарные клетки крови выделяли центрифугированием в градиенте плотности фикола-верографина ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ ). В-лимфоциты обогащали методом отрицательной иммуномагнитной сепарации с использованием набора Dynabeads Untouched human B cell kit (Thermo Fisher Scientific, США).

В качестве источника CD40L использовали фидерные клетки A549, которые были стабильно трансфицированы геном, кодирующим

CD40L [1]. Фидерные клетки, обработанные 10 мкг/мл митомизином-С (Киова Хакко Когио, Япония), а также выделенные В-лимфоциты высевали по 10000 клеток на лунку в 96-луночный планшет. В-лимфоциты культивировали в среде DMEM с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки, 24 мкг/мл гентамицина, 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ HEPES (НПП «ПанЭко», Россия) и 25 нг/мл IL-21 (ООО «СайСторЛаб», Россия) при 37 °C в 5% CO<sub>2</sub>.

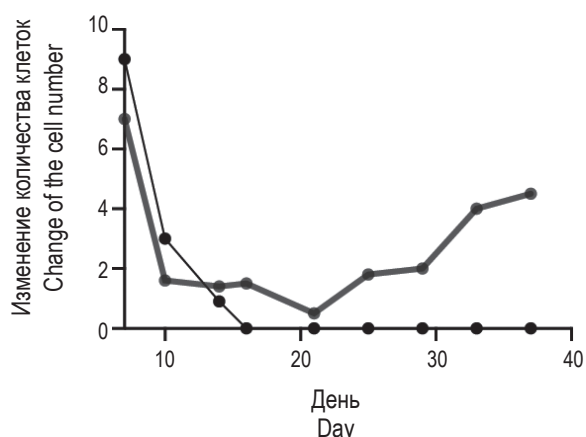
Для окрашивания лимфоцитов использовали моноклональные антитела: CD19-PE (клон LT19), CD27-PECy5.5 (клон LT27), CD38-PECy7 (клон LT38), против IgG (клон CH1) и IgM (клон CH2) человека, которые ранее были получены в нашей лаборатории [1]. Использовали также моноклональные антитела против Bcl-6 (клон 7D1, BioLegend, США) и Bcl-XL (поликлон sc-634, Santa Cruz, США). Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США).

## Результаты и обсуждение

В-лимфоциты, выделенные из крови, стимулировали с помощью рекомбинантного IL-21 в присутствии фидерных клеток, несущих поверхностный CD40L. При IL-21/CD40L стимуляции изменялась морфология В-лимфоцитов и их функциональная активность. В-клетки, которые исходно имели сферический вид, в процессе стимуляции принимали нерегулярную форму с образованием псевдоподий, группировались вокруг фидерных клеток. Между В-лимфоцитами наблюдалась гомотипическая адгезия, одиночные клетки начали активно двигаться, клетки пролиферировали и их количество возрастало.

При стимуляции наблюдались также изменения фенотипа клеток. На 4-й день стимуляции около 20% клеток начинали коэкспрессировать антигены CD27 и CD38, к 10-му дню доля двойных позитивных CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> клеток увеличилась до 40%. Одновременно с этим снижалась поверхностная экспрессия CD20 антигена. Наблюдалось также снижение доли клеток, несущих поверхностный IgG или IgM, при этом увеличивался процент лимфоцитов с внутриклеточным окрашиванием IgG. Уровень секреции IgG в культуральный супернатант возрастал более чем в 5 раз. В покоящихся В-лимфоцитах детектировался невысокий уровень Vcl-6, который при IL-21/CD40L стимуляции снижался ниже порога детекции. К 10-му дню экспансия В-клеток оставалась, и они вступали в апоптоз.

Суммируя все наблюдаемые изменения, можно утверждать, что IL-21/CD40L стимулированные В-клетки по своим свойствам приближались к плазмабластам и плазматическим клеткам. Это согласуется с тем, что IL-21 инициирует STAT3 путь активации, который приводит к положи-



**Рисунок 1. Динамика роста В-клеток трансдуцированных генами *BCL6* и *BCL2L1***

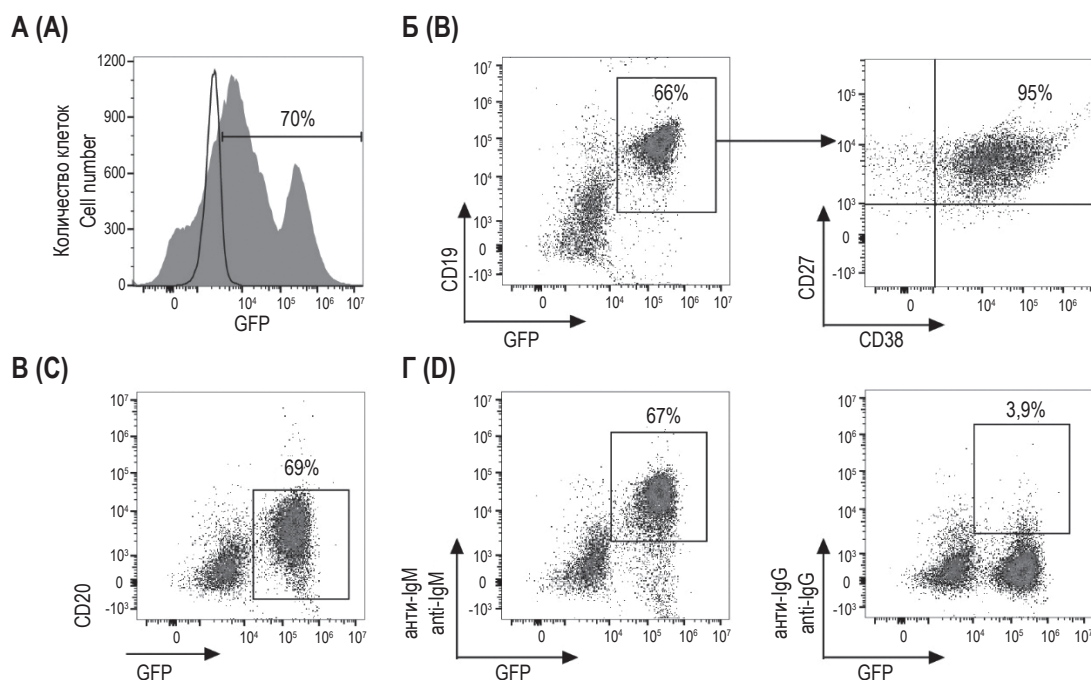
Примечание. Тонкой линией показан отрицательный контроль с В-клетками без трансдукции.

Figure 1. Dynamics of B cell growth after transduction with the *BCL6* and *BCL2L1* genes

Note. The thin line shows the negative control with B cells without transduction.

тельной регуляции транскрипционного фактора *Blimp-1*. Воздействие *CD40L* запускает альтернативный *NF-κB* сигнальный путь, который через ряд медиаторов, включая транскрипционный репрессор *Bcl-6*, снимает блокаду с *Blimp-1*. Таким образом, *IL-21* и *CD40L*, действуя синергически, обеспечивают повышение активности *Blimp-1*, который в свою очередь определяет переход В-клеток в терминальную стадию дифференцировки, на которой происходит остановка клеточного деления и В-лимфоцит окончательно превращается в плазматическую клетку [3].

Для моделирования В-клеточной дифференцировки более привлекательным является удержание В-лимфоцита в состоянии пролиферирующих преплазмабластов, в котором выбор дальнейшей дифференцировки в пользу В-клеток памяти или плазматических клеток еще не сделан. Стабильно пролиферирующие В-клетки можно получить трансдукцией генов *BCL6* и *BCL2L1*, которые кодируют транскрипционный фактор *Bcl-6* и анти-апоптотический белок *Bcl-XL* соответственно [8]. В экспериментах по трансдукции мы использовали более многочисленную популяцию *IgM*<sup>+</sup> клеток, которые

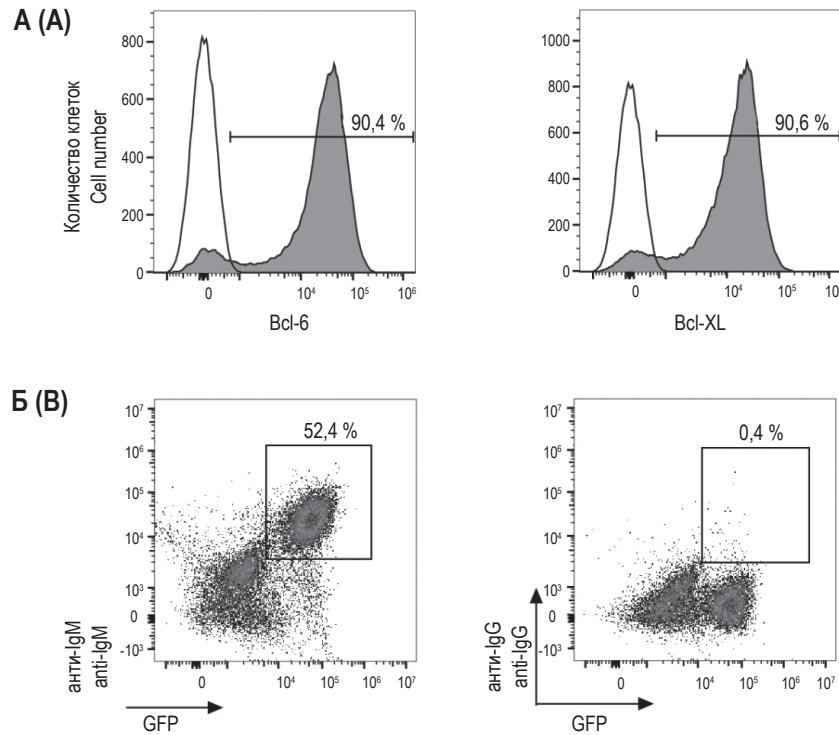


**Рисунок 2. Фенотипирование трансдуцированных В-клеток на 42-й день после начала стимуляции по поверхностным маркерам**

Примечание. А – распределение по флуоресценции *GFP*<sup>+</sup> клеток. Линией показан отрицательный контроль. Б – коэкспрессия антигенов *CD27* и *CD38*. В – экспрессия антигенов *CD20* (слева), *IgM* (в центре), *IgG* (справа). Цифрами указаны % положительных клеток.

Figure 2. Phenotyping of transduced B cells on day 42 after the start of stimulation using surface markers

Note. A, distribution of *GFP*<sup>+</sup> cell fluorescence. The line shows the negative control. B, coexpression of *CD27* and *CD38* antigens. C, expression of antigens *CD20* (left), *IgM* (center), and *IgG* (right). The numbers indicate the % of positive cells.



**Рисунок 3. Фенотипирование трансдуцированных В-клеток на 42-й день после начала стимуляции по внутриклеточным маркерам**

**Примечание.** А – пермеабилizованные клетки окрашивали антителами против Bcl-6 (слева) или Bcl-XL (справа) и вторичными антителами против IgM мыши, мечеными фикоэритрином. Для отрицательного контроля приведены гистограммы флуоресценции клеток, окрашенных только вторичными антителами. Б – экспрессия внутриклеточного IgM (слева) и IgG (справа) на GFP<sup>+</sup> клетках. Цифрами указаны % позитивных клеток.

Figure 3. Phenotyping of transduced B cells on day 42 after the start of stimulation using intracellular markers

Note. A, Permeabilized cells were stained with antibodies against Bcl-6 (left) or Bcl-XL (right) and secondary antibodies against mouse IgG labeled with phycoerythrin. For the negative control, fluorescence histograms of cells stained with secondary antibodies only are shown. B, expression of intracellular IgM (left) and IgG (right) on GFP<sup>+</sup> cells. The numbers indicate the % of positive cells.

предварительно выделяли с помощью проточного сортировщика.

На разные сроки после начала IL-21/CD40L стимуляции к В-клеткам мы добавляли лентивирусные частицы, несущие гены *BCL6* и *BCL2L1*, а также репортерный ген *GFP*. В зависимости от дозы и времени добавления лентивирусов было получено 9 различных вариантов трансдуцированных В-лимфоцитов. Каждые три дня с помощью проточной цитометрии мы подсчитывали количество лимфоцитов, после чего клетки пересаживали в новые лунки со свежими фидерными клетками и с добавлением IL-21.

После трансдукции некоторая доля В-лимфоцитов сохраняла свою жизнеспособность вплоть до 20-го дня культивирования, после чего наблюдалось устойчивое увеличение количества лимфоцитов (рис. 1). Лимфоциты трансдуцированные на 4-й день стимуляции демонстрировали более высокий уровень пролиферации, чем лимфоциты, трансдуцированные на 7-й день

стимуляции. Оптимальная доза лентивируса обеспечивала пролиферацию в течении двух месяцев с начала стимуляции. Через 42 дня после начала стимуляции более 72% клеток сохраняли GFP-флуоресценцию (рис. 2А), коэкспрессировали антигены CD27 и CD38 (рис. 2Б), несли поверхностный CD20 и IgM, но оставались негативными по поверхностному IgG (рис. 2Д, Г). Трансдуцированные В-клетки сохраняли секрецию IgM, экспрессировали внутриклеточный Bcl-6 и Bcl-XL (рис. 3А), а также внутриклеточный IgM, но не IgG (рис. 3Б). Таким образом, культивирование В-клеток в течение 42 дней не приводило к переключение класса синтезируемого Ig.

## Закключение

Таким образом, в настоящей работе показано, что первичные В-клетки крови, стимулированные в системе IL-21/CD40L и трансдуцирован-

ные генами *BCL6* и *BCL2L1*, дифференцируются в плазмабласты, которые могут пролиферировать в течении нескольких недель. Такие клетки имитируют ключевые аспекты развития В-клеток в зародышевых центрах.

Разработанная система стимуляции может служить удобным инструментом для последующих исследований по дифференцировке наивных В-клеток в предшественники В-клеток памяти и плазматические клетки.

## Список литературы / References

1. Бязрова М.Г., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., Васильева Ю.В., Прилипов А.Г., Филатов А.В. Стимуляция В-лимфоцитов человека *in vitro* с помощью ИЛ-21/CD40L и их характеристика. Иммунология, 2020. Т. 41, № 1. С. 18-27. [Byazrova M.G., Astakhova E.A., Spiridonova A.B., Vasileva Yu.V., Prilipov A.G., Filatov A.V. IL-21/CD40L stimulation of human B-lymphocytes in vitro and their characteristics. *Immunologiya = Immunologiya*, 2020, Vol. 41, no. 1, pp. 18-27. (In Russ.)]
2. Boswell K.L., Watkins T.A., Cale E.M., Samsel J., Andrews S.F., Ambrozak D.R., Driscoll J.I., Messina M.A., Narpala S., Hopp C.S., Cagigi A., Casazza J.P., Yamamoto T., Zhou T., Schief W.R., Crompton P.D., Ledgerwood J.E., Connors M., Gama L., Kwong P.D., McDermott A., Mascola J.R., Koup R.A. Application of B cell immortalization for the isolation of antibodies and B cell clones from vaccine and infection settings. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1087018. doi: 10.3389/fimmu.2022.1087018.
3. Diehl S.A., Schmidlin H., Nagasawa M., van Haren S.D., Kwakkenbos M.J., Yasuda E., Beaumont T., Scheeren F.A., Spits H. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 7, pp. 4805-4815.
4. Ding B.B., Bi E., Chen H., Yu J.J., Ye B.H. IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 4, pp. 1827-1836.
5. Inoue T., Kurosaki T. Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2024, Vol. 24, no. 1, pp. 5-17.
6. Inoue T., Shinnakasu R., Kurosaki T. Generation of high quality memory B cells. *Front Immunol.*, 2022, 12, 825813. doi: 10.3389/fimmu.2021.825813.
7. Kwakkenbos M.J., Diehl S.A., Yasuda E., Bakker A.Q., van Geelen C.M., Lukens M.V., van Bleek G.M., Widjoatmodjo M.N., Bogers W.M., Mei H., Radbruch A., Scheeren F.A., Spits H., Beaumont T. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nat. Med.*, 2010, Vol. 16, no. 1, pp. 123-128.
8. Kwakkenbos M.J., van Helden P.M., Beaumont T., Spits H. Stable long-term cultures of self-renewing B cells and their applications. *Immunol. Rev.*, 2016, Vol. 270, no. 1, pp. 65-77.

### Авторы:

**Бязрова М.Г.** — научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН «Государственный научный центр “Институт иммунологии”» ФМБА; ассистент кафедры иммунологии медицинского института, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

**Сухова М.М.** — младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН «Государственный научный центр “Институт иммунологии”» ФМБА; аспирант кафедры иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

**Михайлов А.А.** — лаборант лаборатории иммунохимии ФГБУН «Государственный научный центр “Институт иммунологии”» ФМБА; студент кафедры иммунологии биологического факультета, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

**Прилипов А.Г.** — д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН «Государственный научный центр “Институт иммунологии”» ФМБА, Москва, Россия

**Филатов А.В.** — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией иммунохимии ФГБУН «Государственный научный центр “Институт иммунологии”» ФМБА; профессор кафедры иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

### Authors:

**Byazrova M.G.**, Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency; Assistant, Department of Immunology, Medical Institute, P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

**Sukhova M.M.**, Junior Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency; Graduate Student, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

**Mikhailov A.A.**, Laboratory Assistant, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency; Student, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

**Prilipov A.G.**, PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

**Filatov A.V.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head of Laboratory of Immunochemistry, Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency; Professor, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Поступила 22.03.2024

Отправлена на доработку 24.03.2024

Принята к печати 25.03.2024

Received 22.03.2024

Revision received 24.03.2024

Accepted 25.03.2024



## **ЦИБРИДНЫЕ ЛИНИИ НА ОСНОВЕ ТНР-1 С РАЗЛИЧНЫМ МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ ГЕНОМ ИМЕЛИ РАЗНЫЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ**

**Журавлев А.Д.<sup>1,2</sup>, Верховова С.С.<sup>1,2</sup>, Кубекина М.В.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцины ФГБНУ  
«Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

<sup>3</sup> Центр коллективного пользования и Центр высокоточного редактирования и генетических технологий  
для биомедицины ФГБУН «Институт биологии гена Российской академии наук», Москва, Россия

**Резюме.** Большинство возрастных заболеваний человека сопровождается хроническим воспалением. Современные исследования направлены на изучение принципов формирования иммунного ответа. До сих пор не известны причины, по которым локальная воспалительная реакция не может разрешиться и переходит в вялотекущую хроническую форму. Врожденный иммунитет первым отвечает на вторжение патогенов. Важной составляющей воспалительной реакции является секреция иммунными клетками провоспалительных цитокинов, таких как TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CCL2. Это необходимо для рекрутирования в очаг воспаления иммунокомпетентных клеток. Чтобы избежать гибели клеток в результате высоких концентраций цитокинов и, как следствие, повреждения ткани, существует механизм толерантности врожденного иммунитета. Толерантность врожденного иммунитета заключается в снижении секреции провоспалительных цитокинов в ответ на повторное влияние патогена. Известно, что в формировании иммунного ответа важную роль играют митохондрии. Следовательно, нарушения в функционировании митохондрий могут приводить к нарушениям иммунного ответа. Чтобы избежать накопления дефектных митохондрий в клетке, существует контроль качества митохондрий. Митофагия, являясь специализированной формой аутофагии, очищает клетку от дисфункциональных митохондрий. Ранее нашей лаборатории удалось разработать цибриды. Это линии, которые были получены на основе моноцитарной клеточной линии ТНР-1, в которой предварительно убрали митохондрии. Чтобы получить цибриды, получившиеся безъядерные клетки ТНР-1 кокультивировали с тромбоцитами от пациентов. Таким образом, цибриды несут в себе ядерный геном ТНР-1 и митохондриальный геном пациента. В нашем исследовании мы решили изучить способность клеток, несущих разный митохондриальный геном, генерировать провоспалительный ответ, а также формировать толерантность в дальнейшем. Для этого мы выбрали модель толерантности

### **Адрес для переписки:**

Журавлев Александр Дмитриевич  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей  
патологии и патофизиологии»  
125315, Россия, Москва, ул. Балтийская, 8.  
Тел.: 8 (985) 791-71-98.  
E-mail: Zhuravel17@yandex.ru

### **Address for correspondence:**

Alexander D. Zhuravlev  
Institute of General Pathology and Pathophysiology  
8 Baltiyskaya St  
Moscow  
125315 Russian Federation  
Phone: +7 (985) 791-71-98.  
E-mail: Zhuravel17@yandex.ru

### **Образец цитирования:**

А.Д. Журавлев, С.С. Верховова, М.В. Кубекина  
«Цибридные линии на основе ТНР-1 с различным  
митохондриальным геномом имели разный  
провоспалительный ответ» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 139-144.  
doi: 10.46235/1028-7221-16781-TCC

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

### **For citation:**

A.D. Zhuravlev, S.S. Verkhova, M.V. Kubekina "THP1-  
based cybrid cells with various mtDNA mutations differ by  
the ability to form inflammatory response", Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024,  
Vol. 27, no. 2, pp. 139-144.  
doi: 10.46235/1028-7221-16781-TCC

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16781-TCC

к экдотоксину. Толерантность к эндотоксину или липополисахариду определяется как резистентное, противовоспалительное состояние в ответ на вторичную дозу липополисахариду после первичного воздействия. Таким образом, мы дважды стимулировали цибридные линии липополисахаридом и после этого оценивали секреции цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CCL2 с помощью ИФА. Цибриды демонстрировали два уровня провоспалительного ответа: высокий и низкий. Более того, цибриды с высоким провоспалительным ответом либо формировали, либо не формировали толерантность при повторной стимуляции. В результате исследования мы установили, что клетки, различающиеся по митохондриальному геному, отличались друг от друга по своему иммунному ответу. Будущие исследования улучшат наше понимание механизмов участия митохондрий в патологических процессах. Вероятно, что исследования недостаточной митофагии и роли определенных мутаций мтДНК в ее развитии принесут многообещающие результаты.

*Ключевые слова:* цитокины, митохондрии, хроническое воспаление, цибриды, толерантность врожденного иммунитета, митофагия

## THP1-BASED CYBRID CELLS WITH VARIOUS mtDNA MUTATIONS DIFFER BY THE ABILITY TO FORM INFLAMMATORY RESPONSE

Zhuravlev A.D.<sup>a, b</sup>, Verkhova S.S.<sup>a, b</sup>, Kubekina M.V.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Core Facility Center and Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Most age-related human diseases are accompanied by chronic inflammation. Modern research is aimed at studying the principles of the formation of the immune response. The reasons why the local inflammatory reaction cannot be resolved and becomes a sluggish chronic form are still unknown. Immune cells secrete cytokines in response to pathogens. To avoid cell death as a result of high concentrations of cytokines and resulting tissue damage, there is a mechanism of innate immune tolerance. Innate immune tolerance involves a decrease in the secretion of proinflammatory cytokines in response to repeated exposure to a pathogen. It is known that mitochondria play an important role in the formation of the immune response. Consequently, impaired mitochondrial function can lead to impaired immune response. To control the quality of mitochondria in the cell, there is a mechanism – mitophagy. Previously, we have created cybrid lines based on the monocytic cell line THP-1. Cybrids were obtained by fusion of THP-1 cells (mitochondria were removed) with platelets from patients. Each of the cybrid lines had the THP-1 nuclear genome and an individual patient's mitochondrial genome. In our study, we decided to study the ability of cells carrying different mitochondrial genomes to generate a proinflammatory response, as well as to form tolerance in the future. For this purpose, we chose a model of endotoxin tolerance. Thus, we stimulated the cybrid lines twice with lipopolysaccharide and then assessed the secretion of the cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and CCL2 using ELISA. The cybrids demonstrated two levels of proinflammatory response: high and low. Moreover, cybrids with a high proinflammatory response either did or did not develop tolerance upon repeated stimulation. In our study, cells that differed from each other only in mitochondrial genome demonstrated three types of reactions upon the induction of immune tolerance to LPS. Future studies will improve our understanding of the mechanisms of mitochondrial involvement in pathological processes. It is likely that studies of deficient mitophagy and the role of certain mtDNA mutations in its development will yield promising results.

*Keywords:* cytokines, mitochondria, chronic inflammation, cybrids, innate immune tolerance, mitophagy

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 23-25-00339.

## Введение

Воспаление — это защитная реакция иммунитета на патоген или повреждение. Одним из важных проявлений воспалительной реакции является секреция иммунными клетками провоспалительных цитокинов, таких как  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $CCL2$ . Это необходимо для рекрутирования в очаг воспаления иммунокомпетентных клеток и активации механизмов устранения патогена [10]. Чтобы избежать апоптоза клеток в результате высоких концентраций цитокинов и, как следствие, повреждения ткани, существует механизм толерантности врожденного иммунитета. Толерантность представляет собой механизм, при котором происходит снижение секреции провоспалительных цитокинов иммунокомпетентных клеток при повторных воздействиях патогена и способствует разрешению воспаления [2]. Если воспаление не может разрешиться, то оно перетекает в хроническое состояние [7].

Современные исследования направлены на изучение роли митохондрий в развитии хронического воспаления [1, 9]. Функциональная активность клеток, участвующих в иммунном ответе, зависит от работы митохондрий. Митохондрии представляют собой полуавтономные органеллы, обладающие собственной митохондриальной ДНК (мтДНК). Мутации в мтДНК происходят чаще из-за близости к активным формам кислорода, кольцевой структуры, несовершенной репарации [5]. Поэтому клетке необходимо своевременно устранять поврежденные органеллы. Контроль качества митохондрий осуществляется несколькими механизмами, одним из которых является митофагия. Митофагия обеспечивает селективное удаление поврежденных митохондрий. Снижение эффективности митофагии приводит к накоплению дефектных митохондрий, что в дальнейшем может привести к повышенному уровню секреции провоспалительных цитокинов и, как следствие, чрезмерному воспалению [3, 11].

Удобной моделью для изучения функциональной значимости митохондрий являются цитоплазматические гидриды (цибриды). Цибриды были созданы нашей лабораторией ранее, для этого безмитохондриальные клетки ТНР-1 слили с тромбоцитами от пациентов. Таким образом, все цибриды несут единый ядерный геном и уникальный митохондриальный геном [6].

**Целью настоящего исследования** было изучение способности цибридных линий, несущих разный митохондриальный геном, генерировать провоспалительный ответ, а также формировать толерантность.

## Материалы и методы

Для изучения взаимосвязи между мутациями мтДНК и воспалительным ответом были выбраны цибридные линии. Для получения цибридных линий на ТНР-1 воздействовали бромистым этидием для угнетения митохондрий. После того, как в клетках не осталось митохондрий, они культивировались с тромбоцитами от пациентов с хроническими заболеваниями. Особенность этих линий в том, что у них единый ядерный геном. Цибридные линии были получены нашей лабораторией ранее [6].

Для воспалительной реакции и толерантности к липополисахариду (LPS) цибридные линии высевали в стерильные 6-луночные планшеты по две лунки в концентрации 1 млн клеток/мл по 2 мл в каждую лунку. В одну из лунок к клеткам добавляли LPS в концентрации 1 мкг/мл. Клетки с LPS инкубировали в течение 4 ч в  $CO_2$ -инкубаторе при 37 °C (95% воздуха и 5%  $CO_2$ ). Через 4 ч клетки откручивали при 300 g в течение 5 мин, отмывали при помощи PBS, добавляли 2 мл RPMI-1640 (10% сыворотки, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) и высевали по 1 мл в 24-луночный планшет. Затем добавляли в одну из лунок LPS в концентрации 1 мкг/мл. Клетки с LPS инкубировали в течение 20 ч в  $CO_2$ -инкубаторе при 37 °C (95% воздуха и 5%  $CO_2$ ). Спустя 20 ч образцы культуральной среды отбирали в пробирки, центрифугировали в течение 5 минут при 300 g. Супернатант отбирали в отдельные пробирки для оценки секреции панели цитокинов методом ИФА с использованием реагентов R&D Systems. Проведение ИФА согласно протоколу анализа. Оптическую плотность калибраторов и исследуемых образцов измеряли на планшетном ридере CLARIOstar.

Статистический анализ проводили при помощи программного обеспечения SPSS Statistics 26.

## Результаты и обсуждение

Мы решили оценить способность исследуемых клеточных линий генерировать провоспалительный ответ при стимуляции LPS, а также дальнейшую способность клеток формировать иммунную толерантность.



цию по IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2 и не формировали толерантность по TNF $\alpha$ , IL-8. LSM2 формировала толерантность по TNF $\alpha$  и по CCL2, не формировала толерантность по IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8. HSMAM3 формировала толерантность по TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и не формировала по IL-8, CCL2. HSMAM1, TC-522, TCP-521 формировали по CCL2, и не формировали по TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8.

Таким образом, клетки, различающиеся по митохондриальному геному, качественно отличались по типу воспалительной реакции.

Ранее группа ученых провела клиническое исследование и показала, что у пациентов с мутациями или делециями в мтДНК секреция провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  лейкоцитами была выше в ответ на LPS [4]. Можно предположить, что ответственным за накопление мутация мтДНК могло быть нарушение в митофагии. Более того, было показано, что нарушения в секреции PINK1 и/или PARKIN, ключевых белков митофагии, также вело к повышенному содержанию IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2 [8].

## Заключение

В своем исследовании мы продемонстрировали, что клетки, различающиеся между собой только митохондриальным геномом, качественно отличались по типу воспалительной реакции. Наше исследование, безусловно, имеет ряд ограничений. Так, мы не продемонстрировали роль конкретных мутаций мтДНК в нарушениях иммунной реакции, а также не осветили механизмы этих нарушений. Однако, вероятно, митохондриальные мутации, а значит, и митохондриальная дисфункция, действительно могут лежать в основе нарушений функций иммунных клеток. Раскрытие механизмов влияния мутаций мтДНК на формирование иммунного ответа и толерантности представляется крайне перспективным направлением для разработки эффективной и безопасной терапии заболеваний воспалительного генеза.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН, за возможность использования научного оборудования.

## Список литературы / References

1. Dela Cruz C.S., Kang M.J. Mitochondrial dysfunction and damage associated molecular patterns (DAMPs) in chronic inflammatory diseases. *Mitochondrion*, 2018, Vol. 41, pp. 37-44.
2. Dominguez-Andres J., Netea M.G. Long-term reprogramming of the innate immune system. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, Vol. 105, no. 2, pp. 329-338.
3. Fang E.F., Hou Y., Palikaras K., Adriaanse B.A., Kerr J.S., Yang B., Lautrup S., Hasan-Olive M.M., Caponio D., Dan X., Rocktäschel P., Croteau D.L., Akbari M., Greig N.H., Fladby T., Nilsen H., Cader M.Z., Mattson M.P., Tavernarakis N., Bohr V.A. Mitophagy inhibits amyloid- $\beta$  and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.*, 2019, Vol. 22 no. 3, pp. 401-412.
4. Karan K.R., Trumpff C., Cross M., Engelstad K.M., Marsland A.L., McGuire P.J., Hirano M., Picard M. Leukocyte cytokine responses in adult patients with mitochondrial DNA defects. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2022, Vol. 100, no. 6, pp. 963-971.
5. Marian A.J. Mitochondrial genetics and human systemic hypertension. *Circ. Res.*, 2011, Vol. 108, no. 7, pp. 784-746.
6. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Khasanova Z.B., Shkurat T.P., Karagodin V.P., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Creation of cybrid cultures containing mtDNA mutations m.12315G>A and m.1555G>A, associated with atherosclerosis. *Biomolecules*, 2019, Vol. 9, no. 9, 499. doi: 10.3390/biom9090499.
7. Seeley J.J., Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, Vol. 101, no. 1, pp. 107-119.
8. Sliter D.A., Martinez J., Hao L., Chen X., Sun N., Fischer T.D., Burman J.L., Li Y., Zhang Z., Narendra D.P., Cai H., Borsche M., Klein C., Youle R.J. Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature*, 2018, Vol. 561, no. 7722, pp. 258-262.
9. Vaamonde-García C., López-Armada M.J. Role of mitochondrial dysfunction on rheumatic diseases. *Biochem. Pharmacol.*, 2019, Vol. 165, pp. 181-195.

10. Vacchelli E., Galluzzi L., Eggermont A., Galon J., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G. Trial Watch: Immunostimulatory cytokines. *Oncoimmunology*, 2012, Vol. 1, no. 4, pp. 493-506.

11. Xu Y., Shen J., Ran Z. Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases. *Autophagy*, 2020, Vol. 16, no. 1, pp. 3-17.

---

**Авторы:**

**Журавлев А.Д.** — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; младший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

**Верхова С.С.** — аспирант Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»; старший лаборант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

**Кубекина М.В.** — к.б.н., научный сотрудник Центра коллективного пользования и Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт биологии гена Российской академии наук», Москва, Россия

**Authors:**

**Zhuravlev A.D.**, Postgraduate Student, Junior Researcher Associate, Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology; Junior Research Associate, Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery Moscow, Russian Federation

**Verkhova S.S.**, Postgraduate Student, Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre Of Surgery; Senior Assistant, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

**Kubekina M.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Core Facility Center and Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 31.03.2024  
Отправлена на доработку 05.04.2024  
Принята к печати 09.04.2024

---

Received 31.03.2024  
Revision received 05.04.2024  
Accepted 09.04.2024

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА У МЫШЕЙ, ИНДУЦИРОВАННАЯ ПОСРЕДСТВОМ АЭРОЗОЛЬНОЙ ДОСТАВКИ LPS

Намаканова О.А.<sup>1,2</sup>, Губернаторова Е.О.<sup>1,2</sup>, Чичерина Н.Р.<sup>3</sup>,  
Зварцев Р.В.<sup>1,2</sup>, Друзцкая М.С.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

**Резюме.** Повреждение легких, вызванное воздействием липополисахарида (LPS), является наиболее часто используемой моделью острого воспаления легочной ткани у мышей, что позволяет имитировать развитие синдрома респираторного расстройства у человека. Эффекты индуцированного экспериментального острого LPS-зависимого воспаления дыхательных путей хорошо изучены и связаны с накоплением нейтрофилов в бронхоальвеолярной жидкости (БАЛ), локальной и системной продукцией провоспалительных цитокинов, а также сужением просвета дыхательных путей. В последнее время появляется все больше исследований, показывающих наличие признаков легочного фиброза, таких как усиленная пролиферация фибробластов и избыточное отложение внеклеточного матрикса на поздних стадиях острого воспаления легких, вызванного воздействием LPS. В данной работе описана экспериментальная модель острого повреждения легких, индуцированная с помощью однократного аэрозольного введения LPS в качестве воспроизводимой *in vivo* модели легочного фиброза. Для этого мышей линии C57BL/6 помещали в камеру, и с помощью распылителя Aeroneb Lab Nebulizer подвергали воздействию аэрозоля, содержащего 10 мг LPS.

Было установлено, что через 5 недель после однократного ингаляционного введения LPS мыши демонстрировали повышенную продукцию IL-6 в БАЛ. Несмотря на то, что количество нейтрофилов не изменялось, на 5-й неделе после воздействия LPS происходило снижение процентного содержания альвеолярных макрофагов, что может свидетельствовать о продолжающемся локальном воспалении. В то же время доставка LPS с помощью аэрозольной установки, спустя несколько недель, приводило к увеличению продукции и экспрессии ключевых медиаторов фиброза, таких как повышенной продукции IL-10 в БАЛ, увеличенной экспрессии *Tgfb1*, *Col1a1*, *Il13* и *Acta2*, а также отложению коллагена в легочной ткани по сравнению с мышами с острым воспалением легких.

### Адрес для переписки:

Намаканова Ольга Александровна  
ФГБУН «Институт молекулярной биологии  
имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук  
119334, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32.  
Тел.: 8 (902) 520-24-99.  
e-mail: olga.namakanova@gmail.com

### Address for correspondence:

Olga A. Namakanova  
Engelhardt Institute of Molecular Biology  
32 Vavilov St  
Moscow  
119334 Russian Federation  
Phone: +7 (902) 520-24-99.  
E-mail: olga.namakanova@gmail.com

### Образец цитирования:

О.А. Намаканова, Е.О. Губернаторова, Н.Р. Чичерина,  
Р.В. Зварцев, М.С. Друзцкая «Экспериментальная  
модель легочного фиброза у мышей, индуцированная  
средством аэрозольной доставки LPS» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 145-150.  
doi: 10.46235/1028-7221-16876-EMM

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

### For citation:

O.A. Namakanova, E.O. Gubernatorova, N.R. Chicherina,  
R.V. Zvartsev, M.S. Drutskaya "Experimental mouse model of  
pulmonary fibrosis induced by nebulized LPS administration",  
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 145-150.  
doi: 10.46235/1028-7221-16876-EMM

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16876-EMM

Таким образом, использование метода однократного введения LPS с помощью небулайзера представляет собой релевантную, воспроизводимую и физиологичную модель на мышах, что в дальнейшем позволит исследовать механизмы развития фиброза легких и поможет в поиске новых терапевтических средств и подходов.

*Ключевые слова:* цитокины, фиброз легких, LPS, мышинная модель воспаления легких

## EXPERIMENTAL MOUSE MODEL OF PULMONARY FIBROSIS INDUCED BY NEBULIZED LPS ADMINISTRATION

Namakanova O.A.<sup>a, b</sup>, Gubernatorova E.O.<sup>a, b</sup>, Chicherina N.R.<sup>c</sup>,  
Zvartsev R.V.<sup>a, b</sup>, Drutskaya M.S.<sup>a, b, c</sup>

<sup>a</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

**Abstract.** Lipopolysaccharide (LPS)-induced lung injury is the most commonly used mouse model of acute lung inflammation that simulates the development of respiratory distress syndrome in humans. The effects of acute LPS-induced airway inflammation are well studied and associated with the neutrophil accumulation in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), local and systemic production of proinflammatory cytokines and narrowing of the airways. Recent studies demonstrated the presence of pulmonary fibrosis characterized by increased fibroblast proliferation and excess extracellular matrix deposition in late phase of acute lung inflammation caused by LPS exposure. This work describes an experimental model of acute lung injury induced by a single aerosol injection of LPS as a reproducible *in vivo* model of pulmonary fibrosis. To induce lung injury, C57BL/6 mice were placed in a chamber and exposed to an aerosol containing 10 mg of LPS using an Aeronex Lab Nebulizer delivery system. We found that 5 weeks after a single nebulized LPS administration, mice have increased production of IL-6 in BALF. Although the frequency of neutrophils was not altered, there was a decrease in the percentage of alveolar macrophages at 5 weeks after LPS exposure, indicating continued lung inflammation. Several weeks after aerosolized LPS challenge, IL-10 production in BALF was increased, as well as expression of *Tgfb1*, *Colla1*, *Il13* and *Acta2*, and collagen deposition in lung tissue compared to mice with acute lung inflammation.

Thus, the single nebulized LPS administration represents a relevant, reproducible and physiologic model in mice allowing to investigate the mechanisms of pulmonary fibrosis development and help in the search for new therapeutic agents and approaches.

*Keywords:* cytokines, pulmonary fibrosis, LPS, mouse model of lung inflammation

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-30032).

### Введение

Воспаление, экспериментально индуцированное в ответ на LPS, основного иммуногенного компонента стенки грамотрицательных бактерий, используется для изучения молекулярных механизмов протекающих реакций и служит упрощенной моделью острого повреждения легких. У мышей краткосрочные эффекты, наблюдаемые на фоне острого LPS-индуцированного воспаления легких, хорошо изучены, в то время как долговременные изменения недостаточно исследованы. Так, в одном исследовании было

показано, что однократное введение LPS в виде аэрозоля приводит к воспалению дыхательных путей и ремоделированию легочной ткани с отложением коллагена через несколько недель [3]. Известно, что развитие легочного фиброза является последствием перенесенного острого и не разрешившегося в течение длительного времени воспаления легких [9]. Таким образом, поиск релевантной мышинной модели для понимания механизмов, лежащих в основе перехода от острого воспаления к фиброзу легких, остается весьма актуальной задачей.

Модель LPS-индуцированного воспаления легких с помощью аэрозоля лучше имитирует физиологичный процесс заражения воздушно-капельным путем. Однако, несмотря на преиму-



шества этой модели, к которым относятся неинвазивность метода, способность одновременно индуцировать заболевание у большого количества животных, а также равномерное осаждение частиц с LPS по поверхности дыхательных путей, существует и ряд недостатков. Так, одним из ограничений модели является то, что слизистые других органов могут также подвергаться воздействию бактериальных компонентов, что может вызывать нежелательные системные воспалительные реакции [6]. В связи с этим возникает потребность в разработке улучшенной экспериментальной модели, заключающейся, например, в использовании более низкой дозы LPS для снижения потенциальных побочных эффектов.

В настоящей работе была оптимизирована ранее опубликованная модель воспаления легких, а также продемонстрированы наличие признаков легочного фиброза на более поздних стадиях как следствие острого повреждения легких, индуцированного путем однократного ингаляционного введения LPS.

## Материалы и методы

### Мыши

Мышей линии C57BL/6 в возрасте 6-9 недель содержали на базе Автономного экспериментально-биологического комплекса для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1660). Все манипуляции с животными были выполнены в соответствии протоколом, утвержденным Комиссией по биоэтике ИМБ РАН (Протокол № 1 от 04.03.2024).

### LPS-индуцированное воспаление легких

Острое воспаление легких у мышей индуцировали посредством введения LPS по ранее опубликованному протоколу с небольшими из-

менениями [3]. Мышей подвергали воздействию LPS с использованием пассивной ингаляционной установки с камерой (Aeroneb Lab Nebulizer, Kent Scientific Corporation). Индукцию острого воспаления дыхательных путей осуществляли посредством однократного ингаляционного введения 5 мл LPS в концентрации 2 мг/мл (LPS из *E. coli* 0111: B4, Sigma-Aldrich, США) до полного распыления раствора, а также 5 мл физраствора в качестве контроля (рис. 1А, см. 2-ю стр. обложки). В эксперименте участвовало три группы мышей: контрольная группа (через 24 ч после введения физраствора); группа мышей для определения кратковременных эффектов (через 24 ч после введения LPS); а также группа мышей для оценки развития фиброза (через 5 недель после введения LPS).

### Цитофлуориметрический анализ

Для блокировки неспецифического связывания клетки окрашивали антителами к FcγR, используя анти-CD16/CD32 антитела, в течение 20 мин при 4 °С с последующим окрашиванием антителами к поверхностным маркерам: анти-CD45 (30-F11), анти-SiglecF (E50-2440), анти-CD11c (N418), анти-CD11b (M1/70), анти-Ly6G (1A8) в течение 20 мин при 4 °С. Для исключения мертвых клеток использовали Fixable ViabilityDye. Анализ проводили с помощью проточного цитометра FACSCanto II (BD Biosciences, США) и программного обеспечения FlowJo v. 10.

### Измерение продукции TNF, IL-6 и IL-10

Цитокины в БАЛ анализировали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов Mouse TNFalpha, IL-6, IL-10 ELISA Ready-SET-Go (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя.

### Измерение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

РНК образцов легких подвергали обратной транскрипции для синтеза кДНК с использова-

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ДЛЯ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

TABLE 1. NUCLEOTIDE SEQUENCES OF PRIMERS USED FOR qRT-PCR ANALYSIS

Ген Gene	Последовательность Sequence	
	Прямая Forward	Обратная Reverse
<i>Actb</i>	CTCCTGAGCGCAAGTACTCTGTG	TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC
<i>Tgfb1</i>	CAACAATTCCTGGCGTTACCT	GGCTGATCCCGTTGATTTCC
<i>Il13</i>	CCTGGCTCTTGCTTGCCTT	GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA
<i>Col1a1</i>	ACGCCATCAAGGTCTACTG	GTA CT CGAACGGGAATCCA
<i>Acta2</i>	GGCACC ACTCTTTCTATAACGAG	GCACAATACCAGTTGTACGTCC

нием набора для синтеза кДНК RevertAid First Strand (Thermo Fisher Scientific, США). Изменение экспрессии генов проводили с использованием qPCRmix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия). Анализ экспрессии генов проводили с использованием 7500 Real Time PCR System Amplificator (Applied Biosystems, США) и следующего набора праймеров (табл. 1). Для определения относительной экспрессии генов применяли сравнительный метод  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  [8].

#### Гистологический анализ срезов легких

Образцы легочной ткани фиксировали в 4%-ном формальдегиде, заключали в парафин и с помощью микротомы SLEE CUT 4055 делали срезы толщиной 5 мкм с последующим окрашиванием по Массону, используя стандартный протокол производителя (ООО «БиоВитрум», Россия). Анализ срезов проводили на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 980.

#### Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 9 при помощи теста one-way ANOVA. Различия считали достоверными при \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , ns (non-significant) – нет разницы.

## Результаты и обсуждение

LPS-индуцированное повреждение легких является одной из широко применяемых и хорошо воспроизводимых моделей острого воспаления, которое используется для изучения молекулярных и клеточных механизмов патогенеза заболевания и поиска оптимальных терапевтических подходов. При этом большая часть исследований посвящена изучению повреждений легких на острой фазе, в то время как работы по оценке долговременных изменений в легочной ткани встречаются крайне редко. В нашей работе используется модель острого воспаления дыхательных путей посредством однократного ингаляционного введения LPS (рис. 1А, см. 2-ю стр. обложки). Предложенная модель позволяет оценить наличие как кратковременных изменений, наблюдаемых во время острой фазы, так и долгосрочных последствий в ответ на LPS, характерных для фибропролиферативной фазы, во время которой развивается хроническое воспаление и фиброз. Так, ингаляционное введение LPS спустя сутки приводило к значительной инфильтрации нейтрофилов в БАЛ, что характерно для острой фазы воспаления, в то время как на 5-й неделе после воздействия LPS содержание нейтрофилов снижалось до уровня, характерного для наивного состояния (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). В то же время процентное содержание эозинофилов

через 24 ч и 5 недель после введения LPS не изменялось (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). Известно, что острое воспаление дыхательных путей приводит к достоверной деплеции резидентных SiglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> альвеолярных макрофагов [1]. Действительно, у мышей на фоне острого воспаления наблюдалось резкое снижение процентного содержания альвеолярных макрофагов в БАЛ по сравнению с контрольной группой (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). В то же время мыши на 5-й неделе после введения LPS демонстрировали повышенное процентное содержание альвеолярных макрофагов по сравнению с группой мышей через 24 ч после ингаляционного введения LPS (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). При этом на 5-й неделе не происходило восстановления пула альвеолярных макрофагов, сравнимого с контрольной группой, что может свидетельствовать о продолжающемся воспалении дыхательных путей при фибропролиферативной фазе (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). Кроме того, через 5 недель после введения LPS наблюдалось локальное увеличение продукции IL-6, но не TNF в БАЛ (рис. 1В, см. 2-ю стр. обложки). При этом продукция TNF и IL-6 в БАЛ между группами мышей через 24 ч после ингаляционного введения LPS и контрольной группой была статистически значимой (рис. 1В, см. 2-ю стр. обложки). Таким образом, в качестве долговременных изменений в легких, спустя 5 недель после однократного аэрозольного введения LPS, наблюдался повышенный уровень продукции IL-6 и нарушенное восполнение пула альвеолярных макрофагов в БАЛ, что свидетельствует о хроническом характере воспаления.

Известно, что IL-10, будучи каноническим противовоспалительным цитокином, снижает выработку провоспалительных цитокинов, тем самым ингибируя воспаление. При этом имеются данные о вкладе IL-10 в возникновение и развитие фиброза легких. Так, у пациентов с идиопатическим легочным фиброзом обнаружен высокий уровень продукции IL-10 в БАЛ, а мыши с полным удалением IL-10 не развивали фиброз, индуцированный диоксидом кремния или блеомицином [2, 7]. Нами было показано, что кратковременное ингаляционное введение LPS спустя 5 недель, но не через 24 ч приводит к повышенной продукции IL-10 в БАЛ (рис. 2А, см. 3-ю стр. обложки). Другой важный медиатор воспаления легких, TGF- $\beta$  (трансформирующий фактор роста  $\beta$ ), способствует выработке коллагена в легочной ткани, а также активирует дифференцировку фибробластов [4]. Было установлено, что однократное воздействие LPS в виде аэрозоля значительно увеличивало экспрессию

*Tgfb1* и *Colla1* в легких у мышей через 5 недель по сравнению с контрольной группой и мышами с острым воспалением (рис. 2Б, см. 3-ю стр. обложки). Повышенная экспрессия *Tgfb1* в легких коррелировала с локальной повышенной продукцией ИЛ-6 (рис. 1В, 2Б, см. 3-ю стр. обложки), что подтверждает значимость ИЛ-6-индуцированной экспрессии TGF- $\beta$  в трансдифференцировке фибробластов в миофибробласты [10]. Важно отметить, что TGF- $\beta$  также может дифференцировать фибробласты в миофибробласты путем индукции экспрессии  $\alpha$ -SMA (гладкомышечный актин  $\alpha$ ), кодирующегося геном *Acta2*, в то время как ИЛ-13 напрямую регулирует продукцию коллагена и  $\alpha$ -SMA в фибробластах [5]. В соответствии с этими ранее опубликованными результатами, в легких мышей через 5 недель после воздействия LPS наблюдалась повышенная экспрессия как *Il13*, так и *Acta2* в сравнении с другими группами (рис. 2Б, см. 3-ю стр. обложки). При этом окрашивание образцов ткани легкого по Массону выявило отложение коллагена (интенсивное синее окрашивание) в легочной ткани у мышей через 5 недель после аэрозольного введения LPS (рис. 2В, см. 3-ю стр. обложки), что коррелировало с повышенной экспрессией *Colla1* в легких мышей спустя 5 недель (рис. 2Б, см. 3-ю стр. обложки). Важно отметить, что в используемой модели наблюдалось незначительное отложение коллагена, что может свидетельствовать лишь

о начальной стадии фиброза. Предположительно, накопление большого количества коллагена требует более 5 недель после воздействия LPS. Суммируя вышеописанные результаты, было показано, что однократное ингаляционное введение LPS приводит спустя 5 недель к появлению типичных признаков фиброза легких, таких как увеличение продукции ИЛ-10 и экспрессии медиаторов фиброза, таких как *Tgfb1*, *Colla1*, *Il13*, *Acta2*, наряду с отложением коллагеновых волокон в легочной ткани.

## Заключение

В работе показано, что однократное введение LPS в виде аэрозоля, используя ингаляционную установку Aeroneb Lab Nebulizer с камерой, приводит к развитию хронического воспаления, а также появлению типичных признаков фиброза, проявляющиеся в повышенной продукции ИЛ-10 в БАЛ, экспрессии *Tgfb1*, *Colla1*, *Il13*, *Acta2* и накоплении коллагена в легких. Использование небулайзера как ингаляционной формы доставки LPS представляет собой более физиологичную экспериментальную модель по сравнению с интраназальным введением, что позволит в будущем изучить механизмы развития фиброза на поздних стадиях острого повреждения легких и оптимизировать существующие терапевтические подходы.

## Список литературы / References

1. Bain C.C., MacDonald A.S. The impact of the lung environment on macrophage development, activation and function: diversity in the face of adversity. *Mucosal Immunol.*, 2022, Vol. 15, no. 2, pp. 223-234.
2. Byrne A.J., Maher T.M., Lloyd C.M. Pulmonary macrophages: a new therapeutic pathway in fibrosing lung disease? *Trends Mol. Med.*, 2016, Vol. 22, no. 4, pp 303-316.
3. de Souza Xavier Costa N., Ribeiro Junior G., Dos Santos Alemany A.A., Belotti L., Zati D.H., Frota Cavalcante M., Matera Veras M., Ribeiro S., Kallas E.G., Nascimento Saldiva P.H., Dolhnikoff M., Ferraz da Silva L.F. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 9, e0185474. doi: 10.1371/journal.pone.0185474.
4. Frangogiannis N. Transforming growth factor-beta in tissue fibrosis. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 3, e20190103. doi: 10.1084/jem.20190103.
5. Kolahian S., Fernandez I.E., Eickelberg O., Hartl D. Immune mechanisms in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2016, Vol. 55, no. 3, pp. 309-322.
6. Mizgerd J.P., Skerrett S.J. Animal models of human pneumonia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2008, Vol. 294, no. 3, pp. L387-L398.
7. Nakagome K., Dohi M., Okunishi K., Tanaka R., Miyazaki J., Yamamoto K. *In vivo* IL-10 gene delivery attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting the production and activation of TGF-beta in the lung. *Thorax*, 2006, Vol. 61, no. 10, pp. 886-894.
8. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.*, 2008, Vol. 3, no. 6, pp. 1101-1108.

9. Tsikis S.T., Fligor S.C., Hirsch T.I., Pan A., Yu L.J., Kishikawa H., Joiner M.M., Mitchell P.D., Puder M. Lipopolysaccharide-induced murine lung injury results in long-term pulmonary changes and downregulation of angiogenic pathways. *Sci. Rep.*, 2022, Vol. 12, no. 1, 10245. doi: 10.1038/s41598-022-14618-8.

10. Zheng M., Li H., Sun L., Brigstock D.R., Gao R. Interleukin-6 participates in human pancreatic stellate cell activation and collagen I production via TGF-beta1/Smad pathway. *Cytokine*, 2021, Vol. 143, 155536. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155536.

---

**Авторы:**

**Намаканова О.А.** — младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

**Губернаторова Е.О.** — старший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

**Чичерина Н.Р.** — студент, магистр направления «Иммунобиология и биомедицина», АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус»», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

**Зварцев Р.В.** — младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

**Друцкая М.С.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва; доцент, АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус»», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

**Authors:**

**Namakanova O.A.**, Junior Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Gubernatorova E.O.**, Senior Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Chicherina N.R.**, Master Student, Division of Immunobiology and Biomedicine, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

**Zvartsev R.V.**, Junior Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Drutskaya M.S.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow; Associate Professor, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

## **СУРФАКТАНТНАЯ СИСТЕМА ЛЕГКИХ ПРИ АНТИФОСФОЛИПИДНОМ СИНДРОМЕ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ ИММУНОСУПРЕССОРА FTY-720**

**Уракова М.А., Мустаев В.Р., Каримова Г.Р., Кузнецова М.Г.,  
Рахматуллина Э.Н., Оленева С.А., Уракова К.В.**

ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Ижевск, Россия

**Резюме.** Антифосфолипидный синдром (APS) является тромбофилическим заболеванием, в патогенезе которого ведущая роль принадлежит антителам, реагирующим с антигенными детерминантами фосфолипидов. APS — это системная аутоиммунная патология, которая вовлекает в патологический процесс многие органы и системы, в том числе и дыхательную систему. Учитывая тот факт, что сурфактант легких представлен в основном фосфолипидами, можно предположить повреждение сурфактанта и нарушение его функционирования при APS. В работе показана эффективность применения терапии данной аутоиммунной патологии иммуносупрессором FTY-720, который представляет собой структурный аналог эндогенного сфингозина. Действие препарата основано на модуляции сфингозин-1 фосфатных рецепторов лимфоцитов. Основным эффектом иммуносупрессора FTY-720 в результате рецепторного взаимодействия является снижение количества циркулирующих лимфоцитов. Исследования были проведены на 85 белых беспородных крысах-самцах: 1-я группа (моделирование APS) состояла из 30 крыс, которым внутривенно вводили кардиолипидный антиген в суммарной дозе 0,2-0,4 мг на крысу через день в течение трех недель, 2-я группа (контроль) состояла из 25 крыс, которым вводили 0,9%-ный раствор NaCl по той же схеме; в 3-ю группу вошло 30 крыс, которым APS сочетали с введением иммуносупрессора FTY-720 (внутрибрюшинно 1 мг/кг массы животного). Через 3 недели с целью извлечения бронхолегочного комплекса производилось оперативное вмешательство, которое осуществляли под наркозом («Золетил» 0,5 мг/кг). После извлечения бронхолегочного комплекса осуществлялся его трехкратный лаваж 0,9%-ным раствором NaCl. Материалом экспериментального исследования служила лаважная жидкость, в которой изучали биофизические и биохимические показатели сурфактанта. Используя метод Ленгмюра-Блоджетта, опре-

### **Адрес для переписки:**

Уракова Мария Анатольевна  
ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская  
академия» Министерства здравоохранения РФ  
426056, Россия, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281.  
Тел.: 8 (951) 210-22-07.  
E-mail: urakova-mariya@yandex.ru

### **Address for correspondence:**

Maria A. Urakova  
Izhevsk State Medical Academy  
281 Kommunarov St  
Izhevsk  
426056 Russian Federation  
Phone: +7 (951) 210-22-07.  
E-mail: urakova-mariya@yandex.ru

### **Образец цитирования:**

М.А. Уракова, В.Р. Мустаев, Г.Р. Каримова,  
М.Г. Кузнецова, Э.Н. Рахматуллина, С.А. Оленева,  
К.В. Уракова «Сурфактантная система легких  
при антифосфолипидном синдроме в условиях  
введения иммуносупрессора FTY-720» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 151-156.  
doi: 10.46235/1028-7221-16767-SSO

© Уракова М.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

M.A. Urakova, V.R. MustaeV, G.R. Karimova,  
M.G. Kuznetsova, E.N. Rakhmatullina, S.A. Oleneva,  
K.V. Urakova "Surfactant system of the lungs in  
antiphospholipid syndrome under the conditions of  
administration of the immunosuppressive agent FTY-720",  
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 151-156.  
doi: 10.46235/1028-7221-16767-SSO

© Urakova M.A. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16767-SSO

деляли статистическое, минимальное и максимальное поверхностное натяжение. Исходя из данных величин рассчитывали интегративный показатель, отражающий поверхностно-активные свойства сурфактанта – индекс стабильности по Clements. Методом тонкослойной хроматографии определяли фракционный состав фосфолипидов сурфактанта. Результаты наших экспериментов показали, что при антифосфолипидном синдроме наблюдалось ухудшение функциональной активности сурфактанта и изменение его биохимического состава. Введение FTY-720 нормализовало параметры сурфактантной системы легких, измененные при моделировании антифосфолипидного синдрома.

*Ключевые слова: антифосфолипидный синдром, иммуносупрессор FTY-720, сурфактант легких, поверхностная активность легких*

## **SURFACTANT SYSTEM OF THE LUNGS IN ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME UNDER THE CONDITIONS OF ADMINISTRATION OF THE IMMUNOSUPPRESSIVE AGENT FTY-720**

**Urakova M.A., Mustaev V.R., Karimova G.R., Kuznetsova M.G., Rakhmatullina E.N., Oleneva S.A., Urakova K.V.**

*Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation*

**Abstract.** Antiphospholipid syndrome (APS) is a thrombophilic disease in the pathogenesis of which the leading role belongs to antibodies reacting with antigenic determinants of phospholipids. APS is a systemic autoimmune pathology that involves many organs and systems in the pathological process, including the respiratory system. Given the fact that the lung surfactant is mainly represented by phospholipids, it can be presented that the surfactant is damaged and its functioning is impaired in APS. The results of our experiments showed that in antiphospholipid syndrome, there was a decline in the functional activity of the surfactant and a change in its biochemical composition. The introduction of FTY-720 normalized the parameters of the lung surfactant system, which were changed during the modeling of antiphospholipid syndrome. The work shows the effectiveness of the therapy of this autoimmune pathology with immunosuppressor FTY-720, which is a structural analogue of endogenous sphingosine. The effect of the drug is based on the modulation of sphingosine-1 phosphate receptors of lymphocytes. The main effect of the immunosuppressor FTY-720 as a result of receptor interaction is a decrease in the number of circulating lymphocytes. The research involved 85 white random bred male rats: Group 1 (APS modeling) consisted of 30 rats who were intravenously injected with cardiolipin antigen at a total dose of 0.2-0.4 mg per rat every other day for three weeks; Group 2 (control) consisted of 25 rats who were injected with 0.9% NaCl solution according to the same scheme; and Group 3 including 30 rats in which APS was combined with the administration of the immunosuppressive agent FTY-720 (intraperitoneally 1 mg/kg of animal weight). Three weeks later, there was an operation conducted with the purpose of extraction of the bronchopulmonary complex. After extraction of the bronchopulmonary complex, its triple lavage was carried out with 0.9% NaCl solution. The material of the experimental study was a lavage liquid, in which the biophysical and biochemical parameters of the surfactant were studied. Langmuir–Blodgett method was used to identify static, minimal and maximal surface tension. These figures were used to identify integrative indicator reflecting surfactant characteristics – the Clements stability index. The fractional composition of surfactant phospholipids was determined by thin-layer chromatography. The results of our experiments showed that in antiphospholipid syndrome, there was a decline in the functional activity of the surfactant and a change in its biochemical composition. The introduction of FTY-720 normalized the parameters of the lung surfactant system, which were changed during the modeling of antiphospholipid syndrome.

*Keywords: antiphospholipid syndrome, immunosuppressive agent FTY-720, lung surfactant, lung surface activity*

## Введение

В настоящее время проводится все больше исследований, подтверждающих высокую частоту встречаемости антифосфолипидного синдрома (АФС), что вызывает значительный интерес к данной аутоиммунной патологии [3]. Важно отметить, что АФС является приобретенным тромбофилическим заболеванием, при котором организм продуцирует аутоантитела как к фосфолипидсвязывающим белкам крови, так и к фосфолипидам, находящимся на клеточных мембранах [3]. На сегодняшний день антитела к фосфолипидам являются не только серологическими маркерами АФС, но и влияют на большинство процессов организма, в том числе связанных с мембранными фосфолипидами [3, 11]. Так, в исследованиях выявлено изменение сурфактантной системы легких при АФС у экспериментальных крыс [1, 4, 5].

Известно, что поверхность альвеолярного эпителия легких покрыта легочным сурфактантом, который представлен в основном фосфолипидами, в частности дипальмитоилфосфатидилхолином. Представляя собой незаменимый компонент альвеолярно-капиллярной мембраны, сурфактант играет важную роль в поддержании нормальной диффузионной способности легких, а также обеспечивает предотвращение ателектазирования альвеол [7]. Действие антифосфолипидных антител при АФС вызывает нарушение фосфолипидного состава и функций сурфактанта легких [3]. Экспериментальные исследования показали корректирующий эффект FTY-720 на нереспираторные функции легких и при других аутоиммунных заболеваниях [6].

В свете этого **целью нашего исследования** стало изучение воздействия иммуносупрессора FTY-720 на сурфактант легких в экспериментальной модели антифосфолипидного синдрома.

## Материалы и методы

Экспериментальные исследования были проведены на 85 крысах-самцах. При проведении опытов на лабораторных животных соблюдался международный этический кодекс, изложенный в Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, а также в соответствии с приказом Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Животные были разделены на следующие группы: 1-я группа (моделирование АФС) состояла из 30 крыс, которым внутривенно вводили кардиолипиновый антиген в суммарной дозе 0,2-0,4 мг на крысу через день в течение трех недель,

2-я группа (контроль) состояла из 25 крыс, которым вводили 0,9%-ный раствор NaCl по той же схеме; в 3-ю группу вошло 30 крыс, которым АФС сочетали с введением иммуносупрессора FTY-720 (внутрибрюшинно 1 мг/кг массы животного) [8].

Через 3 недели с целью извлечения бронхолегочного комплекса производилось оперативное вмешательство, которое осуществляли под наркозом («Золетил» 0,5 мг/кг). После извлечения бронхолегочного комплекса осуществлялся его трехкратный лаваж 0,9%-ным раствором NaCl. Материалом экспериментального исследования служила лаважная жидкость, в которой изучали биофизические и биохимические показатели сурфактанта. Используя метод Ленгмюра–Блуджетта, определяли статистическое, минимальное и максимальное поверхностное натяжение (ПН) [9]. Исходя из данных величин рассчитывали интегративный показатель, отражающий поверхностно-активные свойства сурфактанта – индекс стабильности по Clements.

$$\text{ИС по Clements (усл. ед.)} = \frac{2 \times (\text{ПН max} - \text{ПН min})}{(\text{ПН max} + \text{ПН min})}$$

Биохимическим методом оценки определяли содержание и фракционный состав фосфолипидов. Количественное определение фосфолипидов в БАС осуществляли по методу, в основе которого лежит экстракция липоидного фосфора смесью Блора (этиловый спирт и эфир в соотношении 3:1). При добавления молибденово-кислого аммония и аскорбиновой кислоты определяли содержание фосфора по образованию молибденовой сини [2]. Измерение концентрации липоидного фосфора осуществлялось фотоколориметрическим методом. Разделение фосфолипидов на фракции производили методом тонкослойной хроматографии. Идентификацию различных классов фосфолипидов осуществляли с помощью стандартных фосфолипидных фракций (Avanti Polar Lipids, США): фосфатидилхолина (PC), сфингомиелина (SM), фосфатидилсерина (PS), фосфатидилэтаноламина (PE), фосфатидной кислоты (PA), лизофосфатидилхолина (LPC). С помощью денситометра «Сорбфил» (Россия) в УФ-диапазоне анализировали хроматограммы, с последующей их обработкой в программном обеспечении SPSS Statistics 22, для определения процентного содержания основных фосфолипидных фракций. Далее по содержанию общих фосфолипидов и процентному соотношению рассчитывали абсолютное содержание отдельных фракций.

Обработка статистических данных выполнена на основе пакета прикладных компьютерных программ Microsoft Excel 2010 и SPSS 22.

## Результаты и обсуждение

В процессе экспериментального исследования было выявлено, что моделирование APS приводило к ухудшению поверхностной активности легких по сравнению с контролем: статическое ПН повышалось с 30,81 мН/м в контроле до 37,8 мН/м ( $p < 0,05$ ) при APS, ПН min с 22,94 мН/м до 30,64 мН/м ( $p < 0,01$ ) и ПН max с 40,06 мН/м до 43,63 мН/м ( $p < 0,05$ ). Индекс по Clements альвеол снижался с 0,55 усл. ед. в контрольной группе до 0,37 усл. ед. при моделировании APS ( $p < 0,05$ ).

Введение иммуносупрессора FTY-720 нивелировало изменения, характерные для APS. Параметры поверхностной активности сурфактанта были близки к контрольным значениям: статическое ПН составило 29,15 мН/м, ПН min 20,12 мН/м и ПН max 39,71 мН/м ( $p > 0,05$ ). Исходя из данных ПН min и ПН max индекс стабильности альвеол повышался до 0,65 усл. ед. и также не отличался от контроля ( $p > 0,05$ ).

Известно, что поверхностную активность сурфактанта определяет содержание общих фосфолипидов, где большую часть (до 70%) составляет наиболее поверхностно-активная фракция – PC [5, 10]. Можно предполагать, что повышение ПН БАС при экспериментальном моделировании APS могло быть связано с понижением уровня общих фосфолипидов сурфактанта до 15,87 мкмоль/г по сравнению с контрольным значением 32,47 мкмоль/г ( $p < 0,001$ ). В то время как сочетание APS и иммуносупрессора FTY-720 увеличивало общее содержание фосфолипидов до 29,98 мкмоль/г, что не отличалось от контрольных величин ( $p > 0,05$ ).

Изучение фракционного состава сурфактанта при APS показало, что уровень наиболее поверхностно-активной фракции – PC снижался с 20,81 мкмоль/г в контрольной группе до 8,06 мкмоль/г ( $p < 0,01$ ). При этом также возрастал уровень LPC до 2,44 мкмоль/г по сравнению с контрольным значением 1,23 мкмоль/г ( $p < 0,001$ ). Согласно литературным данным, LPC оказывает детергентное действие на сурфактант и играет важную роль в повреждении альвеолярного монослоя [12].

Одновременно при моделировании APS снижались следующие фракции: PS с 2,05 мкмоль/г до 0,79 мкмоль/г ( $p < 0,001$ ), PE с 3,08 мкмоль/г

до 1,78 мкмоль/г ( $p < 0,05$ ), PA с 1,80 мкмоль/г до 0,98 мкмоль/г ( $p < 0,05$ ). Известно, что PA является основным источником фосфолипидов сурфактанта, главным образом PC [12]. Можно предположить, что снижение PA способствовало в свою очередь уменьшению PC. Коэффициент PC/LPC, отражающий распад PC до LPC также снижался.

Введение иммуносупрессора FTY-720 восстанавливало фракционный состав фосфолипидов сурфактанта легких, измененный при APS: увеличивался PC до 1,29 мкмоль/г ( $p < 0,001$ ), снижался LPC до 0,98 мкмоль/г ( $p < 0,001$ ), и нормализовывалось соотношение PC/LPC ( $p < 0,001$ ). Также повышалось до контрольных величин содержание PS (1,29 мкмоль/г;  $p > 0,05$ ), PE (2,57 мкмоль/г;  $p > 0,05$ ), PA (1,39 мкмоль/г;  $p > 0,05$ ).

Иммуносупрессор FTY-720 является веществом структурно-подобным липидному медиатору сфингозин-1-фосфату (S1P) [8]. Данное вещество в организме под действием сфингозин-фосфокиназы, в основном 2-го типа, превращается в активную форму FTY-720, которая действует первоначально как агонист S1P-рецептора на лимфоцитах. В дальнейшем FTY-720 индуцирует интернализацию и деградацию этого рецептора, тем самым блокируя сигнальные пути, необходимые для выхода лимфоцитов из лимфатической ткани. Основным эффектом иммуносупрессора FTY-720 в результате такого рецепторного взаимодействия является снижение количества циркулирующих лимфоцитов [8].

Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что введение иммуносупрессора FTY-720 нивелирует степень нарушений сурфактанта легких, выявленных при моделировании APS.

## Заключение

Таким образом, при антифосфолипидном синдроме изменяется фракционный состав фосфолипидов, наблюдается снижение содержания фосфатидилхолина – основной поверхностно-активной фракции, что влечет за собой ухудшение поверхностной активности легких. Введение иммуносупрессора FTY-720 восстанавливает показатели и функциональную активность системы сурфактанта легких, которые были изменены при моделировании аутоиммунного синдрома.

## Список литературы / References

1. Брындина И.Г., Уракова М.А., Лебедева Н.В. Фосфолипиды эритроцитов, плазмы крови, сурфактанта и коагуляционная активность легких при экспериментальном антифосфолипидном синдроме // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 122. [Bryndina I.G., Urakova M.A., Lebedeva N.V., Phospholipids



of erythrocytes, blood plasma, surfactant and coagulation activity of the lungs in experimental antiphospholipid syndrome. *Meditinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, p. 122. (In Russ.)]

2. Кондрахин И.П., Архипов А.В., Левченко В.И. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. М.: Колос, 2004. 520 с. [Kondrahin I.P., Arhipov A.V., Levchenko V.I. Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics]. Moscow: Kolos, 2004. 520 p. Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром. М.: Литтерра, 2004. 424 с.

3. Уракова М.А. Метаболические функции и водный баланс легких при экспериментальном антифосфолипидном синдроме // Вестник Уральского медицинский академической науки, 2012. Т. 39, № 2. С. 66. [Urakova M.A. Metabolic activity and water balance of lung in experimental antiphospholipid syndrome. *Vestnik Uralskoy meditsinkoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic*, 2012, Vol. 39, no. 2, p. 66. (In Russ.)]

4. Уракова М.А., Брындына И.Г. Метаболическая активность и водный баланс легких при моделировании аутоиммунной патологии у крыс // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология, 2013. № 29. С. 272-276. [Urakova M.A., Bryndina I.G. Metabolic activity and water balance of lungs in modeling of autoimmune pathology in rats. *Vestnik Tverskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya i ekologiya = Bulletin of Tver State University. Series: Biology and ecology*, 2013, no. 29, pp. 272-276. (In Russ.)]

5. Уракова М.А., Брындына И.Г. Влияние финголимода на сурфактант и гемостаз-регулирующую активность легких при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите // Патогенез, 2020. Т. 18, № 4. С. 43-48. [Urakova M.A., Bryndina I.G., The influence of fingolimod on surfactant and hemostasis-regulating activity of the lung in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Patogenez = Pathogenesis*, 2020, Vol. 18, no. 4, pp. 43-48. (In Russ.)]

6. Al-Saedy M., Tarokh A., Nelson S., Hossini K., Green F., Ling Ch.-Ch. The role of multilayers in preventing the premature buck-ling of the pulmonary surfactant. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2017, Vol. 1859, no. 8, pp. 1372-1380.

7. Chaudhry B.Z., Cohen J.A., Conway D.S. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators for the treatment of multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*, 2017, Vol. 14, no. 4, pp. 859-873.

8. Chen Z., Zhong M., Luo Y. Determination of rheology and surface tension of airway surface liquid: a review of clinical relevance and measurement techniques. *Respir. Res.*, 2019, Vol. 20, no. 1, 274. doi: 10.1186/s12931-019-1229-1.

9. Kitamura Y., Nomura M., Shima H. Acute lung injury associated with systemic inflammatory response syndrome following subarachnoid. *Neurol. Med. Chir.*, 2010., Vol. 50, pp. 456-460.

10. Nomura H., Hirashima Y., Endo S. Anticardiolipin antibody aggravates cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rabbits. *Stroke*, 1998, Vol. 29, no. 5, pp. 1014-1018.

11. Scaccabarozzi D., Deroost K., Lays N., Salè F.O., van den Steen, Taramelli D. Altered lipid composition of surfactant and lung tissue in murine experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 12, e0143195. doi: 10.1371/journal.pone.0143195.

---

**Авторы:**

**Уракова М.А.** — д.м.н., доцент кафедры патологической физиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

**Мустаев В.Р.** — студент 3-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

**Каримова Г.Р.** — студентка 3-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

**Authors:**

**Urakova M.A.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathological Physiology and Immunology, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

**Mustaev V.R.**, 3<sup>rd</sup> year Student of the Faculty of General Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

**Karimova G.R.**, 3<sup>rd</sup> year Student of the Faculty of General Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

**Кузнецова М.Г.** — студентка 3-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

**Рахматуллина Э.Н.** — студентка 3-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

**Оленева С.А.** — студентка 3-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

**Уракова К.В.** — студентка 1-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Ижевск, Россия

**Kuznetsova M.G.**, 3<sup>rd</sup> year Student of the Faculty of General Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

**Rakhmatullina E.N.**, 3<sup>rd</sup> year Student of the Faculty of General Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

**Oleneva S.A.**, 3<sup>rd</sup> year Student of the Faculty of General Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

**Urakova K.V.**, 1<sup>st</sup> year Student of the Faculty of General Medicine, Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

---

Поступила 30.03.2024

Отправлена на доработку 01.04.2024

Принята к печати 05.04.2024

Received 30.03.2024

Revision received 01.04.2024

Accepted 05.04.2024

## **АВИДИН-ПОЗИТИВНЫЕ ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВОДОРАСТВОРИМОГО КРЕМНИЯ В ТЕЧЕНИЕ ДЕВЯТИ МЕСЯЦЕВ**

**Григорьева Е.А.<sup>1</sup>, Гордова В.С.<sup>2</sup>, Сергеева В.Е.<sup>1</sup>, Смородченко А.Т.<sup>3</sup>,  
Смирнова Н.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

<sup>3</sup> Медицинская школа Берлина – Университет здоровья и медицины, Берлин, Германия

**Резюме.** Тучные клетки за счет содержащихся в них медиаторов – активные участники различных процессов, происходящих в организме. Изучена реакция авидин-позитивных тучных клеток печени на поступление кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев.

Эксперимент проведен на лабораторных нелинейных крысах-самцах, которые были разделены на две группы: контрольная получала питьевую бутилированную воду с концентрацией кремния 10 мг/л, опытная – ту же самую воду, но с добавлением девятиводного метасиликата натрия, которая использовалась для доведения общей концентрации кремния в питьевой воде до 20 мг/л. Массовая концентрация кремния в воде контрольной и опытной групп была определена с помощью спектрометра эмиссионного с индуктивно связанной плазмой 5110 ICP-OES. Через девять месяцев животные были выведены из эксперимента, печень извлечена и помещена в 10% нейтральный формалин для последующей заливки в парафин. Срезы печени толщиной 6 мкм после депарафинизации инкубировались 30 минут с авидином, меченным флуоресцентной меткой зеленого цвета (Avidin, Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen, Германия). Препараты анализировались под люминесцентным микроскопом при длине волны возбуждающего света 495 нм.

По результатам исследования в печени крыс опытной группы обнаружено увеличение количества авидин-позитивных тучных клеток за счет слабо флуоресцирующих, а также увеличение медианы их площади и интенсивности флуоресценции. Выявлено, что изменение медианы площади авидин-позитивных тучных клеток в печени крыс опытной группы идет за счет уменьшения количества клеток малого размера и увеличения количества клеток среднего и большого размера. Установлены прямая сильная и прямая средняя корреляционные связи между площадью клетки и ее интенсивностью в контрольной и опытной группах соответственно.

Таким образом, проведенное исследование позволило расширить данные о воздействии водорастворимого кремния на печень и косвенно предположить о возникновении воспалительных процессов в изучаемом органе.

*Ключевые слова:* тучные клетки, авидин-позитивные клетки, кремний, печень, силикаты, гепарин

### **Адрес для переписки:**

Григорьева Евгения Александровна  
ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет  
имени И.Н. Ульянова»  
428015, Россия, Чувашская Республика, г. Чебоксары,  
Московский пр., 45.  
Тел.: 8 (960) 313-99-95.  
E-mail: shgrev@yandex.ru

### **Address for correspondence:**

Evgeniia A. Grigoryeva  
I.N. Ulyanov Chuvash State University  
45 Moskovsky Ave  
Cheboksary, Chuvash Republic  
428015 Russian Federation  
Phone: +7 (960) 313-99-95.  
E-mail: shgrev@yandex.ru

### **Образец цитирования:**

Е.А. Григорьева, В.С. Гордова, В.Е. Сергеева,  
А.Т. Смородченко, Н.В. Смирнова «Авидин-  
позитивные тучные клетки печени при воздействии  
водорастворимого кремния в течение девяти месяцев»  
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,  
№ 2. С. 157-160.  
doi: 10.46235/1028-7221-16863-AMC

doi: 10.46235/1028-7221-16863-AMC

© Григорьева Е.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

E.A. Grigoryeva, V.S. Gordova, V.E. Sergeeva,  
A.T. Smorodchenko, N.V. Smirnova “Avidin-positive mast  
cells of the liver when exposed to water-soluble silicon for  
nine months”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 157-160.  
doi: 10.46235/1028-7221-16863-AMC

© Grigoryeva E.A. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16863-AMC

## AVIDIN-POSITIVE MAST CELLS OF THE LIVER WHEN EXPOSED TO WATER-SOLUBLE SILICON FOR NINE MONTHS

Grigoryeva E.A.<sup>a</sup>, Gordova V.S.<sup>b</sup>, Sergeeva V.E.<sup>a</sup>, Smorodchenko A.T.<sup>c</sup>, Smirnova N.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

<sup>b</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

<sup>c</sup> Medical School Berlin – University of Health and Medicine, Berlin, Germany

**Abstract.** Mast cells, due to the mediators contained in them, are active participants in various processes occurring in the body. The reaction of avidin-positive mast cells of the liver to the intake of silicon with drinking water at a concentration of 20 mg/L for nine months was studied. The experiment was conducted on laboratory nonlinear male rats, which were divided into two groups: the control group received bottled drinking water with a silicon concentration of 10 mg/L; the experimental group received the same water, but with the addition of sodium metasilicate nine-hydrate, which was used to adjust the total concentration of silicon in drinking water to 20 mg/L. The mass concentration of silicon in the water of the control and experimental groups was determined using an inductively coupled plasma emission spectrometer 5110 ICP-OES. After nine months, the animals were sacrificed, the liver was extracted and fixed in 10% neutral formalin, processed and embedded in paraffin. After deparaffinization, 6- $\mu$ m-thick liver sections were incubated for 30 minutes with green fluorescent-labeled avidin (Avidin, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 conjugate, Invitrogen, Germany). The preparations were analyzed under a fluorescence microscope at an excitation light wavelength of 495 nm. According to the results of the study, an increase in the number of avidin-positive mast cells due to weakly fluorescent ones was found in the liver of rats of the experimental group, as well as an increase in the median of their area and fluorescence intensity. It was revealed that the change in the median of area of avidin-positive mast cells in the liver of rats of the experimental group is due to a decrease in the number of small cells and an increase in the number of medium and large cells. Positive strong and positive average correlations were established between the cell area and its intensity in the control and experimental groups, respectively.

Thus, the study made it possible to expand the data on the effect of water-soluble silicon on the liver and indirectly suggest the occurrence of inflammatory processes in the organ under study.

*Keywords:* mast cells, avidin-positive cells, silicon, liver, silicates, heparin

### Введение

Тучные клетки – многофункциональные клетки, задействованные во многих физиологических и патологических процессах, происходящих в организме [1, 5]. Ранее нами было обнаружено, что хроническое поступление с питьевой водой кремния приводит к изменению микроморфологического строения печени лабораторных крыс, а также увеличению средней площади тучных клеток, выявляемых толуидиновым синим [2]. Окраска толуидиновым синим позволяет оценить степень зрелости гепарина визуально, его количество можно рассчитать только с помощью индекса сульфатированности [3]. В то же время avidin связывается с гепарином и его флуоресценция прямо пропорциональна количеству гепарина в гранулах тучных клеток [1]. Гепарин – гликозаминогликан, являющийся матриксом для обеспечения оптимального расположения, хранения и регуляции экспорта синтезируемых в клетке медиаторов, в отношении которых он проявляет регуляторные свойства. Кроме того,

гепарин, связываясь со многими белками, может препятствовать рекрутированию провоспалительных клеток, адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам сосудов [4]. Таким образом, целью работы явилось изучение реакции avidin-позитивных тучных клеток печени на поступление кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев.

### Материалы и методы

Эксперимент проводился на белых нелинейных крысах-самцах, находившихся в обычных условиях вивария при естественном освещении. Животные (n = 6) были разделены на две группы: контрольную (n = 3), которая получала питьевую бутилированную воду; опытную (n = 3), получавшую ту же самую воду, но с добавлением девятиводного метасиликата натрия в концентрации 10 мг/л в пересчете на кремний. Определение массовой концентрации растворенных форм кремния проводилось с помощью спектрометра эмиссионного с индуктивно связанной плазмой

5110 ICP-OES. Так, в питьевой воде, получаемой животными контрольной группы, содержалось 10 мг/л кремния, а в воде, получаемой опытной группой, – 20 мг/л.

Через девять месяцев животные были выведены из эксперимента, печень извлечена и помещена в 10% нейтральный формалин для последующей заливки в парафин. Срезы печени толщиной 6 мкм после депарафинизации инкубировались 30 минут с авидином, меченным флуоресцентной меткой зеленого цвета. Рабочий раствор готовился из готового меченого авидина (Avidin, Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen, Германия) и 0,1 М фосфатного буфера в соотношении 1:200. Раствор авидина сливался, срезы тщательно промывались в фосфатном буфере. После промывки в фосфатном буфере срезы заключались под покровное стекло в раствор, содержащий фосфатный буфер и глицерин (1:1). Препараты анализировались под люминесцентным микроскопом при длине волны возбуждающего света 495 нм [1, 5].

Микрофотографии с полей зрения, полученные при увеличении объектива  $\times 40$ , обрабатывали в программе AmScore: подсчитывали среднее количество авидин-позитивных клеток, измеряли площадь и интенсивность флуоресценции клеток с помощью функции «цветной куб» в автоматическом режиме.

В целях определения взаимосвязи между площадью клетки и ее интенсивностью флуоресценции рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ). При этом сила корреляционной связи считалась слабой при  $0 < r_s < 0,29$ , средней – при  $0,3 < r_s < 0,69$ , сильной – при  $0,7 < r_s < 1,0$ .

Полученные в ходе измерения выборки проверяли на нормальность распределения с использованием критериев Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. Данные имеющие нормальное распределение представляли как среднюю арифметическую со стандартной ошибкой среднего значения, в виде  $M \pm m$ . Статистическую значимость отличий определяли с помощью  $t$ -критерия Стьюдента для независимых выборок. При ненормальном распределении выборок данные представлялись как медиана ( $Me$ ) и интерквартильный размах ( $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ ). В этом случае для определения статистической значимости использовали  $U$ -критерий Манна–Уитни. Различия в обоих случаях считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Авидин-позитивные тучные клетки обладали зеленой флуоресценцией и преимущественно располагались в области портальных зон печени. Визуальная оценка обнаружила увеличение

их количества в печени крыс, получавших водорастворимый кремний в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, особенно за счет клеток со слабой флуоресценцией, которые, вероятно, содержали слабо сульфатированный гепарин. Также отмечалось увеличение числа дегранулированных клеток в печени крыс опытной группы. Подсчитывали среднее количество клеток в области портальных зон печеночной дольки, так, в контрольной группе их количество составило  $15 \pm 1,41$ , а в опытной группе –  $17,6 \pm 0,71$  клеток ( $p = 0,156$ ). При этом в контрольной группе 26,7% клеток имели слабую флуоресценцию, в опытной – 31,8%. С помощью функции «цветной куб» определяли медиану площади флуоресцирующих клеток, которая составила 14,66 (5,37–34,17) и 20,73 (9,5–48,73) для контрольной и опытной группы соответственно ( $p = 0,001$ ). Площади клеток распределяли с помощью гистограммы на три группы: малые по размеру ( $< 38,62$  мкм<sup>2</sup>), средние (38,62–74,80 мкм<sup>2</sup>) и большие ( $> 74,80$  мкм<sup>2</sup>) по размеру. Так, в контрольной группе распределение составило 77%, 13% и 10%, а в опытной – 67%, 21% и 12%. Т. е. медиана площади тучных клеток изменялась за счет уменьшения количества клеток малого размера и увеличения количества клеток среднего и большого размера. Определяли среднюю интенсивность флуоресценции среди малых, средних и больших клеток, так, в контрольной группе их интенсивность составила 40,94 $\pm$ 2,88 у. е., 60,34 $\pm$ 6,54 у. е. и 79,54 $\pm$ 6,07 у. е., а в опытной – 78,28 $\pm$ 3,83 у. е., 118,25 $\pm$ 5,17 у. е. и 103,21 $\pm$ 4,68 у. е. соответственно. Проведенный корреляционный анализ подтвердил наличие прямой сильной корреляционной связи между площадью клетки и ее интенсивностью в контрольной группе ( $r_s = 0,73$ ;  $p < 0,05$ ) и прямой средней силы корреляционной связи в опытной ( $r_s = 0,67$ ;  $p < 0,05$ ) группе.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что в печени крыс, наряду с увеличением площади авидин-позитивных тучных клеток, происходит увеличение количества гепарина; возрастает количество гепарина в тучных клетках печени крыс опытной группы в сравнении с контрольной.

## Заключение

Таким образом, можно сделать вывод, что кремний, поступающий с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, приводит к увеличению медианы площади авидин-позитивных тучных клеток в печени, интенсивности их флуоресценции, а также их количества в области портальных зон за счет клеток со слабой флуоресценцией.

## Список литературы / References

1. Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. Современные технологии визуализации тучных клеток для биологии и медицины (обзор) // Современные технологии в медицине, 2021. Т. 13, № 4. С. 93-109. [Grigoryev I.P., Korzhevskii D.E. Modern imaging technologies of mast cells for biology and medicine (review). *Sovremennyye tehnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2021, Vol. 13, no. 4, pp. 93-107. (In Russ.)]
2. Григорьева Е.А., Гордова В.С., Сергеева В.Е. Влияние наночастиц кремния и водорастворимых силикатов на печень (сравнение результатов собственных исследований с литературными данными) // Acta medica Eurasica, 2022. № 4. С. 108-120. [Grigoryeva E.A., Gordova V.S., Sergeeva V.E. The effect of silicon nanoparticles and water-soluble silicates on the liver (comparison of our own research results with literature data). *Acta Medica Eurasica = Acta Medica Eurasica*, 2022, Vol. 4, pp. 108-120.
3. Ильина Л.Ю., Сапожников С.П., Козлов В.А., Дячкова И.М., Гордова В.С. Количественная оценка сульфатирования тучных клеток // Acta Medica Eurasica, 2020. № 2. С. 43-53. [Ilyina L.Yu., Sapozhnikov S.P., Kozlov V.A., Dyachkova I.M., Gordova V.S. Quantitative evaluation of mast cells sulfation. *Acta medica Eurasica = Acta Medica Eurasica*, 2020, no. 2, pp. 43-53.
4. Кондашевская М.В. Гепарин тучных клеток – новые сведения о старом компоненте (обзор литературы) // Вестник Российской академии медицинских наук, 2021. Т. 76, № 2. С. 149-158. [Kondashevskaya M.V. Mast Cells Heparin – New Information on the Old Component (Review). *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2021, Vol. 76, no. 2, pp. 149-158.
5. Тимофеева Н.Ю., Бубнова Н.В., Стоменская И.С., Стручко Г.Ю., Кострова О.Ю. Методы визуализации тучных клеток (обзор литературы) // Acta medica Eurasica, 2023. № 1. С. 160-170. [Timofeeva N.Yu., Bubnova N.V., Stomenskaya I.S., Struchko G.Yu., Kostrova O.Yu. Methods of visualization of mast cells (literature review). *Acta medica Eurasica = Acta Medica Eurasica*, 2023, Vol. 1, pp. 160-170.

---

### Авторы:

**Григорьева Е.А.** – ассистент кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

**Гордова В.С.** – к.м.н., доцент кафедры фундаментальной медицины медицинского института ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

**Сергеева В.Е.** – д.б.н., профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

**Смородченко А.Т.** – д.м.н., профессор кафедры анатомии, Медицинская школа Берлина – Университет здоровья и медицины, Берлин, Германия

**Смирнова Н.В.** – заведующая кафедрой медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

### Authors:

**Grigoryeva E.A.**, Assistant Professor, Department of Medical Biology with a Course of Microbiology and Virology, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

**Gordova V.S.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Fundamental Medicine of the Medical Institute, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Sergeeva V.E.**, PhD, MD (Biology), Professor, Department of Medical Biology with a Course of Microbiology and Virology, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

**Smorodchenko A.T.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Anatomy Department, Medical School Berlin – University of Health and Medicine, Berlin, Germany

**Smirnova N.V.**, Head, Department of Medical Biology with a Course in Microbiology and Virology, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

---

Поступила 01.04.2024

Отправлена на доработку 03.04.2024

Принята к печати 05.04.2024

---

Received 01.04.2024

Revision received 03.04.2024

Accepted 05.04.2024

## АНАЛИЗ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛЮСТИ КРЫСЫ В МОДЕЛИ ПАРОДОНТИТА

Саркисян Н.Г.<sup>1,2</sup>, Катаева Н.Н.<sup>1</sup>, Хохрякова Д.А.<sup>1</sup>, Меликян А.Г.<sup>1</sup>,  
Осипова И.М.<sup>1</sup>

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

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

**Резюме.** Элементный состав костной ткани челюсти зависит от множества внешних и внутренних факторов, влияющих на организм. При пародонтите воспалительные процессы охватывают мягкие и костные ткани, окружающие зуб. Структура костной ткани напрямую отражает ее способность сдерживать воспаление и регенерировать после воздействия повреждающих факторов.

Цель исследования — изучить элементный состав костной ткани челюсти крысы при хроническом воспалительном процессе пародонта. В ходе эксперимента моделировали пародонтит у лабораторной крысы линии Wistar путем введения инсулиновой иглы в десневой край нижней челюсти крысы и последующим ее извлечением через неделю. Спустя месяц особь вывели из эксперимента передозировкой эфира для выделения исследуемого костного сегмента. Далее изучение образца костной ткани осуществляли методом атомно-эмиссионной спектроскопии.

В исследуемом сегменте костной ткани определено 67 химических элементов в количественном диапазоне до 10<sup>-4</sup> массовых процентов. Самая высокая массовая доля принадлежит базовым элементам костной ткани: кальцию, фосфору, магнию, натрию и сере, поступление которых обеспечивается за счет питательных веществ, при этом в течение эксперимента животные получали стандартный полнорационный комбикорм, в котором содержалось приближенное к норме количество белков, витамина D, Ca, P и Se. В изучаемом образце костной ткани количественное соотношение Ca/P составило 1,685, что незначительно превышает оптимальное. Повышение данного показателя связано с уменьшением содержания фосфора в костной ткани, что можно объяснить недостаточным суточным поступлением этого элемента с пищей, а также с рядом местных факторов. При травматизации челюсти в ходе моделирования пародонтита в данной области протекает воспалительный процесс, экспериментальное животное испытывает стресс, что приводит к деминерализации тканей альвеолярного отростка челюсти, о чем свидетельствует понижение содержания фосфора и селена в составе костной ткани. Кроме того, элементный анализ показал наличие инородных элементов в составе костной ткани, количество которых соответствует интервалу от 0,001% до 0,06%. В основном это элементы, образующие простые вещества — металлы: висмут, галлий, свинец, иридий, титан, цинк, ртуть, молибден.

### Адрес для переписки:

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

### Address for correspondence:

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

### Образец цитирования:

Н.Г. Саркисян, Н.Н. Катаева, Д.А. Хохрякова, А.Г. Меликян, И.М. Осипова «Анализ элементного состава костной ткани челюсти крысы в модели пародонтита» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 161-166.  
doi: 10.46235/1028-7221-16671-AOR

© Саркисян Н.Г. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

N.G. Sarkisyan, N.N. Kataeva, D.A. Khokhryakova, A.H. Melikyan, I.M. Osipova "Analysis of rat jaw bone tissue elemental composition in a model of periodontitis", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 161-166.  
doi: 10.46235/1028-7221-16671-AOR

© Sarkisyan N.G. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16671-AOR

Перечень этих металлов соответствует химическому составу инсулиновой иглы, контактирующей с костной тканью при травматизации на протяжении недели.

Полученные результаты исследования могут быть учтены при планировании и проведении полиэтиотропной терапии воспалительно-дистрофических заболеваний пародонта еще на ранних стадиях их развития, когда видимые клинические проявления заболевания в полости рта минимальны.

*Ключевые слова:* пародонтит, травматизация кости, элементный состав кости челюсти, фосфорно-кальциевое соотношение, дефицит селена, остеопороз

## ANALYSIS OF RAT JAW BONE TISSUE ELEMENTAL COMPOSITION IN A MODEL OF PERIODONTITIS

Sarkisyan N.G.<sup>a,b</sup>, Kataeva N.N.<sup>a</sup>, Khokhryakova D.A.<sup>a</sup>, Melikyan A.H.<sup>a</sup>, Osipova I.M.<sup>a</sup>

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

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

**Abstract.** The elemental composition of jaw bone tissue depends on many external and internal factors affecting the body. The structure of bone tissue directly reflects its ability to restrain inflammation and regenerate after exposure to damaging factors.

The purpose of the study is to study the elemental composition of the rat jaw bone tissue during chronic periodontal inflammatory process. A month later, the individual was removed from the experiment by an overdose of ether to isolate the bone segment under study. Next, the bone tissue sample was studied using atomic emission spectroscopy.

In the studied segment of bone tissue, 67 chemical elements were identified in a quantitative range of up to  $10^{-4}$  mass percent. The highest mass fraction belongs to the basic elements of bone tissue: calcium, phosphorus, magnesium, sodium, and sulfur. While during the experiment the animals received standard complete feed, which contained proteins, vitamin D close to normal, Ca, P and Se. In the bone tissue sample under study, the quantitative Ca/P ratio was 1.685, which slightly exceeds the optimal one. An increase in this indicator is associated with a decrease in phosphorus content in bone tissue, which can be explained by insufficient daily intake of this element from food, as well as a number of local factors. When the jaw is traumatized during the modeling of periodontitis, an inflammatory process occurs in this area, the experimental animal experiences stress, which leads to demineralization of the tissues of the alveolar process of the jaw, as evidenced by a decrease in the content of phosphorus and selenium in the bone tissue. In addition, elemental analysis showed the presence of foreign elements in the bone tissue, the amount of which corresponds to the range from 0.001% to 0.06%. Basically, these are elements that form simple substances - metals: bismuth, gallium, lead, iridium, titanium, zinc, mercury, molybdenum.

The results of the study can be taken into account when planning and conducting polyetiologic therapy for inflammatory-dystrophic periodontal diseases in the early stages of their development.

*Keywords:* periodontitis, bone trauma, elemental composition of the jaw bone, phosphorus-calcium ratio, selenium deficiency, osteoporosis

## Введение

Воспалительно-дистрофические заболевания пародонта относятся к часто встречающимся заболеваниям зубочелюстной системы, которым страдают около 80% населения согласно данным современных исследований [7]. На сегодняшний день активно изучаются факторы риска, приводящие к пародонтиту, для разработки эффективных методов профилактики и лечения данного заболевания [9, 11].

Воспалительные процессы при пародонтите охватывают не только мягкие ткани, но и кост-

ные структуры. Основная роль в развитии патологий пародонта принадлежит микробиоте полости рта. Несмотря на существенное влияние патогенных микроорганизмов на процесс формирования данного заболевания, имеется множество факторов, которые способны запускать каскад воспалительных реакций в комплексе тканей, окружающих зуб [1, 2].

Элементный состав костной ткани зависит от многих факторов, как местных, так и общих. Строение кости может меняться в зависимости от качества пищевого рациона, физической на-



грузки, действия стресса, наличия заболеваний внутренних органов, травм челюстно-лицевой области, видового состава бактериального пейзажа полости рта и т. д. [2]. Кроме того, структура костной ткани напрямую отражает ее способность сдерживать воспаление и регенерировать после воздействия повреждающих факторов.

**Цель исследования** – изучить элементный состав костной ткани челюсти экспериментального животного при хроническом воспалительном заболевании пародонта.

## Материалы и методы

Начальный этап работы проводили на базе ФГБУН ИИФ УрО РАН г. Екатеринбург: создавали запатентованную модель развития хронического пародонтита у лабораторных крыс [8]. Для этого в десневой край нижней челюсти крысы линии Wistar вводили инсулиновую иглу длиной 12 мм. Игла вводилась с вестибулярной стороны вплотную вдоль правого нижнего резца с медиального края. Через 7 дней производилось извлечение иглы. В ходе эксперимента соблюдалось гуманное отношение к животным в соответствии с Хельсинкской декларацией. В ходе работы крысы находились в проветриваемых клетках Rair ISO System, по 5 животных в клетке, 12-часовым циклом освещения при температуре помещения 22–24 °С. Рацион питания состоял из стандартного комбикорма, животные имели свободный доступ к воде и корму. Спустя месяц после извлечения инородного тела особи выводились из эксперимента передозировкой эфира для выделения исследуемого костного сегмента.

Далее изучение образца костной ткани осуществляли в лаборатории центра коллективного пользования ФГБУН ИВЭ УрО РАН г. Екатеринбург. Элементный состав костной ткани получен методом атомно-эмиссионной спектроскопии (прибор – эмиссионный спектрометр iCAP 6300 Duo фирмы Thermo Scientific, Великобритания). Диапазон определяемых элементов: Li-N, Na-S, K-Se, Rb-Mo, Ru-I, Cs-Nd, Sm-Bi, Th, U, Pu.

## Результаты и обсуждение

В исследуемом сегменте костной ткани методом атомно-эмиссионной спектроскопии определено 67 химических элементов в определенном диапазоне до  $10^{-4}$  массовых процентов. Самая высокая массовая доля принадлежит следующим элементам: кальцию, фосфору, магнию, натрию и сере, т. к. это базовые элементы любой минерализованной костной ткани, в том числе, и костной ткани челюсти [5].

Главным источником макро- и микроэлементов для организма, указанных в таблице 1, является пищевой рацион. Для нормального образования и обновления костной ткани необходимо достаточное содержание в пище белков, микроэлементов (особенно кальция и фосфора), а также витаминов, в частности витамина D, который напрямую влияет на метаболизм Ca и P.

Перечисленные макро- и микроэлементы должны не только в достаточном количестве содержаться в потребляемой пище, но и эффективно усваиваться в процессе пищеварения. Например, дефицит клетчатки в рационе является причиной снижения всасываемости кальция и фосфора в кишечнике. Скучное питание, недостаточное поступление на этом фоне витамина D, Ca и P приводит к снижению содержания кальция и фосфора, нарушению образования гидроксиапатита в костной ткани, что может являться причиной деструкции костной ткани вокруг корней зубов. Также важно поступление с пищей селена, этот химический элемент участвует в процессе метаболизма костной ткани, ее регенерации при повреждении [3]. В течение эксперимента животные получали стандартный полнорационный комбикорм, в котором содержалось приближенное к норме количество белков, витамина D, Ca, P и селена (см. табл. 2).

В исследуемом образце костной ткани количественное соотношение Ca/P составило 1,685, что незначительно превышает оптимальное (1,67). Изменение данного соотношения свидетельствует о снижении содержания уровня фосфора

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ БАЗОВЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ОБРАЗЦЕ КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛЮСТИ

TABLE 1. QUANTITATIVE CONTENT OF BASIC ELEMENTS IN A JAW BONE TISSUE SAMPLE

Химический элемент Chemical element	Массовая доля элемента костной ткани в норме, % Normal mass fraction of bone tissue element, %	Массовая доля элемента костной ткани подопытного животного, % Mass fraction of the bone tissue element of the experimental animal, %
Ca	–	22,14
P	–	13,14
Mg	0,55-0,72	0,69
Na	0,5-0,7	0,58
S	0,1-0,2	0,16
Se	0,008	0,004

**ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В КОРМЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

TABLE 2. CONTENT OF MINERALS IN THE FEED OF LABORATORY ANIMALS

Минеральные вещества Minerals	Норма суточного потребления Daily consumption rate	Содержание в 100 г стандартного комбикорма Contents per 100 g of standard feed
<b>Витамин D</b> Vitamin D	600-800 МЕ / 600-800 IU	1350 МЕ / 1350 IU
<b>Ca</b>	1000 мг / 1000 mg	1003 мг / 1003 mg
<b>P</b>	800-1400 мг / 800-1400 mg	770 мг / 700 mg
<b>Se</b>	20-70 мкг / 20-70 µg	70 мкг / 70 µg

в костной ткани, что можно связать с его недостаточным суточным поступлением с пищей (см. табл. 2). Уменьшение содержания фосфора в структуре гидроксиапатита является predisposing фактором к воспалительным процессам вокруг корней зубов, локальному остеопорозу костной ткани челюсти. Также, несмотря на нормальное суточное поступление селена с пищевым рационом (табл. 2), наблюдается снижение его содержания в костной ткани – 0,004%, при норме – 0,008% (см. табл. 1). Уменьшение данного показателя свидетельствует об изменении метаболических процессов в костной ткани, снижении регенерации костных балок и синтеза гидроксиапатита.

Другим общим фактором, оказывающим влияние на строение костной ткани, является стресс. Известно, что на морфогенез костной системы влияет состояние иммунной защиты организма. При стрессе активируется симпатoadrenalовая система, которая изменяет течение обмена веществ. Длительное воздействие стрессового фактора, в частности боли, приводит к истощению приспособительных сил организма, нарушению иммунного ответа, гомеостаза и метаболизма.

На фоне хронического болевого синдрома воспаление протекает более активно – наблюдается выраженный отек и инфильтрация тканей, дистрофические изменения клеток, при этом снижаются репаративные способности пародонта и уменьшается количество новообразованной соединительной ткани [4].

В ходе эксперимента крысы испытывали хронический болевой синдром после введения инсулиновой иглы для индуцирования пародонтита и до момента ее извлечения (игла находилась в костной ткани челюсти в течение 7 дней). Можно предположить, что постоянное ощущение боли изменило реактивность нервной и иммунной системы и привело к более активному течению воспаления, которое проявилось выраженным отеком и инфильтрацией костной ткани, ее резорбции вокруг введенного инородного тела. Таким образом, данный фактор также мог повлиять на снижение содержания P в тканях альвеолярного отростка челюсти. Строение костной ткани также изменяется при операциях и травмах. Любое оперативное вмешательство на челюстях сопровождается травмированием костной ткани и активацией каскада реакций иммунного ответа [6].

**ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ В ОБРАЗЦЕ КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛЮСТИ**

TABLE 3. QUANTITATIVE CONTENT OF ELEMENTS IN A JAW BONE TISSUE SAMPLE

Химический элемент Chemical element	Массовая доля элемента костной ткани в норме, % Normal mass fraction of bone tissue element, %	Массовая доля элемента костной ткани подопытного животного, % Mass fraction of the bone tissue element of the experimental animal, %
<b>Fe</b>	0,0015	0,005
<b>Cu</b>	0,0004	0,003
<b>Ni</b>	0,0004	0,001
<b>Cr</b>	0,001	0,003
<b>Zn</b>	0,007	0,03
<b>Si</b>	0,002	0,007
<b>Bi</b>	–	0,06
<b>Ti</b>	0,009	0,03
<b>Ga</b>	–	0,05
<b>Pb</b>	0,02	0,05

Элементный анализ показал наличие инородных элементов в составе костной ткани, в количестве 0,001-0,06% (см. табл. 3). В основном это элементы, которые образуют простые вещества – металлы. Среди них обнаружены: свинец, иридий, титан, висмут, галлий, цинк, ртуть, молибден. Перечень этих металлов соответствует химическому составу инсулиновой иглы, контактирующей с костной тканью при травматизации на протяжении недели. Инсулиновые иглы изготавливаются из стали, в состав которой входят легирующие элементы: Si, P, Bi, Pb, Ti, Zn и другие. Легированная сталь приводит к улучшению таких технических характеристик, как коррозионная стойкость, тугоплавкость, повышенная твердость и т.п. Таким образом, после извлечения металлического инородного тела из альвеолы челюсти, в костной ткани определялись частицы металлов, накопленных в костной ткани (табл. 3).

Введение инородного тела в кость челюсти могло привести к изменению привычной окклюзии, что в свою очередь стало причиной перегрузки пародонта рядом стоящих зубов. При нефизиологической нагрузке на зуб формируется травматический узел, который приводит к развитию воспаления в данной области, сопровождающееся деминерализацией тканей альвеолярного отростка челюсти. Перегрузка пародонта ведет к резорбции костной ткани вокруг корня зуба, снижению микротвердости кости и уменьшению сопротивляемости к нагрузке [10]. Т. е. данный местный фактор также влияет на соотношение Ca/P в

костной ткани, приводя к снижению содержания P в результате процесса резорбции кости.

## Заключение

Таким образом, на изменение элементного состава костной ткани челюсти при пародонтите влияет общее состояние организма, качество питания, хронический болевой синдром, операции на челюстях, перегрузка пародонта зубов. Анализ элементного состава костной ткани в модели воспалительного заболевания пародонта позволил выявить изменения количественных показателей базовых элементов костной ткани. Несбалансированное по пищевой ценности питание, стрессовый фактор, травматизация кости приводит к уменьшению содержания фосфора и селена в костной ткани, что приводит к дисбалансу между процессами резорбции и ремоделирования кости. Полученные результаты исследования могут быть учтены при планировании и проведении полиэтиотропной терапии воспалительно-дистрофических заболеваний пародонта еще на ранних стадиях их развития, когда видимые клинические проявления заболевания в полости рта минимальны.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность директору ФГБУН ИИФ УрО РАН г. Екатеринбург, д.ф.-м.н. Соловьевой О.Э. за предоставление возможности проведения исследований на базе учреждения.

## Список литературы / References

1. Алиева М.С., Расулов И.М., Магомедов М.А., Мейланова Р.Д. Современные аспекты этиологии и патогенеза пародонтита // Известия ДГПУ. Естественные и точные науки, 2013. Т. 22, № 1. С. 25-29. [Alieva M.S., Rasulov I.M., Magomedov M.A., Meylanova R.D. Modern aspects of etiology and pathogenesis of parodontitis. *Izvestia DGPU. Estestvennye i tochnye nauki = DSPU Journal. Natural and Exact Sciences*, 2013, Vol. 22, no. 1, pp. 25-29. (In Russ.)]
2. Бажутова И.В., Исмагуллин Д.Д., Лямин А.В., Трунин Д.А., Жестков А.В., Разумный В.А. Клиническое значение представителей рода Streptococcus при развитии пародонтита // Инфекция и иммунитет, 2022. Т. 12, № 1. С. 51-58. [Bazhutova I.V., Ismatullin D.D., Lyamin A.V., Trunin D.A., Zhestkov A.V., Razumnyj V.A. Clinical significance of Streptococcus members in developing periodontitis. *Infektsia i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 1, pp. 51-58. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-CSO-1698.
3. Борисюк С.В., Нотова С.В., Кван О.В. Влияние различного уровня потребления пищевых волокон в рационе на элементный состав костной ткани беременных самок крыс // Вестник Оренбургского государственного университета, 2016. Т. 193, № 5. С. 41-45. [Borisjuk S.V., Notova S.V., Kvan O.V. The elemental composition of bone pregnant female rats on the background of consumption of dietary fiber in the diet. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of Orenburg State University*, 2016, Vol. 193, no. 5, pp. 41-45. (In Russ.)]
4. Брусенцова А.Е., Ляшев Ю.Д., Цыган Н.В., Затолокина М.А., Антопольская Е.В., Солин А.В. Морфологические изменения в пародонте крыс с экспериментальным пародонтитом и хроническим болевым синдромом // Вестник НовГУ. Сер.: Медицинские науки, 2022. Т. 127, № 2. С. 21-25. [Brusentsova A.E., Lyashev Yu.D., Tsygan N.V., Zatulokina M.A., Antopolskaya E.V., Solin A.V. Morphological changes in the periodontium of rats with experimental periodontitis and chronic pain syndrome. *Vestnik NovGU. Ser.: Meditsinskie nauki = Bulletin of NovSU. Issue: Medical Sciences*, 2022, Vol. 127, no. 2, pp. 21-25. (In Russ.)]
5. Герк С.А., Голованова О.А. Элементный состав костной ткани человека в норме и при патологии // Вестник ОмГУ, 2015. Т. 78, № 4. С. 39-44. [Gerk S.A., Golovanova O.A. Trace element composition of human bone tissue in normal and pathological condition. *Vestnik OmGU = Bulletin of Omsk University*, 2015, Vol. 78, no. 4, pp. 39-44. (In Russ.)]

6. Катаева Н.Н., Саркисян Н.Г., Чумаков Н.С., Хлыстова К.А., Медведева О.М., Шмыгалев А.С. Микроскопический и элементный анализ костной ткани челюсти при травме // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 3. С. 649-654. [Kataeva N.N., Sarkisyan N.G., Chumakov N.S., Khlystova K.A., Medvedeva O.M., Shmygalev A.S. Microscopic and elemental analysis of jaw bone tissue in injury. *Medicinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 3, pp. 649-654. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-MAE-2738.

7. Сабирова А.И., Акрамов И.А., Рамазанова З.Д., Сергеева В.В., Ибишева Л.К. Современные аспекты эпидемиологических вопросов заболеваний тканей пародонта // The Scientific Heritage, 2021. Т. 73, № 73-2. С. 31-38. [Sabirowa A.I., Akramov I.A., Ramazanova Z.D., Sergeeva V.V., Ibisheva L.K. Modern aspects of epidemiological issues of periodontal tissue diseases. *The Scientific Heritage = The Scientific Heritage*, 2021, Vol. 73, no. 73-2, pp. 31-38. (In Russ.)]

8. Саркисян Н.Г., Тимченко А.С., Ларионов Л.П., Тузанкина И.А. Способ получения модели хронического пародонтита у крыс // Уральский медицинский журнал, 2014. Т. 117, № 3. С. 54-56. [Sarkisian N.G., Timchenko A.S., Larionov L.P., Tuzankina I.A. A method for producing a model of chronic periodontitis in rats. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2014, Vol. 117, no. 3, pp. 54-56. (In Russ.)]

9. Саркисян Н.Г., Ронь Г.И., Тузанкина И.А., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Долгих М.А. Генетические критерии диагностики пародонтита // Уральский медицинский журнал, 2015. Т. 131, № 8. С. 77-81. [Sargsyan N.G., Ron G.I., Tuzankina I.A., Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Long M.A. Genetic diagnosis criteria for periodontitis. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2015, Vol. 131, no. 8, pp. 77-81. (In Russ.)]

10. Сирак С.В., Щетинин Е.В., Петросян Г.Г., Андреев А.А., Вафиади Г.Д., Терещенко О.А. Показатели микротвердости челюстных костей при стресс-индуцированном экспериментальном пародонтите // Медицинский вестник Северного Кавказа, 2018. Т. 13, № 4. С. 659-663. [Sirak S.V., Shchetinin E.V., Petrosyan G.G., Andreev A.A., Vafiadi G.D., Tereshchenko O.A. Indicators of jawbone microhardness in stress-induced experimental periodontitis. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus*, 2018, Vol. 13, no. 4, pp. 659-663. (In Russ.)]

11. Усманова И.Н., Хуснарязанова Р.Ф., Зигитбаев Р.Н., Абдрахманова Е.Р., Гильманова Р.Р., Киньягулова С.Р. Современные подходы к диагностике рисков развития кариеса и воспалительных заболеваний пародонта у лиц молодого возраста // Уральский медицинский журнал, 2018. Т. 162, № 7. С. 43-47. [Usmanova I.N., Khusnarizanova R.F., Zigitbayev R.N., Abdrakhmanova E.R., Gilmanova R.R., Kinyagulova S.R. Modern approaches to the diagnosis of risk of development of caries and inflammatory periodontal diseases at young age. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal = Ural Medical Journal*, 2018, Vol. 162, no. 7, pp. 43-47. (In Russ.)]

---

**Авторы:**

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

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

**Хохрякова Д.А.** — студентка 5-го курса стоматологического факультета ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

**Меликян А.Г.** — студент 5-го курса стоматологического факультета ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

**Осипова И.М.** — студентка 5-го курса стоматологического факультета ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

**Authors:**

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

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

**Khokhryakova D.A.**, 5<sup>th</sup> year Student of the Dental Faculty, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

**Melikyan A.H.**, 5<sup>th</sup> year Student of the Dental Faculty, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

**Osipova I.M.**, 5<sup>th</sup> year Student of the Dental Faculty, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

---

Поступила 27.03.2024  
Отправлена на доработку 29.03.2024  
Принята к печати 30.03.2024

---

Received 27.03.2024  
Revision received 29.03.2024  
Accepted 30.03.2024

# ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ГОЛОТУРИЙ С ПОВЕРХНОСТНОЙ РАНОЙ НА АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ

Долматова Л.С.<sup>1</sup>, Караулова Е.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Тихоокеанский океанологический институт имени В.И. Ильичева» Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, Россия

<sup>2</sup> Тихоокеанский филиал ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии», г. Владивосток, Россия

**Резюме.** Голотурии являются одними из наиболее способных к регенерации животных. Их фагоциты являются аналогами макрофагов, которые играют ключевую роль в регуляции заживления ран, но механизмы участия фагоцитов в ранозаживлении не изучены. Целью работы явилось выяснение влияния отдельных белковых компонентов, выделенных из целомической жидкости голотурии *Eupentacta fraudatrix* с поверхностными повреждениями стенки тела, на уровень функциональной активности двух типов фагоцитов (Ф1 и Ф2).

Белковые компоненты целомической жидкости голотурий с поверхностным ранением стенки тела анализировали и собирали методом гель-проникающей хроматографии. Использовали белки, содержание которых значительно менялось в период заживления в предварительных опытах. Два белка и пептид добавляли к выделенным методом градиентного центрифугирования фагоцитам одновременно с термостабильным токсином *Yersinia pseudotuberculosis* и инкубировали 24 ч. Продукцию супероксиданион-радикала определяли по восстановлению нитросинего тетразолия (НСТ) колориметрическим методом. Для оценки специфичности действия белков в качестве внутреннего контроля использовали бычий сывороточный альбумин (БСА). В 24 ч опытах *in vivo* белки вводили раненым животным.

Два белка, при сравнении с действием БСА, не проявили специфичного влияния на продукцию активных форм кислорода в фагоцитах *in vitro*. Однако сравнение действия пептида на оксидантную активность и жизнеспособность фагоцитов с таковыми БСА выявило специфичность его действия. При этом пептид снижал оксидантную активность Ф1-фагоцитов и повышал ее в Ф2-фагоцитах в прямой концентрационной зависимости. Введение одного из двух белков раненым голотуриям вызывало разнонаправленное концентрационно-зависимое действие на оксидантную активность фагоцитов двух типов, с преимущественным подавлением активности Ф1-фенотипа. Исследованные белки разнонаправленно влияли на концентрацию целомоцитов у раненых голотурий, что указывает на их способность влиять на рекрутирование фагоцитов. Способность белковых компонентов вызывать сдвиг в соотношении оксидантной активности двух типов фагоцитов в сторону преимущественной

## Адрес для переписки:

Долматова Людмила Степановна  
ФГБУН «Тихоокеанский океанологический институт  
имени В.И. Ильичева» Дальневосточного отделения  
Российской академии наук  
690041, Россия, г. Владивосток, ул. Балтийская, 43.  
Тел.: 8 (423) 31-25-80.  
E-mail: dolmatova@poi.dvo.ru

## Address for correspondence:

Lyudmila S. Dolmatova  
V. Ilyichev Pacific Oceanological Institute  
43 Baltiyskaya St  
Vladivostok  
690041 Russian Federation  
Phone: +7 (423) 31-25-80.  
E-mail: dolmatova@poi.dvo.ru

## Образец цитирования:

Л.С. Долматова, Е.П. Караулова «Влияние белков целомической жидкости голотурий с поверхностной раной на активность фагоцитов» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 167-174. doi: 10.46235/1028-7221-16917-EOP

© Долматова Л.С., Караулова Е.П., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

L.S. Dolmatova, E.P. Karaulova "Effect of proteins from the coelomic fluid of superficially wounded holothurians on the activity of phagocytes", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 167-174.  
doi: 10.46235/1028-7221-16917-EOP

© Dolmatova L.S., Karaulova E.P., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16917-EOP

активизации Ф2-фагоцитов, являющихся функциональными аналогами М2-макрофагов, позволяет предположить, что их действие носит противовоспалительный характер.

*Ключевые слова:* голотурии, целомическая жидкость, белки, заживление ран, фагоциты, активные формы кислорода

## EFFECT OF PROTEINS FROM THE COELOMIC FLUID OF SUPERFICIALLY WOUNDED HOLOTHURIANS ON THE ACTIVITY OF PHAGOCYTES

Dolmatova L.S.<sup>a</sup>, Karaulova E.P.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> V. Ilyichev Pacific Oceanological Institute, Vladivostok, Russian Federation

<sup>b</sup> Pacific Branch of Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Vladivostok, Russian Federation

**Abstract.** Holothurians are among the most capable of regenerating animals. Their phagocytes are analogues of macrophages, but the mechanisms of their participation in wound healing have not been studied. The aim of the work is to determine the effect of individual protein components isolated from the coelomic fluid of holothurians with superficial damage to the body wall on the functional activity of the two types of phagocytes (P1 and P2) in holothurian *Eupentacta fraudatrix*.

Protein components of the coelomic fluid of holothurians with superficial wounds of the body wall were analyzed and collected by gel permeation chromatography. We used proteins whose content changed significantly during the wound healing period in preliminary experiments. Two proteins and a peptide were added to phagocytes, isolated by gradient centrifugation, simultaneously with the thermostable toxin of *Yersinia pseudotuberculosis* and incubated for 24 h. The production of superoxide anion radical was determined by the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) using a colorimetric method. To assess the specificity of the proteins, bovine serum albumin (BSA) was used as an internal control. In one-day *in vivo* experiments, proteins were administered to wounded animals.

Two proteins, when compared with the effect of BSA, did not show a specific effect on the production of reactive oxygen species in phagocytes *in vitro*. However, a comparison of the effect of the peptide on the oxidative activity and viability of phagocytes with those of BSA revealed the specificity of its action. The peptide reduced the oxidative activity of P1 phagocytes and increased it in P2 phagocytes in a direct concentration-dependent manner. One of the two proteins being administered to wounded holothurians caused a multidirectional concentration-dependent effect on the oxidative activity of the two types of phagocytes, with a predominant suppression of the P1 phenotype activity. The ability of protein components to cause a shift in the ratio of oxidative activity of the two types of phagocytes towards the preferential activation of P2 phagocytes, which are considered as functional analogues of M2 macrophages, suggests that they act as anti-inflammatory agents.

*Keywords:* Holothurians, coelomic fluid, proteins, wound healing, phagocytes, reactive oxygen species

Для Л.С. Долматовой работа выполнена в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ (№. 124022100077-0), для Е.П. Карауловой – в рамках выполнения Государственной работы «Проведение прикладных исследований» (раздел 3 государственного задания ФГБНУ «ВНИРО» № 076-00005-19-00).

### Введение

Восстановление тканей и регенерация органов являются одной из важнейших проблем медицины. Важное место в механизмах регенерации тканей имеют клетки иммунной системы. Ключевую роль играют макрофаги, основными типами ко-

торых являются М1-макрофаги, играющие роль на стадии воспаления, и М2-макрофаги, участвующие в восстановлении тканей [9]. Известно, что при воспалительных состояниях и ранениях состав белковых фракций крови существенно меняется [2], что связано с появлением в крови белков из поврежденных клеток и цитокинов, в частности таких, как S100 белки, белки теплового шока, интерлейкины (ИЛ) ИЛ-1 и ИЛ-33, которые, по-видимому, могут влиять на рекрутирование и активацию неповрежденных иммунных клеток. Кроме того, активные формы кислорода (АФК) способны стимулировать воспаление [9]. Вместе с тем известно, что способность к регенерации у

беспозвоночных, у которых адаптивный иммунитет практически отсутствует [3], значительно более выражена, чем у позвоночных. При этом голотурии являются одними из наиболее способных к регенерации животных [4].

Иммунные клетки голотурий, амебоциты, или фагоциты, являются аналогами макрофагов [3]. У голотурии *Eupentacta fraudatrix* Djakonov et Baranova, 1958 выявлено два типа фагоцитов, получивших название Ф1 и Ф2, с различными морфофункциональными характеристиками [5]. В частности, высокий уровень оксида азота (NO) является маркером Ф1, а высокая активность аргиназы – маркер Ф2-фагоцитов, подобно М1- и М2-макрофагам соответственно [6].

Ранее нами из целомической жидкости *E. fraudatrix*, которым был произведен поверхностный надрез тела, были выделены несколько фракций белков, концентрация которых изменялась в наибольшей степени на различных этапах заживления раны. Целью настоящей работы явилось выяснение влияния отдельных белковых компонентов на уровень функциональной активности двух типов фагоцитов голотурии *E. fraudatrix*.

## Материалы и методы

Голотурии с длиной тела 4,5–5,5 см собирали в б. Восток (зал. Петра Великого Японского моря) с использованием легководолазного снаряжения. До начала экспериментов животные находились в аэрируемом аквариуме с сезонной температурой воды не менее двух недель.

На 1-м этапе эксперимента животным ( $n = 14$ ) наносили поверхностную рану (надрез стерильным скальпелем) и через сутки получали целомическую жидкость, добавляя ее к антикоагулирующему раствору [6]. Анализировали молекулярное распределение белков, отбирали белковые компоненты, содержание которых изменялось на отдельных этапах ранозаживления, как было установлено в предварительных экспериментах. Эти белковые компоненты замораживали и хранили при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до использования в дальнейших экспериментах.

На следующем этапе для экспериментов *in vitro* отбирали и объединяли целомическую жидкость 14 голотурий ( $n = 3$ ). Выделяли фракции фагоцитов Ф1 и Ф2 в градиенте плотности фиколл-верографина, как описано ранее [6].

Для стимуляции продукции АФК использовали термостабильный токсин *Yersinia pseudotuberculosis* (TsTYp), предоставленный д.м.н., профессором Н.Ф. Тимченко. Клетки (1 млн/мл) инкубировали в круглодонных планшетах 24 ч при температуре  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  с TsTYp (0,15 мкг/мл) и одним из выделенных белков

или БСА (Serva, Германия), который использовали как контроль на неспецифическое действие белка. В контрольные лунки добавляли фосфатно-солевой буфер с добавлением 36 г/л NaCl (ФСБН, pH 7,6).

Для экспериментов *in vivo* отобранные белковые фракции с молекулярной массой 39,1 (белок 39) и 10 кДа (белок 10), а также пептид с молекулярной массой 2,99 (пептид) инъецировали в целомическую полость через стенку тела, на другом конце тела голотурии делали поверхностный надрез. Контрольным животным инъецировали ФСБН. Еще одной группе раненых животных вводили БСА. В каждой группе использовали 4 животных в трех независимых экспериментах. Через 24 ч получали целомическую жидкость и выделяли фагоциты Ф1 и Ф2, ресуспендировали их в ФСБН. Молекулярную массу белков определяли методом гель-проникающей хроматографии на хроматографе Agilent Technologies 1260 Infinity (США). Использовали колонку TSK gel G 3000PWXL (7,8 мм × 30 см) (TOSOH Corporation, Токио, Япония). Детектирование проводили при 280 нм. Для определения молекулярной массы использовали калибровочный график, построенный с использованием стандартных образцов белков (Sigma-Aldrich Co., США). Объем пробы, вносимой для разделения, составлял 30–50 мкл. Сбор фракций осуществляли в непрерывном автоматическом режиме, в объеме 100 мкл/фракция. Все измерения проводили трижды. Фракции, содержащие индивидуальные белки, объединяли в соответствии с хроматографическим профилем. Концентрацию белков в отдельных пробах определяли методом Брэдфорда. О функциональной активности фагоцитов судили по уровню продукции супероксиданион-радикала, который определяли по восстановлению нитросинего тетразолия (НСТ) колориметрическим методом [2].

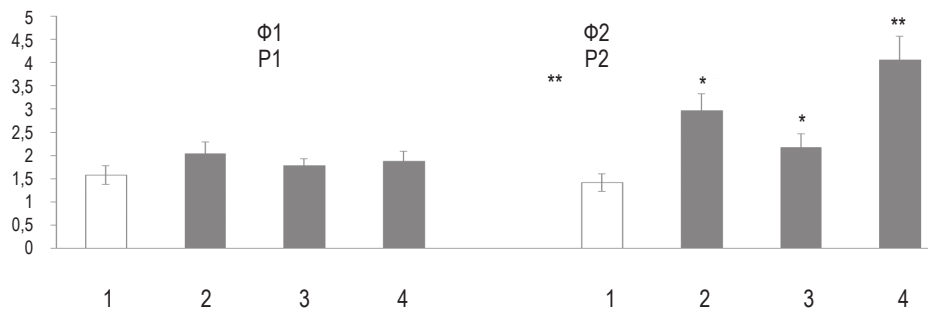
Жизнеспособность клеток определяли по включению трипанового синего. Концентрацию клеток определяли в камере Горяева.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения GraphPad InStat, v. 3.01 (GraphPad Software, Inc., США). Данные представлены как средние значения  $\pm$  средняя ошибка измерений. Достоверность различий определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента. Разницу между экспериментальными значениями считали достоверной при  $p < 0,05$ .

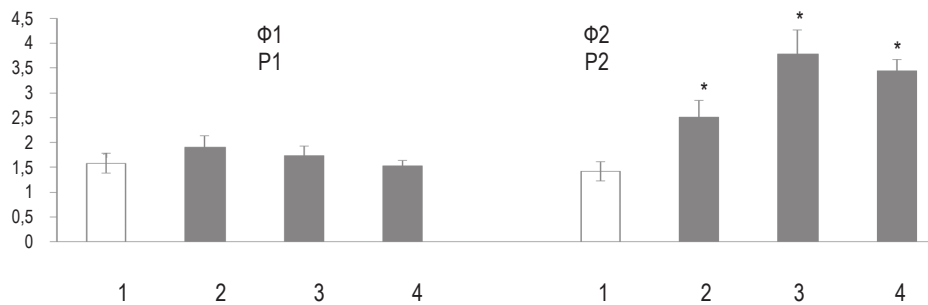
## Результаты и обсуждение

Как показано на рисунке 1, продукция НСТ была одинаковой в двух типах фагоцитов при инкубации клеток только с TsTYp (контроль). Добав-

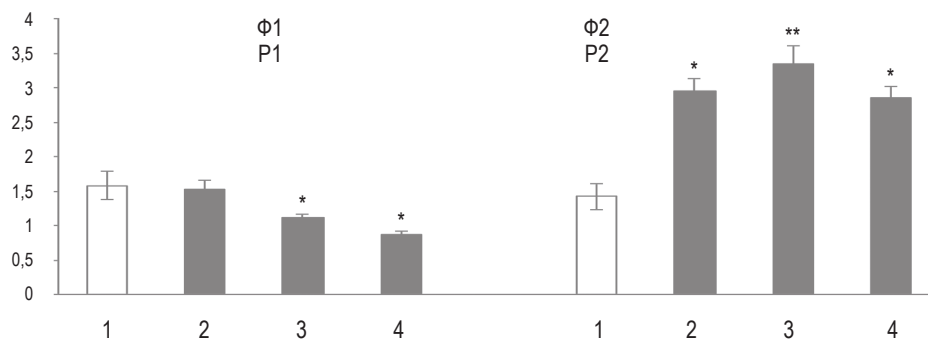
**А (А)**



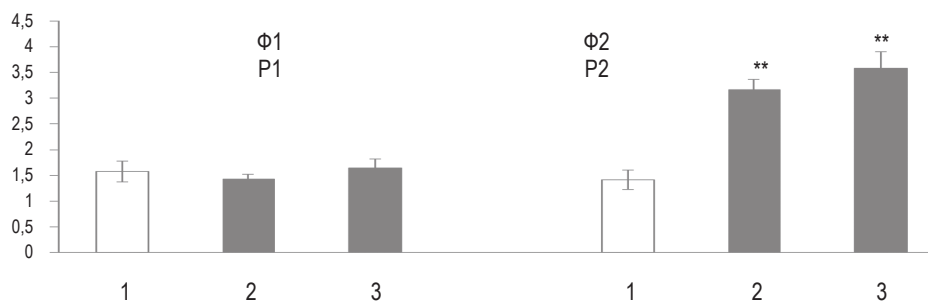
**Б (В)**



**В (С)**



**Г (D)**



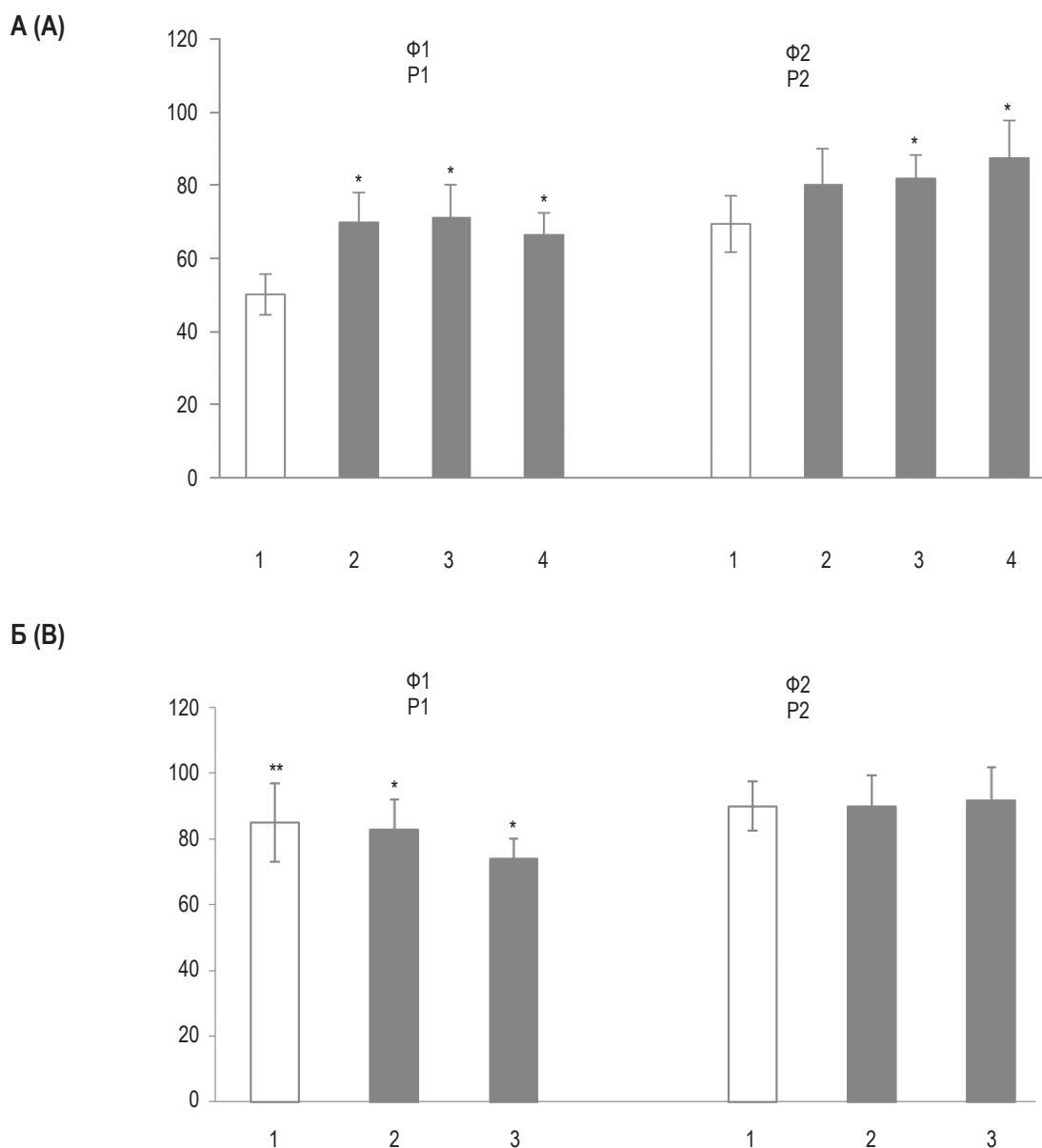
**Рисунок 1. Содержание НСТ в фагоцитах Φ1 и Φ2 при воздействии белков целомической жидкости и БСА в присутствии TsTyр**

Примечание. Время инкубации 24 ч. А – белок 39. Б – белок 10. В – пептид. Г – БСА. Концентрации белков (µг/мл) для А: 1 – 0, 2 – 1,7, 3 – 8,3, 4 – 16,5; для Б: 1 – 0, 2 – 0,1, 3 – 0,2, 4 – 1,7; для В: 1 – 0, 2 – 2,0, 3 – 10,0, 4 – 20; для Г: 1 – 0, 2 – 0,1, 3 – 1,0. По оси ординат – содержание НСТ, мг/мг белка. Здесь и далее достоверность различий между опытом и контролем: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ .

Figure 1. NBT content in P1 and P2 phagocytes exposed to coelomic fluid proteins and BSA in the presence of TsTyр

Note. Incubation time 24 hours. A, protein 39. B, protein 10. C, peptide. D, BSA. Protein concentrations (µg/mL) for A: 1 – 0, 2 – 1.7, 3 – 8.3, 4 – 16.5; for B: 1 – 0, 2 – 0.1, 3 – 0.2, 4 – 1.7; for C: 1 – 0, 2 – 2.0, 3 – 10.0, 4 – 20; for D: 1 – 0, 2 – 0.1, 3 – 1.0. The y-axis is NBT content, mg/mg protein. Hereinafter, the significance of differences between the experiment and the control: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .





**Рисунок 2.** Жизнеспособность фагоцитов Φ1 и Φ2 при воздействии пептида целомической жидкости (А) или БСА (Б) при коинкубации с TsTYp в течение 24 ч

Примечание. Концентрация (мкг/мл) для А: 1 – 0, 2 – 2,0, 3 – 10,0, 4 – 20; для Б: 1 – 0, 2 – 0,1, 3 – 1,0. По оси ординат – жизнеспособность клеток, %.

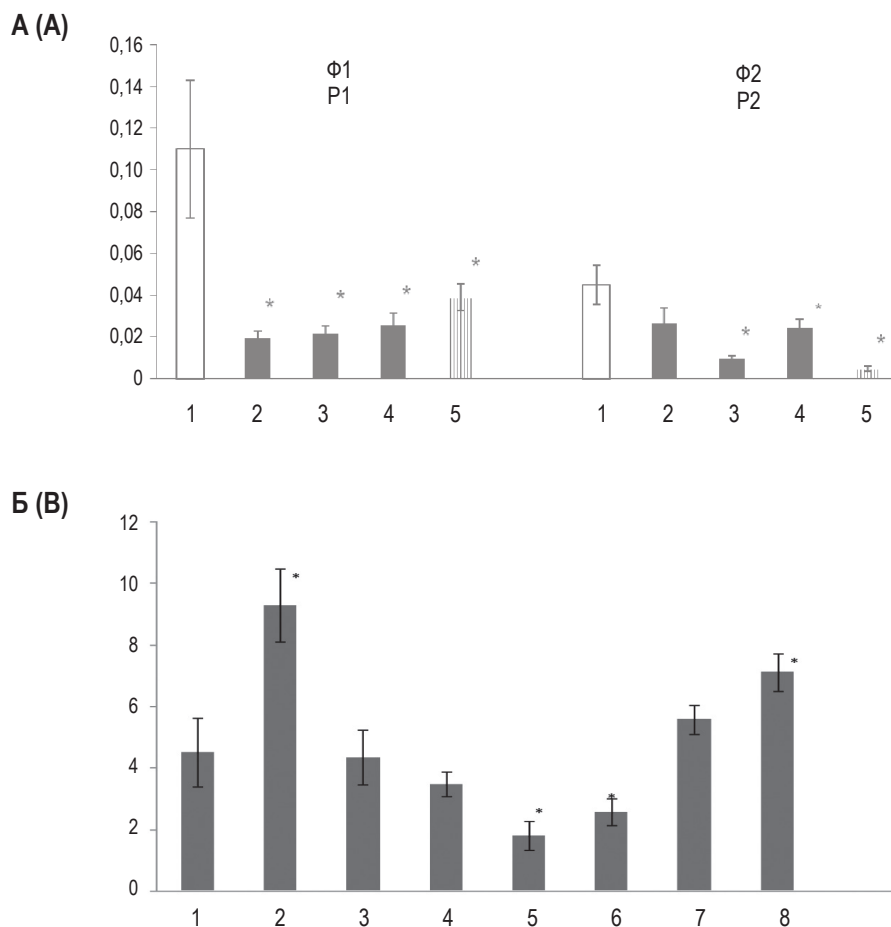
Figure 2. Viability of P1 and P2 phagocytes when exposed to coelomic fluid peptide (A) or BSA (B) when coincubated with TsTYp for 24 hours

Note. Concentration (µg/mL) for A: 1 – 0, 2 – 2.0, 3 – 10.0, 4 – 20; for B: 1 – 0, 2 – 0.1, 3 – 1.0. The y-axis is cell viability, %.

ление в инкубационную среду белка 39 (рис. 1А) не приводило к достоверным изменениям уровня НСТ в Φ1-фагоцитах ни при одной из исследованных концентраций. Но в Φ2-фагоцитах продукция НСТ возрастала по сравнению с контролем в прямой концентрационной зависимости. Белок 10 (рис. 1Б) также не вызывал достоверных изменений в продукции НСТ в Φ1-фагоцитах и

стимулировал ее в Φ2-фагоцитах в прямой концентрационной зависимости.

В отличие от белков, пептид подавлял продукцию НСТ в Φ1, а также повышал ее в Φ2-фагоцитах в прямой концентрационной зависимости (рис. 1В). БСА, как и белки целомической жидкости, не влиял на продукцию НСТ в Φ1-фагоцитах и повышал ее в Φ2-фагоцитах (рис. 1Г), но в исследованном диапазоне кон-



**Рисунок 3. Влияние белков на оксидантную активность фагоцитов Φ1 и Φ2 (А) и концентрацию целомоцитов (Б) голотурий через 24 ч после ранения**

Примечание. Для А – белок 10 в концентрациях (мкг/г): 1 – 0, 2 – 0,1, 3 – 0,6, 4 – 1,1; БСА (мкг/г): 5–1,0. По оси ординат – содержание НСТ, мг/мг белка. Для Б: 1 – инъекция ФСБН, 2 – ранение, 3–5 – ранение + белок 39, 6–8 – ранение + белок 10. Концентрации белка 39 (мкг/г): 3 – 0,02, 4 – 0,11, 5–0,65. Концентрации белка 10 (мкг/г): 6 – 0,1, 7 – 0,6, 8 – 1,1. По оси ординат – концентрация целомоцитов, 10<sup>6</sup> клеток в 1 мл.

**Figure 3. Effect of proteins on the oxidative activity of P1 and P2 phagocytes (A) and the concentration of coelomocytes (B) of sea cucumbers 24 h after wounding**

Note. For A: protein 10 in concentrations (µg/g): 1 – 0, 2 – 0.1, 3 – 0.6, 4 – 1.1; BSA (µg/g): 5 – 1.0. The ordinate is the NBT content, mg/mg protein. For B: 1, PSBN injection; 2, wound; 3–5, wound+protein 39; 6–8, wound+protein 10. Protein 39 concentrations (µg/g): 3 – 0.02, 4 – 0.11, 5 – 0.65. Protein 10 concentrations (µg/g): 6 – 0.1, 7 – 0.6, 8 – 1.1. The ordinate is the concentration of coelomocytes, 10<sup>6</sup> cells per 1 mL.

центраций, близком к таковому для белка 10, концентрационная зависимость эффекта не отмечена. Концентрационно-зависимый эффект пептида позволяет предположить, что этот пептид играет роль в регуляции активности фагоцитов. Пептид не только стимулировал активность Φ2-фагоцитов, но и подавлял активность Φ1-фагоцитов, сдвигая соотношение активностей в пользу первых. Такой эффект сходен с наблюдаемым при поляризации макрофагов, со снижением количества клеток с М1-фенотипом и

повышением такового с М2-фенотипом, наблюдаемым при заживлении ран [9].

При этом пептид значительно повышал жизнеспособность Φ1-фагоцитов по сравнению с действием TsTyr (рис. 2А). В Φ2-фагоцитах также возрастала жизнеспособность в прямой концентрационной зависимости.

БСА, в отличие от пептида, не влиял на жизнеспособность фагоцитов (рис. 2Б), что также свидетельствует в пользу специфического действия пептида.

В то же время белки 39 и 10 оказывали сходное действие на оксидантную активность фагоцитов и не проявили значимых отличий от действия БСА. Таким образом, при воздействии *in vitro* они не оказывают специфическое действие. Можно предполагать, что если эти белки и играют роль в регуляции активности фагоцитов, то их действие опосредовано.

В серии экспериментов *in vivo* было исследовано влияние белка 10 на фагоциты раненых животных (рис. 3А). Белок 10 и БСА снижали оксидантную активность Ф1- и Ф2-фагоцитов по сравнению с таковой, наблюдаемой при ранении в отсутствие белков. Однако в близких концентрациях (1,1 и 1 мкг/г соответственно) белок 10 вызывал более выраженное подавление накопления НСТ в Ф1-фагоцитах и менее подавлял его в Ф2-фагоцитах по сравнению с БСА. Так, в Ф2-фагоцитах белок снижал уровень НСТ по сравнению с одним ранением почти на 50%, а БСА – на 90%. БСА способен связывать кислородные радикалы без взаимодействия с поверхностными рецепторами клеток [8] и, по-видимому, действие белка 10 и БСА осуществляется по разным механизмам.

Нами также была изучена возможность влияния белков 39 и 10 на концентрацию целомицитов, до 50% которых составляют фагоциты [7], у раненых животных (рис. 3Б). Оба белка снижали концентрацию целомицитов по сравнению с влиянием самого ранения, что свидетельствует

о том, что они могут влиять на рекрутирование целомицитов/фагоцитов к месту повреждения. Однако концентрационные зависимости белков были разные: белок 39 снижал концентрацию целомицитов в прямой концентрационной зависимости, а белок 10 – в обратной. Это дает основание полагать, что действие белков было специфичным и может быть связано с их разной ролью в процессе заживления раны.

## Заключение

В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что изученные в настоящей работе белковые компоненты, полученные из целомической жидкости голотурий, которым было нанесено поверхностное повреждение тела, могут участвовать в регуляции активности фагоцитов при заживлении раны. Механизмы этого влияния нуждаются в дальнейших исследованиях, необходима и идентификация самих белков. Особого внимания заслуживает пептид с молекулярной массой 2,99, который способен оказывать непосредственное влияние на фагоциты, подавляя оксидантную активность Ф1-фагоцитов и вызывая активацию Ф2-фагоцитов. Последние по своим морфофункциональным свойствам аналогичны М2-макрофагам, играющим основную роль при восстановлении тканей. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем для получения новых ранозаживляющих препаратов из голотурий.

## Список литературы / References

1. Ермолаев В.А., Никулина Е.Н. Динамика белковых фракций крови при заживлении гнойных ран // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии, 2010. Т. 2, № 12. С. 40-43. [Ermolaev V.A., Nikulina E.N. Dynamics of protein fractions of blood during the healing of purulent wounds. *Vestnik Ulyanovskoy gosudarstvennoy selskokhozyaystvennoy akademii = Bulletin of the Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 2010, Vol. 2, no. 12, pp. 40-43. (In Russ.)]
2. Мельников В.П. Тест восстановления нитросинего тетразолия мононуклеарными фагоцитами // Лабораторное дело, 1991. № 8. С. 51-53. [Melnikov V.P. Test for the reduction of nitroblue tetrazolium by mononuclear phagocytes. *Laboratornoe delo = Laboratory Diagnostic*, 1991, no. 8, pp. 51-53. (In Russ.)]
3. Chia Fu-Sh., Xing J. Echinoderm coelomocytes. *Zoological Studies*, 1996, Vol. 35, no. 4, pp. 231-254.
4. Dolmatov I.Y. Variability of regeneration mechanisms in echinoderms. *Rus. J. Mar. Biol.*, 2020, Vol. 46, no. 6, pp. 391-404.
5. Dolmatova L.S., Smolina T.P. Morphofunctional features of two types of phagocytes in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Djakonov et Baranova, 1958). *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 2022, Vol. 58, no. 4, pp. 955-970.
6. Dolmatova L.S., Ulanova O.A., Timchenko N.F. *Yersinia pseudotuberculosis* thermostable toxin dysregulates the functional activity of two types of phagocytes in the holothurian *Eupentacta fraudatrix*. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.*, 2019, Vol. 46, pp. 117-127.
7. Eliseikina M.G., Magarlamov T.Yu. Coelomocyte morphology in the holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae). *Rus. J. Mar. Biol.*, 2002, Vol. 28, no. 3, pp. 197-202.

8. Iglesias J., Abernethy V.E., Wang Z., Lieberthal W., Koh J.S., Levine J.S. Albumin is a major serum survival factor for renal tubular cells and macrophages through scavenging of ROS. *Am. J. Physiol.*, 1999, Vol. 277, pp. F711-F722.

9. Raziyeva K., Kim Y., Zharkinbekov Z., Kassymbek K., Jimi S., Saparov A. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*, 2021, Vol. 11, 700.

---

**Авторы:**

*Долматова Л.С.* — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии ФГБНУ «Тихоокеанский океанологический институт имени В.И. Ильичева» Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, Россия

*Караулова Е.П.* — к.т.н., ведущий научный сотрудник лаборатории безопасности и качества морского растительного сырья Тихоокеанского филиала ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии», г. Владивосток, Россия

**Authors:**

*Dolmatova L.S.*, PhD (Biology), Leading Research Associate, V. Ilyichev Pacific Oceanological Institute, Vladivostok, Russian Federation

*Karaulova E.P.*, PhD (Engineering), Leading Research Associate, Pacific Branch of Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Vladivostok, Russian Federation

---

Поступила 03.04.2024

Отправлена на доработку 05.04.2024

Принята к печати 09.04.2024

Received 03.04.2024

Revision received 05.04.2024

Accepted 09.04.2024

---

## К ВОПРОСУ ОБ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ИНВАЗИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ ПРИ НЕМАТОДОЗАХ

Жданова О.Б.<sup>1,2</sup>, Андреев О.Н.<sup>1</sup>, Мартусевич А.К.<sup>2</sup>, Часовских О.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Вятский государственный агротехнологический университет», г. Киров, Россия

**Резюме.** В настоящее время актуален поиск путей преодоления лекарственной устойчивости к антигельминтикам. Данная проблема решается за счет ограничения длительности применения препаратов с одинаковым механизмом действия и комбинированием антигельминтиков. Представленные в статье исследования показали, что также весьма перспективно применение иммуностимулирующих препаратов.

Для экспериментального моделирования инвазий *Trichinella spiralis*, *Trichinella nativa* использовали 40 белых мышей, 20 белых крыс. Были изучены изменения в лимфоидной ткани, ассоциированной в кишечнике, в селезенке, а также в периферической крови животных и птиц при инокуляции вышеуказанных видов. Далее, на отработанных моделях инвазий *Trichinella spiralis* исследовали влияние препаратов с иммуностимулирующей активностью, для чего использовали 30 белых мышей (массой 20,5±2,5 г) которые были рандомизированы и распределены на группы. Оценка протективных свойств иммуностимулирующих препаратов при трихинеллезе осуществлялась на лабораторных моделях по определению приживаемости при исследованиях после эвтаназии всех мышей и подсчитывания количества личинок трихинелл. Оба эксперимента были проведены в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. После выведения лабораторных животных из эксперимента (в соответствии с принципами вышеуказанной декларации) проводили макро- и микроанатомические исследования и забор гистологического материала (комплектов кишечника и селезенки) для качественной и количественной оценки.

Вышесказанное подтверждается тем, что в паразитологических исследованиях установлена высокая эффективность полиоксидония в отношении приживаемости личинок трихинелл, которая сопровождалась увеличением площади лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником и белой пульпы селезенки, в которой разрастались лимфоидные фолликулы. Таким образом, полиоксидоний

### Адрес для переписки:

Жданова Ольга Борисовна  
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К.И. Скрябина»  
117218, Россия, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28.  
Тел.: 8 (499) 124-56-55, 8 (919) 522-40-93.  
E-mail: Oliabio@yandex.ru

### Address for correspondence:

Olga B. Zhdanova  
K. Scriabin All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants  
28 B. Cheremushkinskaya St  
Moscow  
117218 Russian Federation  
Phone: +7 (499) 124-56-55, +7 (919) 522-40-93.  
E-mail: Oliabio@yandex.ru

### Образец цитирования:

О.Б. Жданова, О.Н. Андреев, А.К. Мартусевич, О.В. Часовских «К вопросу об экспериментальном моделировании инвазий и перспектив применения иммуностимуляторов при нематодозах» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 175-180. doi: 10.46235/1028-7221-16810-OTI

© Жданова О.Б. и соавт., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

O.B. Zhdanova, O.N. Andreyanov, A.K. Martusevich, O.V. Chasovskikh "On the issue of experimental modeling of invasions and prospects for the use of immunostimulants in nematodes", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 175-180. doi: 10.46235/1028-7221-16810-OTI

© Zhdanova O.B. et al., 2024  
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16810-OTI

является эффективным препаратом, который можно использовать при комплексном лечении нематодозов, как иммуностропное средство.

*Ключевые слова:* нематодозы, иммуностропная терапия, устойчивость, азоксимера бромид, лабораторные животные, эксперимент

## ON THE ISSUE OF EXPERIMENTAL MODELING OF INVASIONS AND PROSPECTS FOR THE USE OF IMMUNOSTIMULANTS IN NEMATODES

Zhdanova O.B.<sup>a, b</sup>, Andreyanov O.N.<sup>a</sup>, Martusevich A.K.<sup>b</sup>,  
Chasovskikh O.V.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> K. Scriabin All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Vyatka State Agrotechnological University, Kirov, Russian Federation

**Abstract.** Currently, the search for ways to overcome drug resistance to anthelmintics is relevant. This problem is solved by limiting the duration of use of drugs with the same mechanism of action and combination of anthelmintics. The studies presented in the article have shown that the use of immunotropic drugs is also very promising.

Forty white mice and 20 white rats were used for experimental modeling of *Trichinella spiralis* and *Trichinella nativa* invasions. Changes in lymphoid tissue associated in the intestine, in the spleen, as well as in the peripheral blood of animals and birds during inoculation of the above species were studied. Further, the effect of drugs with immunotropic activity was studied on proven models of *Trichinella spiralis* invasions, for which 30 white mice (20.5±2.5 g) were used, which were randomized and divided into groups. The evaluation of the protective properties of immunotropic drugs in trichinosis was carried out on laboratory models to determine the survival rate in studies after euthanasia of all mice and counting the number of *Trichinella* larvae. Both experiments were conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration. After removing laboratory animals from the experiment (in accordance with the principles of the above declaration), macro- and microanatomic studies and sampling of histological material (sets of intestines and spleens) were carried out for qualitative and quantitative assessment.

The above is confirmed by the fact that parasitological studies have established the high effectiveness of polyoxidonium in relation to the survival of *Trichinella* larvae, which was accompanied by an increase in the area of lymphoid tissue associated with the intestine and the white pulp of the spleen, in which lymphoid follicles grew. Thus, polyoxidonium is an effective drug that can be used in the complex treatment of nematodes as an immunotropic agent.

*Keywords:* nematodes, immunotropic therapy, resistance, azoximer bromide, laboratory animals, experiment

Исследования поддержаны грантом РФФ 24-26-00043 «Изучение иммунного ответа при нематодозах и перспективы применения иммуностимуляторов при дегельминтизации».

### Введение

В настоящее время актуален поиск путей преодоления лекарственной устойчивости к антигельминтикам. Данная проблема решается за счет ограничения длительности применения препаратов с одинаковым механизмом действия и ком-

бинированием антигельминтиков. Представленные в статье исследования показали, что также весьма перспективно применение иммуностропных препаратов. Вышесказанное подтверждается тем, что в паразитологических исследованиях установлена высокая эффективность полиоксидония в отношении приживаемости личинок трихинелл, которая сопровождалась увеличением площади лимфоидной ткани ассоциированной с кишечником и белой пульпы селезенки, в которой разрастались лимфоидные фолликулы.

Таким образом, полиоксидоний является эффективным препаратом, который можно использовать при комплексном лечении нематодозов, как иммуностропное средство.

Широко известно о стремительном распространении резистентности к антибиотикам среди возбудителей инфекционных заболеваний, менее освящается в научной литературе нарастание устойчивости гельминтов (особенно, нематод) к антигельминтикам. Известно, что уже в середине прошлого века антигельминтные препараты начали резко терять свою эффективность при дегельминтизациях. В этой связи в 90-х годах постепенно в США, а потом в ряде стран ЕС свободная продажа антигельминтиков была законодательно запрещена [2, 3, 4, 6]. В настоящее время в РФ против нематод чаще всего используются и представлены в открытом доступе такие препараты как макроциклические лактоны и бензимидазол и его производные (альбен, альбен-нео, мебендазол и др.). Известно, что производные бензимидазола влияют на подвижность, нарушение транспорта веществ внутри клетки и опорную функцию цитоскелета нематод. В результате наступает гибель клетки и тканей гельминта. Однако мутация в гене, кодирующем структуру тубулина, привела к появлению устойчивости к антигельминтикам этой группы [3, 5, 12]. В случае с макроциклическими лактонами (ивермектин, авермектин и др.) мутируют гены, кодирующие  $\alpha$ -субъединицы глутамат-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов, и гены, кодирующие белки коннексины, входящие в состав щелевых контактов, что также приводит к появлению устойчивости. Учитывая вышесказанное, в настоящее время крайне актуален поиск экологически безопасных соединений с сочетанными механизмами противопаразитарного и иммуномодулирующего действия. И таким образом преодоление лекарственной устойчивости микроорганизмов и гельминтов является одной из важных проблем, возникающих на стыке современной паразитологии и иммунологии [2, 3, 13]. Это подразумевает одновременное использование двух и более антигельминтных препаратов с разным механизмом действия и обязательное введение в схему лечения нематодозов иммуностропных препаратов [2, 4, 13, 14].

Нематодозы (сифациоз, трихинеллез, аскаридоз и др.) достаточно часто воспроизводятся при экспериментальном моделировании гельминтозов. Помимо этого некоторые из них, например трихинеллез, являются одним из наиболее опасных гельминтозов человека и животных. В связи с чем некоторые варианты данной инвазии были использованы нами в паразитологических экспериментальных моделях на основе воспроизведе-

ния инвазии у лабораторных животных следующими видами: *Trichinella spiralis*, *Trichinella nativa*. Экспериментальное воспроизведение трихинеллеза при инокуляции *Trichinella spiralis* довольно удобно и распространено в паразитологии как для доклинических исследований, так и среди научных изысканий по изучению иммунного ответа при нематодозах [2, 8, 9, 13]. Эти модели становятся перспективными для современной гельминтологии благодаря возможности точного подсчета личинок, и поэтому изучение действия иммуностропных препаратов паразитологи начинали именно при использовании этого гельминтоза [4, 10, 11, 13, 14]. Тем не менее сведения о применении препаратов с иммуностропной активностью в лечении трихинеллеза фрагментарны, а на практике эта область малоизучена. Например, известно о применении при экспериментальном и спонтанном трихинеллезе рекомбинантного IL-2, нуклеината натрия, продигозана, азоксимера бромид, ряда пробиотиков и др., однако рекомендации в нормативных документах РФ по их использованию отсутствуют.

**Целью данного исследования** стало изучение эффективности применения ряда иммуностропных препаратов на различных лабораторных моделях (животных и птиц) и оценка моделирования экспериментальной инвазии *Trichinella spiralis* и *Trichinella nativa*.

## Материалы и методы

Работа проведена на базе Вятского ГАУ (морфометрические исследования) и центра ВНИИП – филиал ФГБНУ ФНЦ – ВНИИЭВ (экспериментальное моделирование трихинеллезной инвазии). Для экспериментального моделирования инвазий *Trichinella spiralis*, *Trichinella nativa* использовали 40 белых мышей, 20 белых крыс. Были изучены изменения в лимфоидной ткани, ассоциированной в кишечнике, в селезенке, а также в периферической крови животных и птиц при инокуляции вышеуказанных видов. Далее, на отработанных моделях инвазий *Trichinella spiralis* исследовали влияние препаратов с иммуностропной активностью, для чего использовали 30 белых мышей (массой  $20,5 \pm 2,5$  г) которые были рандомизированы и распределены на группы (6). Мышам группы № 1 (положительный контроль) вводили стерильный физиологический раствор 0,2 мл подкожно, двукратно, животным группы № 2 вводили азоксимера бромид (Полиоксидоний) в дозе 0,004 мг/мышь 2-кратно через день, животным третьей группы вводили Ронколейкин в дозе 180 МЕ/мышь в 0,2 мл стерильного 0,9%-ного NaCl, мышам четвертой группы вводили деринат (нуклеинат натрия) двукратно с интервалом 24 ч 0,015 мг на мышь, 5-й группе

вводили 0,015 мг амиксин перорально, 6-я группа служила отрицательным контролем. Мышам вводили через пищеводный зонд инвазионных (обладающих подвижностью) личинок *Trichinella spiralis* в дозе 80 личинок/животное за исключением контрольной группы (№ 6). Оценка протективных свойств иммунотропных препаратов при трихинеллезе осуществлялась на лабораторных моделях по определению приживаемости при исследованиях после эвтаназии всех мышей и подсчитывания количества личинок трихинелл. Оба эксперимента были проведены в соответствии с принципами Хельсинкской декларации [15]. После выведения лабораторных животных из эксперимента (в соответствии с принципами вышеуказанной декларации) проводили макро- и микроанатомические исследования и забор гистологического материала (комплектов кишечника и селезенки) для качественной и количественной оценки [1, 5, 6].

## Результаты и обсуждение

При анализе лабораторных моделей при экспериментальном моделировании инвазий разными видами (*Trichinella spiralis*, *Trichinella nativa*) обнаружены отличия в течении патологического процесса и состояния лимфоидной ткани периферической иммунной системы. Также при инвазии одинаковым количеством возбудителя (общепринятая в гельминтологии доза — 40 личинок на грамм) у белых мышей при инвазии *Trichinella spiralis* клинические признаки отсутствовали, в то время как у мышей, инвазированных *Trichinella nativa*, летальность составила 20%. В то же время при инвазии крыс (2000 личинок на животное) не только отсутствовала летальность, но и обнаружили, что 20% крыс не заразились видом *Trichinella nativa*. Следовательно имеются значительные внутривидовые различия как у различных лабораторных животных (белых мышей, белых крыс), так и собственно, возбудителей [4, 5, 13]. Учитывая вышесказанное, для изучения эффективности иммунотропных препаратов использовали классические модели трихинеллеза белых мышей.

При введении полиоксидония приживаемость трихинелл была наиболее низкой ( $1,8 \pm 0,25$ ), ронколейкина несколько ниже ( $3,5 \pm 1,8$ ), в то время как при использовании нуклеината натрия и тиролонна была близка к положительному контролю ( $7,5 \pm 3,4$  и  $6,5 \pm 5,8$  к  $10,8 \pm 1,6$  соответственно).

В результате проведенных исследований установлено, что лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником, в частности ее сгруппированные образования — лимфоидные бляшки, реагирует на инвазию и введение иммунотропного препарата (у экспериментально заражен-

ных трихинеллезом мышей их площадь 1,1 раза превышала площадь этих образований у мышей контрольной группы, еще большее увеличение лимфоидных бляшек отмечали у инвазированных *Trichinella spiralis* мышей, получавших полиоксидоний в 1,2 раза). Во всех полях зрения при исследовании подслизистой основы кишечника инвазированных животных, получавших полиоксидоний, увеличено количество лимфоцитов, плазмобластов и плазмоцитов, по сравнению с неинвазированными животными, что характерно для антигенной стимуляции и согласуется с данными ряда авторов (Owen R.L., Piazza A.J., Ermak T.H., 1991; Terahara K., Yoshida M., Igarashi O., 2008) и наших предыдущих исследований [6, 7, 9, 10, 11, 12].

Также было изучено влияние иммуностимуляции на морфологию селезенки у всех животных, инвазированных *Trichinella spiralis*, выявлены количественные (в виде соотношения площади красной и белой пульпы) и качественные (клеточный состав) изменения паренхимы. Фолликулы белой пульпы были увеличены в размере у всех инвазированных животных и получавших иммунотропные препараты, часто лимфоидные узелки сливались, образуя тяжи. У здоровых животных площадь красной пульпы превышала площадь остальных структур (составила  $70 \pm 5\%$  от площади органа), в то время как белая пульпа составила  $26,5 \pm 5\%$ , клеточный состав селезенки контрольных мышей имел типичное строение. У мышей с трихинеллезной инвазией площадь белой пульпы достигала 50% и более, так же как и на фоне введения препаратов. Однако имеются качественные отличия в состоянии паренхимы органа. При исследовании клеточного состава селезенки у инвазированных животных, не получавших иммуностимуляторы, в некоторых полях зрения наблюдали пустоты. Известно, что многие хронические инфекционные и инвазионные заболевания (в том числе трихинеллез), сопровождающиеся гиперфункцией селезенки, приводят к спленомегалии. При трихинеллезе основная провоцирующая причина (антигенное воздействие личинок) приводит к весьма длительному и интенсивному процессу избыточной активации лимфоцитов, при котором наступает гиперспленизм, характеризующийся уменьшением количества клеток в поле зрения, появлением пустот (особенно, при инвазии *Trichinella nativa*). Причиной возникновения гиперспленизма является длительное состояние гиперактивности органа, возникающее при постоянной стимуляции антигенами трихинелл, в результате общее состояние животного ухудшается из-за разрушения селезенкой форменных элементов крови (лейкоци-



тов, тромбоцитов и эритроцитов), и снижения их уровня в плазме [9, 10, 12, 13].

## Выводы

Учитывая, что лекарственная устойчивость гельминтов является наследственной преадаптацией, постепенно растет количество паразитических организмов, устойчивых к антигельминтикам, этому способствует применение субтерапевтических доз препаратов, особенно без их смены. В настоящее время эта проблема решается главным образом за счет ограничения длительности применения препаратов с одинаковым механизмом действия и комбинированием антигельминтиков, с дозой не ниже тера-

певтической. Проведенные исследования также показали, что, кроме применения комбинированных антигельминтиков, весьма перспективно применение иммуотропных препаратов. Вышесказанное подтверждается тем, что в паразитологических исследованиях установлена высокая эффективность полиоксидония в отношении приживаемости личинок трихинелл, которая сопровождалась увеличением площади лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником, и белой пульпы селезенки, в которой разрастались лимфоидные фолликулы. Таким образом, полиоксидоний является эффективным препаратом, который можно использовать при комплексном лечении нематодозов, как иммуотропное средство [10, 11, 12, 14].

## Список литературы / References

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с. [Avtandilov G.G. Medical morphometry: a guide]. Moscow: Meditsina, 1990. 384 p.
2. Жданова О.Б., Руднева О.В., Написанова Л.А., Мутошвили Л.Р., Часовских О.В., Клюкина Е.С. Морфологические изменения в лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником у крыс при нематодозах // Морфология, 2020. Т. 157, № 2-3. С. 75-76. [Zhdanova O.B., Rudneva O.V., Napisanova L.A., Mutoshvili L.R., Chasovskikh O.V., Klyukina E.S. Morphological changes in lymphoid tissue associated with the intestine in rats with nematodes. *Morfologiya = Morphology*, 2020, Vol. 157, pp. 75-76. (In Russ.)]
3. Калинникова Т.Б., Гайнутдинов М.Х., Шагидуллин Р.Р. Устойчивость к антигельминтным препаратам: проблема и пути ее решения // Ветеринарный врач, 2018. № 5. С. 36-41. [Kalinnikova T.B., Gainutdinov M.H., Shagidullin R.R. Resistance to anthelmintic drugs: a problem and ways to solve it. *Veterinarnyy vrach = Veterinarian*, 2018, no. 5, pp. 36-41. (In Russ.)]
4. Мартусевич А.К., Жданова О.Б. Информативность исследования свободного кристаллообразования при зоонозах на модели лабораторных животных // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион, 2006. № 1 (22). С. 30-39. [Martusevich A.K., Zhdanova O.B. Informativeness of the study of free crystal formation in zoonoses on the model of laboratory animals. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region = News of Higher Educational Institutions. The Volga Region*, 2006, no. 1, pp. 30-39. (In Russ.)]
5. Руднева О.В., Жданова О.Б., Клюкина Е.С., Написанова Л.А., Мутошвили Л.Р. Влияние комплексного иммуопрепарата на лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистой оболочкой кишечника // Морфология, 2019. Т. 155. № 2. С. 243-244. [Rudneva O.V., Zhdanova O.B., Klyukina E.S., Pisanova L.A., Mutoshvili L.R. The effect of a complex immunopreparation on lymphoid tissue associated with the intestinal mucosa. *Morfologiya = Morphology*, 2019, no. 2, pp. 243-244. (In Russ.)]
6. Сапин М.Р., Никитюк Д.Б. Иммунная система, стресс и иммунодефицит. М.: Джангар, 2000. 184 с. [Sapin M.R., Nikityuk D.B. Immune system, stress and immunodeficiency]. Moscow: Dzhangar, 2000. 184 p.
7. Сапроновков П.М. Иммунология желудочно-кишечного тракта. Л., 1987. 159 с. [Sapronenkov P.M. Immunology of the gastrointestinal tract]. Leningrad, 1987. 159 p.
8. Успенский А.В., Жданова О.Б., Андреянов О.Н., Написанова Л.А., Малышева Н.С. Трихинеллоскопия туш домашних и диких животных // Российский паразитологический журнал, 2021. Т. 15, № 3. С. 71-75. [Uspensky A.V., Zhdanova O.B., Andreyanov O.N., Pisanova L.A., Malysheva N.S. Trichinelloscopy of carcasses of domestic and wild animals. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Parasitological Journal*, 2021, no. 3, pp. 71-75. (In Russ.)]
9. Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *Clin. Immunol.*, 1987, Vol. 7, pp. 265-276.
10. Owen R.L., Piazza A.J., Ermak T.H. Ultrastructural and cytoarchitectural features of lymphoreticular organs in the colon and rectum of adult BALB/c mice. *Am. J. Anat.*, 1991, Vol. 190, pp. 10-18.
11. Tahoun A., Mahajan S., Paxton E., Malterer G., Donaldson D.S., Wang D., Tan A, Gillespie T.L., O'Shea M., Roe A.J., Shaw D.J., Gally D.L., Lengeling A., Mabbott N.A., Haas J., Mahajan A. Salmonella transforms follicle-associated epithelial cells into M cells to promote intestinal invasion. *Cell Host Microbe*, 2012, Vol. 12, no. 5, pp. 645-656.
12. Terahara K., Yoshida M., Igarashi O., Nochi T., Pontes G.S., Hase K., Ohno H., Kurokawa S., Mejima M., Takayama N., Yuki Y., Lowe A.W., Kiyono H. Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 12, pp. 7840-7846.

13. Rudneva O.V., Napisanova L.A., Zhdanova O.B., Berezhko V.K. Evaluation of the protective activity of different immunostimulatory drugs at the experimental trichinosis on white mice. *Int. J. High Dilution Res.*, 2018, Vol. 17, no. 2, pp. 17-18.

14. Zhdanova O.B., Rudneva O.V., Akulinina Yu.K., Napisanova L.A. Evaluation of the effectiveness of different immunostimulatory medicine at the experimental trichinosis and leishmaniosis on white mice. *Int. J. High Dilution Res.*, 2019, Vol. 18, no. 2, p. 12.

15. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. General Assembly of the World Medical Association-2014 Summer, Vol. 81, no. 3, pp. 14-18.

---

**Авторы:**

**Жданова О.Б.** — д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории паразитарных зоонозов ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К.И. Скрабина», Москва; профессор кафедры физиологии ФГБОУ ВО «Вятский государственный агротехнологический университет», г. Киров, Россия

**Андреянов О.Н.** — д.в.н., ведущий научный сотрудник лаборатории паразитарных зоонозов ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К.И. Скрабина», Москва, Россия

**Мартусевич А.К.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории инновационных технологий пищевых производств ФГБОУ ВО «Вятский государственный агротехнологический университет», г. Киров, Россия

**Часовских О.В.** — к.в.н., заведующая кафедрой физиологии ФГБОУ ВО «Вятский государственный агротехнологический университет», г. Киров, Россия

---

**Authors:**

**Zhdanova O.B.**, PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Parasitic Zoonoses, K. Scriabin All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants, Moscow; Professor, Department of Physiology, Vyatka State Agrotechnological University, Kirov, Russian Federation

**Andreyanov O.N.**, PhD, MD (Veterinary Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Parasitic Zoonoses, K. Scriabin All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants, Moscow, Russian Federation

**Martusevich A.K.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Innovative Technologies of Food Production, Vyatka State Agrotechnological University, Kirov, Russian Federation

**Chasovskikh O.V.**, PhD (Veterinary Medicine), Head, Department of Physiology, Vyatka State Agrotechnological University, Kirov, Russian Federation

---

Поступила 31.03.2024  
Отправлена на доработку 01.04.2024  
Принята к печати 10.04.2024

---

Received 31.03.2024  
Revision received 01.04.2024  
Accepted 10.04.2024

## ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СУПЕРНАТАНТОВ *BIFIDOBACTERIUM* *BIFIDUM* И КЛЕТОК КУРИНОГО ЭМБРИОНА НА МОДЕЛИ ОПИСТОРХОЗНОЙ ИНВАЗИИ

Костоломова Е.Г., Лозовая П.Б., Полянских Е.Д., Тимохина Т.Х.,  
Паромова Я.И.

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

**Резюме.** Морфологические изменения печени, как основного органа, в котором локализуется *Opisthorchis felineus*, по данным литературы характеризуются значительными структурными изменениями. Так же недавние исследования показывают, что инфекция *O. felineus* модифицирует иммунную реактивность за счет увеличения синтеза супрессоров иммунного ответа IL10 и TGF- $\beta$  и снижения уровня провоспалительных маркеров IL-4, IL-5. Эксперимент проведен на 15 сирийских золотых хомячках (*Mesocricetus auratus*) в возрасте от 4 до 6 недель. Животные были разделены на 3 равные группы. Длительность наблюдения составила 24 дня. Живые метацеркарии *Opisthorchis felineus* были выделены из зараженной рыбы семейства карповых. Заражение проводилось путем их перорального введения (доза заражения – 50 метацеркариев). Животным в экспериментальных группах при заражении метацеркариями внутрибрюшинно параллельно вводили 1 мл исследуемых супернатантов. Гистологический материал обработан стандартными методами. Гистологические препараты исследованы методами светооптической микроскопии с иммерсией, видеомикроскопии с морфометрией. В результате исследования установлено, что в острую фазу описторхоза преобладает общая инфильтрация области порталного тракта. Клеточный состав инфильтратов характеризовался наличием лимфоцитов, макрофагов, фибробластов, эпителиоидных клеток и клеток инородных тел. Описанные изменения клеток связаны с локальным снижением доступа кислорода к гепатоцитам периферической зоны дольки из-за их сдавления фиброзной тканью. В печени экспериментальных групп отмечались лишь тканеспецифические изменения, а поражения гепатоцитов были наименее выраженные в группе с введением супернатанта *B. bifidum*. Цитокиновый профиль в контрольной группе соответствовал Th1-варианту. В экспериментальной группе 1 при применении супернатанта *B. bifidum* в сравнении с контролем в 4 раза уменьшалась способность лимфоцитов продуцировать основной провоспалитель-

### Адрес для переписки:

Костоломова Елена Геннадьевна  
ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения РФ  
625023, Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, 54.  
Тел.: 8 (345) 220-00-61, 8 (904) 493-06-74.  
E-mail: lenakost@mail.ru

### Address for correspondence:

Elena G. Kostolomova  
Tyumen State Medical University  
54 Odesskaya St  
Tyumen  
625023 Russian Federation  
Phone: +7 (345) 220-00-61, +7 (904) 493-06-74.  
E-mail: lenakost@mail.ru

### Образец цитирования:

Е.Г. Костоломова, П.Б. Лозовая, Е.Д. Полянских,  
Т.Х. Тимохина, Я.И. Паромова «Изучение  
противовоспалительной активности супернатантов  
*Bifidobacterium bifidum* и клеток куриного эмбриона  
на модели описторхозной инвазии» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 181-186.  
doi: 10.46235/1028-7221-16675-STA

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

### For citation:

E.G. Kostolomova, P.B. Lozovaya, E.D. Polyanskikh,  
T.Kh. Timokhina, Ya.I. Paromova "Studying the anti-  
inflammatory activity of *Bifidobacterium bifidum* supernatants  
and chicken embryo cells on a model of opisthorchic invasion",  
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 181-186.  
doi: 10.46235/1028-7221-16675-STA

© Kostolomova E.G. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16675-STA

ный цитокин – TNF $\alpha$ , также супрессирующий эффект наблюдался в отношении IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IFN $\gamma$ . Вместе с тем наблюдалось угнетение продукции основного противовоспалительного цитокина IL-10, при этом в сравнении с контролем увеличивается уровень IL-4, IL-5. При применении супернатанта клеток куриного эмбриона, мы наблюдали схожие результаты с 1-й группой: супрессирующий эффект в отношении провоспалительных и активацию продукции противовоспалительных цитокинов. Уровень IL-17 снижался в обеих экспериментальных группах. Активация продукции противовоспалительных цитокинов в обеих экспериментальных группах модулирует иммунный ответ в сторону Th2, что способствует блокированию воспалительных эффектов.

*Ключевые слова: Bifidobacterium bifidum, клетки куриного эмбриона, Opisthorchis felineus, печень, цитокины*

## STUDYING THE ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM SUPERNATANTS AND CHICKEN EMBRYO CELLS ON A MODEL OF OPISTHOCHIC INVASION

Kostolomova E.G., Lozovaya P.B., Polyanskikh E.D., Timokhina T.Kh., Paromova Ya.I.

*Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation*

**Abstract.** Morphological changes in the liver during infection with *Opisthorchis felineus* are characterized by significant structural changes. It has been proven that *O. felineus* modifies immune reactivity by increasing the synthesis of IL-10 and TGF- $\beta$  and decreasing the levels of IL-4 and IL-5. The experiment was carried out on 15 *Mesocricetus auratus* aged from 4 to 6 weeks. The animals were divided into 3 equal groups. The duration of observation was 24 days. Live metacercariae of *O. felineus* were isolated from infected cyprinid fish. Infection was carried out by oral administration of 50 metacercariae. Animals in the experimental groups were injected intraperitoneally with 1 ml of the test supernatants. Histological preparations were examined by video microscopy with morphometry. It has been established that in the acute phase of opisthorchiasis, general infiltration of the portal tract area predominates. The cellular composition of infiltrates is characterized by the presence of lymphocytes, macrophages, fibroblasts, epithelioid cells and foreign body cells. The described cell changes are associated with a local decrease in oxygen access to hepatocytes in the peripheral zone of the lobule due to their compression by fibrous tissue. In the liver of the experimental groups, only tissue-specific changes were noted, and the damage to hepatocytes was the least pronounced in the group with the introduction of *B. bifidum* supernatant. The cytokine profile in the control group corresponded to the Th1 variant. In experimental group 1, when using the supernatant of *B. bifidum*, in comparison with the control, the ability of lymphocytes to produce the main pro-inflammatory cytokine, TNF $\alpha$ , decreased 4 times; a suppressive effect was also observed in relation to IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, and IFN $\gamma$ . Inhibition of IL-10 production was observed, while the level of IL-4 and IL-5 increased in comparison with the control. When using the supernatant of chicken embryo cells, we observed similar results to group 1: a suppressive effect on pro-inflammatory and activation of the production of anti-inflammatory cytokines. IL-17 levels decreased in both experimental groups. Activation of the production of anti-inflammatory cytokines in experimental groups modulates the immune response towards Th2, which helps block inflammatory effects.

*Keywords: Bifidobacterium bifidum, chicken embryo cells, Opisthorchis felineus, liver, cytokines*

### Введение

Описторхоз из группы биогельминтозов считается эндемичным и гиперэндемичным заболеванием [1]. Большая часть мирового ареала описторхоза находится на территории России. Самые крупные очаги находятся на территории Ханты-

Мансийского и Ямало-Ненецкого автономных округов, а также Тюменской, Томской, Омской и Новосибирской областей [5]. Естественное течение инфекции *Opisthorchis felineus* характеризуется острой фазой, сопровождающейся миграцией ювенильного паразита через стенку кишечника в

паренхиму печени, и хронической фазой, в которой зрелые паразиты обструктируют и вызывают воспаление желчевыводящих путей. На обеих стадиях заболевание оказывает большое влияние на здоровье человека вследствие своей высокой патогенности и иммуномодуляции [3]. Недавние исследования показывают, что описторхозная инвазия модифицирует иммунную реактивность за счет увеличения синтеза супрессоров иммунного ответа IL10 и TGF- $\beta$  и снижения уровня провоспалительных маркеров IL-4, IL-5 [4]. В настоящее время важно понимать взаимодействие между паразитами, кишечной микробиотой и их влияние на здоровье хозяина. Кроме того, было описано, что *Opisthorchis felinus* может модулировать иммунную систему и ее реакцию на различные антигены, в том числе антигены резидентных бактерий, составляющих микробиоту кишечника [6].

**Цель исследования** – оценить и сравнить противовоспалительную активность супернатанта *Bifidobacterium bifidum* и клеток куриного эмбриона на модели сирийских золотистых хомячков, зараженных *Opisthorchis felinus* в эксперименте *in vivo*.

## Материалы и методы

Живые метацеркарии были выделены *Opisthorchis felinus* (Of) из зараженной рыбы семейства карповых. Супернатант *Bifidobacterium bifidum* (Bb) получали по ранее описанной методике [2]. Для получения супернатанта клеток куриного эмбриона (ККЭ) использовали авторскую методику [7]. Эксперимент проведен на 15 сирийских золотых хомячках (*Mesocricetus auratus*) в возрасте от 4 до 6 недель. Животные были разделены на 3 равные группы по 5 особей в каждой:

1. Контрольная группа (КГ), зараженные метацеркариями Of.
2. Экспериментальная группа 1 (ЭГ 1), зараженные метацеркариями Of с внутрибрюшинным введением Bb (1 мл).
3. Экспериментальная группа (ЭГ 2), зараженные метацеркариями Of с внутрибрюшинным введением ККЭ (1 мл).

Заражение проводилось путем перорального введения метацеркариев Of всем трем группам (доза заражения: 50 метацеркариев). Длительность наблюдения составила 24 дня, во время которых экспериментальные группы ежедневно получали по 3 капли Bb и ККЭ перорально. Условия содержания, экспериментальной работы и вывода животных из эксперимента соответствовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986), и российскому за-

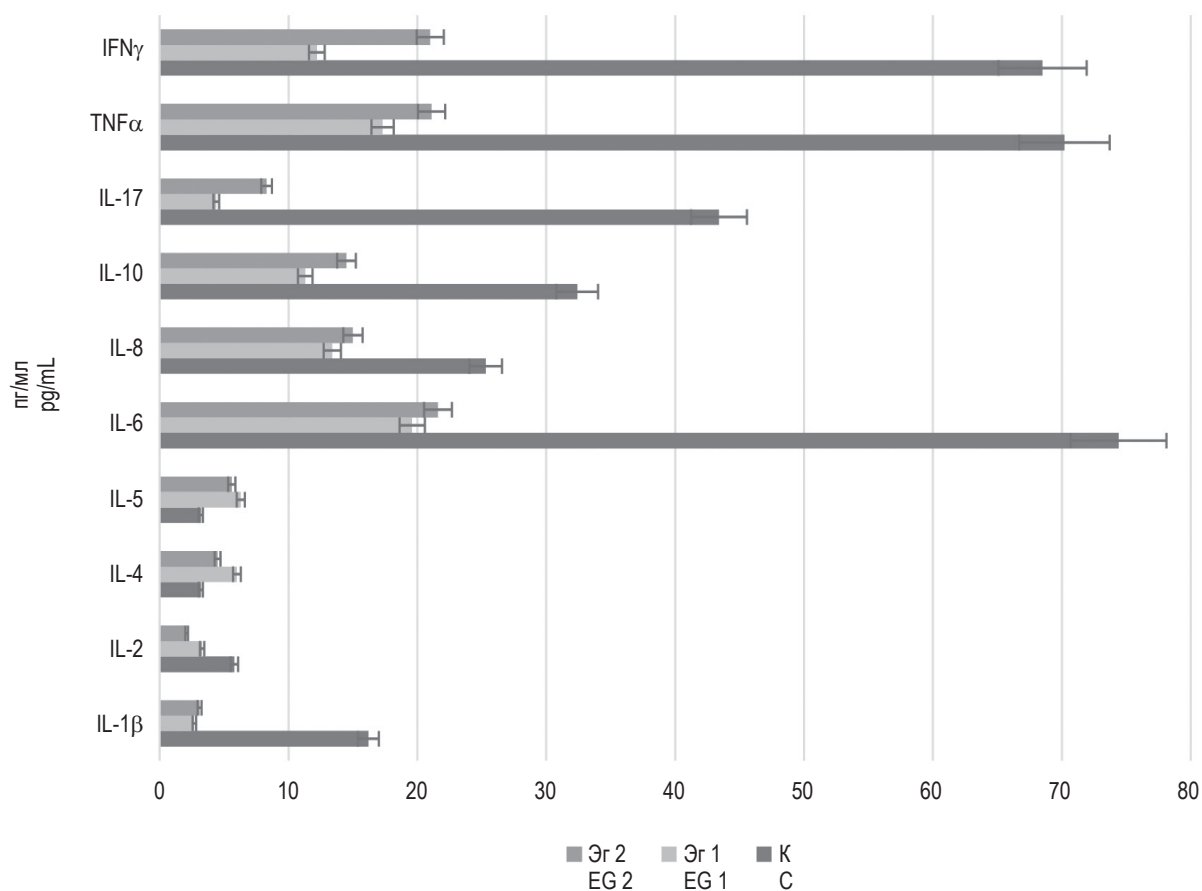
конодательству (ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» от 01.07.2016). По истечению времени эксперимента была изъята печень и кровь хомячков всех групп для гистологического исследования и определения количества цитокинов. Для описательной морфологии органа использовали метод световой микроскопии. Гистологические препараты изучали с использованием бинокулярного светового микроскопа. Срезы изготавлялись с помощью автоматического ротационного микротомы Leica RM 2255 («Лейка Биосистемс Нуслох ГмбХ», Германия. Толщина 5 мкм. Межгрупповое сравнение данных проводили в соответствии протоколом «Морфологические ведомости» – Morphological Newsletter: 2022 Том (Volume) 30 Выпуск (Issue) с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (U) для парных выборок с ненормальным распределением, при уровне доверительной вероятности  $p \leq 0,05$ .

Количество Th1 (IL-1, IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) и Th2 (IL-4, IL-10) и Th17 (IL-17) цитокинов в сыворотке крови определяли с помощью панели Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex для анализа цитокинов мыши (M60009RDPD) методом xMAP мультиплексного ИФА. При помощи анализатора Bio-Plex (Luminex) 200, MAGPIX.

Все статистические анализы проводились с использованием SPSS версии 15 для Windows (SPSS Inc., Чикаго, Иллинойс, США). Значение  $p$  менее 0,05 считалось значимой разницей.

## Результаты и обсуждение

Патоморфологическое изучение печени контрольной группы (рис. 1А, см. 3-ю стр. обложки) показало выраженные органо- и тканеспецифические изменения в виде нарушения структур классических долек за счет гиперплазии соединительной ткани из области портальных трактов. Вследствие чего часть долек имеет нетипичную форму и уменьшенные размеры. Синусоидные капилляры расширены, стенки крупных желчных протоков утолщены, в них сформировались паразитарные гранулемы, в центре которых обнаруживались яйца описторхов, лимфоциты, плазматические и эпителиоидные клетки, эозинофилы. Тканеспецифические изменения обусловили появление гепатоцитов крупных размеров, имеющих полигональную и округлую формы, со светлой, почти неокрашенной, набухшей цитоплазмой и одним круглым базофильным ядром. Описанные изменения клеток связаны с локальным снижением доступа кислорода к гепатоцитам периферической зоны дольки из-за их сдавления фиброзной тканью. Развитие фиброзных изменений печени коррелировало с количеством



**Рисунок 2. Профиль и уровень цитокинов в сыворотке крови животных**

Примечание. Уровень и профиль цитокинов, изменялся в зависимости от вводимого супернатанта. Представлены результаты среднего значения из пяти независимых экспериментов, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего. Статистическая достоверность различий опытных групп с контрольными проверялась с использованием t критерия Стьюдента, \* соответствуют  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ .

Figure 2. Profile and level of cytokines in animal blood serum

Note. The level and profile of cytokines changed depending on the administered supernatant. Results are shown as the average of five independent experiments, with error bars representing the standard error of the mean. The statistical significance of the differences between the experimental groups and the control groups was tested using Student's t test, \* corresponds to  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ .

провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  ( $r = 0,78$ ), IL-6 ( $r = 0,75$ ), IL-1 $\beta$  ( $r = 0,71$ ), IL-8 ( $r = 0,51$ ).

В печени экспериментальных групп (рис. 1Б, В, см. 3-ю стр. обложки) отмечались лишь тканеспецифические изменения. Поражения гепатоцитов наименее выраженные у ЭГ 1 (рис. 1Б, см. 3-ю стр. обложки).

При оценке результатов было установлено, что профиль и уровень цитокинов изменялся в зависимости от вводимого супернатанта (рис. 2). В контрольной группе наблюдалось повышение количества провоспалительных цитокинов. В экспериментальной группе ЭГ 1 в сравнении с контролем в 4 раза уменьшалась способность

лимфоцитов продуцировать основной провоспалительный цитокин TNF $\alpha$ . Супрессирующий эффект наблюдался и в отношении IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IFN $\gamma$  (на  $83,9 \pm 0,2$ ;  $43,1 \pm 0,3$ ;  $73,7 \pm 1,0$ ;  $48,0 \pm 1,1$ ;  $82,2 \pm 0,7\%$  соответственно). Вместе с тем отмечалось угнетение продукции основного противовоспалительного цитокина IL-10 на  $64 \pm 1,04\%$ , но при этом в сравнении с контролем увеличивался уровень IL-4, IL-5 на  $87,5 \pm 0,2$  и  $95,9 \pm 0,2\%$  соответственно. После введения ККЭ в ЭГ 2 мы наблюдали схожие результаты с ЭГ 1: супрессирующий эффект в отношении провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IFN $\gamma$  на  $80,8 \pm 0,1$ ;  $63,3 \pm 0,5$ ;  $71,0 \pm 1,1$ ;  $40,7 \pm 1,5$ ;

69,3±1,4% соответственно), активацию продукции лимфоцитами IL-4 и IL-5 на 40,6±0,9% и 80,6±0,3% в сравнении с контролем. Уровень IL-17 снижался в обеих ЭГ, причем в ЭГ 1 в 10 раз (на 89,9±0,8%), а в ЭГ 2 в 5 раз (на 80,8±1,2%), что объясняется тем, что IL-17 располагается в слизистой оболочке кишечника, которую в большей степени населяют Vb. Активация продукции противовоспалительных цитокинов в обеих группах модулирует иммунный ответ в сторону Th2, что способствует блокированию воспалительных эффектов.

## Заключение

Морфологическую картину печени при развивающемся описторхозе можно охарактеризовать как тенденцию к увеличению проявлений тканевой атипии. В острой фазе гепатоциты печеночных долек, лежащие периферически, имеют более выраженные изменения, по сравнению с центральными. Это свидетельствует о нарушении функционального состояния печени.

Введение супернатантов *Bifidobacterium bifidum* и клеток куриного эмбриона предупреждает проникновение *Opisthorchis felineus* в печень экспериментальных животных. Супернатанты *Bifidobacterium bifidum* более активно снижают количество провоспалительных цитокинов, чем супернатанты клеток куриного эмбриона.

Активация продукции противовоспалительных цитокинов в обеих экспериментальных группах модулирует иммунный ответ в сторону Th2, что способствует блокированию воспалительных эффектов и, возможно, предотвращению образования фиброзных изменений в печени при описторхозной инвазии.

Таким образом, результаты проведенного пилотного исследования применения супернатантов *Bifidobacterium bifidum* и клеток куриного эмбриона дают основание считать состояние нормальной микробиоты макроорганизма определяющим в предупреждении поражения гепатоцитов при описторхозной инвазии и возможность рассматривать *Bifidobacterium bifidum* для профилактики описторхозной инвазии.

## Список литературы / References

1. Бибик О.И. Описторхоз – актуальная проблема здравоохранения (обзор и анализ проблемы) // Российский паразитологический журнал, 2020. Т. 14, № 4. С. 38-49. [Bibik O.I. Opisthorchosis is a topical health problem (problem overview and analysis). *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Parasitology*, 2020, Vol. 14, no. 4, pp. 38-49. (In Russ.)]
2. Костоломова Е.Г., Тимохина Т.Х., Перунова Н.Б., Полянских Е.Д., Сахаров Р.А., Комарова А.В. Оценка иммуномодулирующей активности *Bifidobacterium bifidum* 791 на модели клеток врожденного и адаптивного иммунитета в эксперименте *in vitro* // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 213-218. [Kostolomova E.G., Timokhina T.K., Perunova N.B., Polyanskikh E.D., Sakharov R.A., Komarova A.V. *In vitro* evaluation of immunomodulatory activity of *Bifidobacterium bifidum* 791 in the cell model of innate and adaptive immunity. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 213-218. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1133-IVE.
3. Хадиева Е.Д., Костоломова Е.Г., Полянских Е.Д., Коробейникова Д.А., Бычкова Е.М., Морозов Е.Н., Бычков В.Г. Цитокиновый профиль мононуклеарных клеток периферической крови, стимулированных антигеном *Opisthorchis felineus* в эксперименте *in vitro* // Медицинская паразитология и паразитарные болезни, 2022. № 2. С. 47-51. [Khadiyeva E.D., Kostolomova E.G., Polyanskikh E.D., Korobeynikova D.A., Bychkova E.M., Morozov E.N., Bychkov V.G. Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Opisthorchis felineus* antigen in an *in vitro* experiment. *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2022, no. 2, pp. 47-51. (In Russ.)]
4. Fedorova O.S., Janse J.J., Ogorodova L.M., Fedotova M.M., Achterberg R.A., Verweij J.J., Fernández-Rivas M., Versteeg S.A., Potts J., Minelli C., van Ree R., Burney P., Yazdanbakhsh M. *Opisthorchis felineus* negatively associates with skin test reactivity in Russia-EuroPrevall-International Cooperation study. *Allergy*, 2017, Vol. 72, no. 7, pp. 1096-1104.
5. Fedorova O.S., Fedotova M.M., Sokolova T.S., Golovach E.A., Kovshirina Y.V., Ageeva T.S., Kovshirina A.E., Kobyakova O.S., Ogorodova L.M., Odermatt P. *Opisthorchis felineus* infection prevalence in Western Siberia: A review of Russian literature. *Acta Trop.*, 2018, Vol. 178, pp. 196-204.

6. Pakharukova M.Y., Lishai E.A., Zapparina O., Baginskaya N.V., Hong S.J., Sripa B., Mordvinov V.A. *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis felineus* liver flukes affect mammalian host microbiome in a species-specific manner. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2023, Vol. 17, no. 2, e0011111. doi: 10.1371/journal.pntd.0011111.
7. Goltsov S.V., Suhovei Yu.G., Kostolomova E.G., Unger I.G. Means for wound healing "Cellgel", a method for its preparation and a method for treating wounds of various etiologies with the product obtained. Patent RU2481115 (Russia) on 13.10.2011. EDN: ZGRGOD.

---

**Авторы:**

**Костоломова Е.Г.** — к.б.н., доцент кафедры микробиологии; научный сотрудник лаборатории геномики, протеомики и метаболомики Университетского НИИ медицинских биотехнологий и биомедицины ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

**Лозовая П.Б.** — студентка, Институт клинической медицины ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

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

**Тимохина Т.Х.** — д.б.н., доцент, заведующая кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

**Паромова Я.И.** — к.б.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

**Authors:**

**Kostolomova E.G.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology; Research Associate of the University Research Institute of Medical Biotechnology and Biomedicine, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

**Lozovaya P.B.**, Student, Institute of Clinical Medicine, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

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

**Timokhina T.Kh.**, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

**Paromova Ya.I.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

---

Поступила 27.03.2024  
Отправлена на доработку 31.03.2024  
Принята к печати 02.04.2024

Received 27.03.2024  
Revision received 31.03.2024  
Accepted 02.04.2024



## МОДЕЛИРОВАНИЕ *IN SITU* И *IN SILICO* ГЕМОПОЭЗИНДУЦИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ХЕЛИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Насибов Т.Ф.<sup>1</sup>, Горохова А.В.<sup>1</sup>, Порохова Е.Д.<sup>1</sup>, Старосветская А.А.<sup>1</sup>,  
Бариев У.А.<sup>1</sup>, Носов В.Е.<sup>1</sup>, Литвинова Л.С.<sup>2</sup>, Авдеева Е.Ю.<sup>1</sup>,  
Белоусов М.В.<sup>1</sup>, Хлусов И.А.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

**Резюме.** Современным трендом регенеративной медицины, в условиях старения населения, является поиск новых путей и средств для оптимизации биоинженерии тканей. Одной из удобных моделей для *in situ* изучения регенерации костного мозга является тест подкожного эктопического остеогенеза на скаффолдах, имитирующих архитектуру костной ткани. Хелидоновая кислота (ХК) представляет собой малую молекулу, способную участвовать в разнообразных клеточных процессах и метаболических путях и активировать остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток. Однако молекулярные механизмы регуляторных эффектов ХК до сих пор неизвестны.

Целью данного исследования была оценка модулирующего влияния ХК на *in situ* формирование очагов кроветворения, а также *in silico* прогнозирование генов-мишеней и внутриклеточных сигнальных путей, которые могут участвовать в реализации гемопоэтической активности тестируемой субстанции.

Водный раствор ХК, выделенной из экстракта растения *Saussurea controversa*. Курсовое (ежедневное в течение 35 дней) пероральное введение ХК. Тест эктопического остеогенеза на мышцах линии *Balb/c*. Морфометрический анализ гистологических срезов через 45 суток. Моделирование экспрессии генов *in silico*. Статистический анализ.

ХК при курсовом пероральном введении в малой дозе (10 мг/кг) в 3 раза увеличивает удельную площадь костного мозга в составе костных тканевых пластинок, выросших *in situ* в тесте эктопического подкожного остеогенеза на мышцах. Гемостимулирующий эффект субстанции прогностически значимо (вероятность активности  $P_a > 0,5$  и вероятность неактивности  $P_i < 0,5$ ) связан с усиленной

### Адрес для переписки:

Хлусов Игорь Альбертович  
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения РФ  
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, стр. 7.  
Тел.: 8 (913) 813-14-00.  
E-mail: khlusov.ia@ssmu.ru

### Address for correspondence:

Igor A. Khlusov  
Siberian State Medical University  
2 Moskovskii Trakt, Bldg 7  
Tomsk  
634050 Russian Federation  
Phone: +7 (913) 813-14-00.  
E-mail: khlusov.ia@ssmu.ru

### Образец цитирования:

Т.Ф. Насибов, А.В. Горохова, Е.Д. Порохова,  
А.А. Старосветская, У.А. Бариев, В.Е. Носов,  
Л.С. Литвинова, Е.Ю. Авдеева, М.В. Белоусов,  
И.А. Хлусов «Моделирование *in situ* и *in silico*  
гемопоэзинуцирующего влияния хелидоновой кислоты»  
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,  
№ 2. С. 187-196.  
doi: 10.46235/1028-7221-16768-ISA

© Насибов Т.Ф. и соавт., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

T.F. Nasibov, A.V. Gorokhova, E.D. Porokhova,  
A.A. Starosvetskaya, U.A. Bariev, V.E. Nosov, L.S. Litvinova,  
E.Yu. Avdeeva, M.V. Belousov, I.A. Khlusov "In situ and  
in silico modeling of the hematopoiesis-inducing effect of  
chelidonic acid", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 187-196.  
doi: 10.46235/1028-7221-16768-ISA

© Nasibov T.F. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.46235/1028-7221-16768-ISA

экспрессией 358 генов-регуляторов кроветворения по данным *in silico* исследования. Топ-лист с наибольшим значением  $P_a$  включал 10 целевых генов: *GATA1*, *CITED2*, *SFRP1*, *EP300*, *LGALS9*, *VNN1*, *IL10RB*, *RARA*, *CD83*, *HMOX1*.

ХК обладает существенной способностью усиливать репаративное ремоделирование кроветворной ткани *in situ*. Следующим этапом исследований является проверка реальных генов-мишеней и сигнальных путей, реализующих регуляторное влияние ХК на гемопоэз *in vitro*, *in vivo* и в клинике.

*Ключевые слова:* мыши, эктопический тест, площадь костного мозга, гены-мишени, сигнальные пути, прогнозирование

## IN SITU AND IN SILICO MODELING OF THE HEMATOPOIESIS-INDUCING EFFECT OF CHELIDONIC ACID

Nasibov T.F.<sup>a</sup>, Gorokhova A.V.<sup>a</sup>, Porokhova E.D.<sup>a</sup>, Starosvetskaya A.A.<sup>a</sup>, Bariev U.A.<sup>a</sup>, Nosov V.E.<sup>a</sup>, Litvinova L.S.<sup>b</sup>, Avdeeva E.Yu.<sup>a</sup>, Belousov M.V.<sup>a</sup>, Khlusov I.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Abstract.** The current trend in regenerative medicine, in the context of an aging population, is the search for new ways and means to optimize tissue bioengineering. One of the convenient models for *in situ* studying bone marrow regeneration is the subcutaneous ectopic osteogenesis test on scaffolds that imitate the architecture of bone tissue. Chelidonic acid (CA), a small molecule, is capable of participating in various cellular processes and metabolic pathways, and it can activate the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. However, the molecular mechanisms behind the regulatory effects of CA remain unknown. The aim of this study was to investigate the modulatory effect of CA on the *in situ* formation of hematopoietic foci, as well as to predict target genes and intracellular signalling pathways involved in the hematopoietic activity of CA. An aqueous solution of CA, isolated from an extract of the *Saussurea controversa* plant. Course (daily for 35 days) oral administration of CA. Ectopic osteogenesis testing in Balb/c mice. Morphometric analysis of histological sections after 45 days and *in silico* modelling of gene expression with statistical analysis. CA, when administered orally in a low dose (10 mg/kg), threefold increases the normalized area of bone marrow in the composition of bone tissue plates grown *in situ* in a test of ectopic subcutaneous osteogenesis in mice. This effect is associated essentially (a probability of CA activity  $P_a > 0.5$  and a probability of inactivity  $P_i < 0.5$ ) with enhanced expression of 358 hematopoiesis-related genes, as predicted by *in silico* analysis. The top list with the highest  $P_a$  value included 10 target genes, such as *GATA1*, *CITED2*, *SFRP1*, *EP300*, *LGALS9*, *VNN1*, *IL10RB*, *RARA*, *CD83*, and *HMOX1*. CA has a significant ability to enhance the reparative remodelling of hematopoietic tissue *in situ*. The next phase of research will be to test actual target genes and signalling pathways that mediate the regulatory effect of HC on hematopoiesis both *in vitro* and *in vivo*, as well as in clinical settings.

*Keywords:* mice, ectopic test, bone marrow area, target genes, signalling pathways, prediction

Исследование выполнено в рамках реализации Государственного задания по проекту № FZWM-2024-0012.

### Введение

Современным трендом регенеративной медицины, в условиях старения населения, является

поиск новых путей и средств для оптимизации биоинженерии тканей. Недавно выявлено *in vitro* и *in vivo* остеогенное влияние хелидоновой кислоты (ХК) и ее дериватов, природных компонентов чистотела большого (*Chelidonium majus* L.), Горькуши (*Saussurea*) и некоторых других растений, реализующееся на уровне мезенхимных

стромальных/стволовых клеток (МСК) [2]. Кроме того, ХК обладает определенными иммуномодулирующими свойствами, реализующимися, в частности, на уровне лимфоидного ростка кроветворения. Однако внутриклеточные молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляторных эффектов ХК, до сих пор не установлены [1].

Известна тесная связь костной и кроветворной тканей, обусловленная, в том числе, остеобластическими нишами для родоначальных клеток миело- и лимфопоэза [13]. В условиях репаративной регенерации ремоделирование костной ткани часто протекает путем эндохондрального (непрямого) окостенения, которое сопровождается *de novo* формированием очагов костномозгового кроветворения [5]. Одной из удобных релевантных моделей для *in situ* изучения регенерации костного мозга является тест подкожного эктопического остеогенеза на подложках-скаффолдах, имитирующих архитектуру костной ткани [9].

В связи с этим, целью данного исследования была оценка модулирующего влияния ХК на *in situ* формирование очагов кроветворения, а также *in silico* прогнозирование генов-мишеней и внутриклеточных сигнальных путей, которые могут участвовать в реализации гемопоэтический активности тестируемой субстанции.

## Материалы и методы

### Тест эктопического остеогенеза

Для эксперимента на базе ИФПМ СО РАН (лаборатория физики наноструктурных биоконструктивов – заведующий Ю.П. Шаркеев, г. Томск) были изготовлены титановые подложки (10 × 10 × 1 мм) с микродуговым кальцийфосфатным покрытием. Хелидоновая кислота (ХК) была выделена из экстракта растения *Saussurea controversa* на кафедре фармацевтического анализа СибГМУ (г. Томск). Исследование проводилось на 12 самцах мышей линии *Balb/c* возрастом 12 недель. Четыре мыши служили донорами костного мозга (КМ) из бедренных костей, как источника МСК. Остальным животным под наркозом выполняли разрез кожи на животе с формированием бокового кармана и подкожно имплантировали по одному скаффолду с нанесенным *in vitro* столбиком сингенного КМ. Для улучшения адгезии миелокариоцитов, сингенный КМ предварительно наносили на поверхность имплантатов и инкубировали *in vitro* в течение 45 мин непосредственно перед имплантацией при 37 °С в культуральной среде, состоящей на 95% из среды DMEM (Sigma-Aldrich, США) и на 5% из фетальной бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США).

Спустя 5 послеоперационных дней, в течение последующих 35 суток животным ежедневно вводили воду (контроль; n = 4) или водный раствор ХК (CA<sub>ig</sub>, 10 мг/кг) через внутрижелудочный зонд (n = 4). Данная доза ХК является минимально эффективной для стимуляции остеогенной дифференцировки МСК в исследованиях *in vitro* [3].

Через 45 суток после операции (5 суток после окончания курсового введения ХК) животных выводили из эксперимента методом CO<sub>2</sub> асфиксии, извлекали имплантаты из подкожной жировой клетчатки. Из тканевых пластинок (ТП), сформировавшихся на поверхности имплантатов из донорского костного мозга, изготавливали гистологические препараты по методике, описанной ранее [2]. Окрашенные гематоксилином-эозином срезы ТП просматривали на микроскопе Carl Zeiss Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия), делали цифровые фотографии при помощи камеры Canon PowerShot G10 (Canon, Япония; разрешение 14 мегапикселей) и программного обеспечения AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss, Германия). На полученных фотографиях, оценивали наличие локальной воспалительной реакции, формирование тканевых структур и подсчитывали удельную площадь (УП) КМ методом компьютерной морфометрии с применением программного обеспечения ImageJ (версия 1.53j).

### Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных выполнялся при помощи языка программирования R в среде RStudio с использованием пакетов MVN [7], brunnermunzel [4]. Проверка количественных признаков на соответствие нормальному закону распределения выполнялась тестом Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk test) с поправкой Ройстона (Royston) AS R94 для больших выборок (3 ≤ n ≤ 5000). Описание количественных нормально распределенных признаков приводится в виде среднего значения и стандартного отклонения (M ± SD), количественных признаков, не соответствующих нормальному распределению, и порядковых признаков в виде медианы и первого и третьего квартилей – Me (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>). Для ранговых и количественных, не согласующихся с нормальным законом, независимых данных сравнение проводилось при помощи критерия Бруннера–Мюнцеля (Brunner–Munzel test).

### Моделирование *in silico* и биоинформатический анализ

Первоначальный анализ был произведен в сервисе Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS Online), который является онлайн-версией

программного продукта PASS, предназначенного для оценки общей биологической активности органических молекул, подобных существующим лекарствам [6]. Прогнозирование основано на концепции локального соответствия, предлагающей в качестве ведущего фактора биологической активности органической молекулы узнавание между определенными атомами лиганда и макромолекулой-мишенью. Для моделирования эффекта, направленного на экспрессию генов, использовался веб-сервис DIGEP-Pred (Prediction of drug-induced changes of gene expression profile), как наиболее удовлетворяющий целям исследования. DIGEP-Pred прогнозирует *in silico* медикаментозные изменения профилей экспрессии генов на основе структурной формулы молекулы [8]. DIGEP-Pred работает на технологии PASS и обучающей выборке (мРНК – 952 гена, белки – 1451 соединение для 129 генов), созданных на основе данных о медикаментозно-индуцированных изменениях профилей экспрессии генов, извлеченных из базы данных сравнительной токсикогеномики (Comparative Toxicogenomics Database, CTD), базы данных Connectivity Map и проекта L1000. Также в ходе исследования использована база данных GeneCards, которая предоставляет доступ к бесплатным веб-ресурсам о более чем 7000 известных генах человека и содержит геномную, протеомную, транскриптомную и функциональную информацию о них. Ядро перечня генов основано на утвержденных генных символах, опубликованных Комитетом по номенклатуре генов HUGO (HGNC). Поиск генов производился по набору ключевых слов. Результатом каждого запроса являлся список генов, содержащий название гена, а также ранговое значение, описывающее частоту встречаемости упоминаний данного гена в публикациях в сочетании с ключевым словом. После выполнялось сравнение результатов прогноза DIGEP-Pred со списком генов, полученных из GeneCards, выбирались те гены, которые наблюдались в обоих списках. Процесс был оптимизирован при помощи языка программирования R. Перед следующим этапом все «перекрестные» гены были разделены на две группы по направлению изменения моделируемой экспрессии: гиперэкспрессируемые гены и гипоекспрессируемые. Далее для каждой группы производили поиск общих онтологий и возможных метаболических путей, в которых участвуют продукты исследуемых генов, методом анализа чрезмерной репрезентативности (Over-representation analysis, ORA), для которого в среде RStudio, на языке программирования R был создан скрипт. Для

его работы использовались пакеты DOSE [12], clusterProfiler [11], rWikiPathways [10]. В ходе ORA гены собирались в группы согласно метаболическому пути или общей онтологии генов, в которых участвуют их продукты, затем определялась статистическая значимость объединения той или иной группы генов при помощи точного теста Фишера. Перечень возможных метаболических путей был получен из баз данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), Reactome, WikiPathways, а онтология генов из GO.db (Gene Ontology data base). Результатом работы скрипта являлась таблица, содержащая следующий перечень данных: идентификатор метаболического пути, его краткое название, список генов, продукты которых входят в данный путь, их количество, а также уровень значимости  $p$ . Выбирались метаболические пути, связанные с гемопоэзом и имеющие  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

При макроскопическом изучении зон имплантации у животных всех экспериментальных групп отсутствовали признаки острой воспалительной реакции (выраженная гиперемия кровеносных сосудов и образование экссудата в месте имплантации). На поверхности всех исследуемых имплантатов (в контроле и опыте) в зоне нанесения донорского костного мозга в 100% случаев (4 из 4 в каждой группе) у мышей-реципиентов наблюдалось образование ТП.

При гистологическом исследовании ТП и окружающих тканей не наблюдалось расширения и гиперемии сосудов, лейкоцитарной инфильтрации и некротических изменений тканей, что свидетельствует об отсутствии острой воспалительной реакции в зоне имплантации. В составе ТП присутствовали участки пластинчатой костной ткани, формирующей примитивное компактное и губчатое вещество кости. В полостях между трабекулами губчатого вещества кости наблюдались участки красного костного мозга (рис. 1).

При этом у животных, получавших воду *per os* (группа Control), костная ткань формировалась на поверхности имплантатов в 100% случаев, однако содержала полости, заполненные красным костным мозгом (ККМ), только в 75% случаев. У животных, получавших ХК (группа CA<sub>ig</sub>), тканевые пластинки в 100% случаев содержали участки костной ткани и ККМ. Важно, что пероральное назначение ХК в 2,88 раза увеличивало УП ККМ в сравнении с контролем (Brunner–Munzel test statistic = 4,95,  $p = 0,0026$ ) (рис. 2).

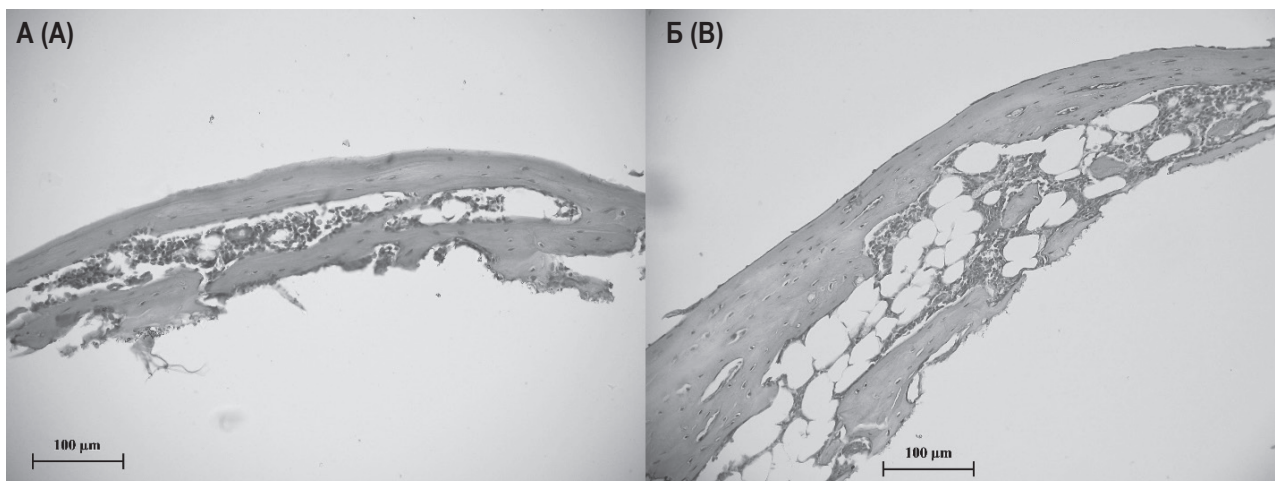


Рисунок 1. Срез эктопической кости с образовавшимся костным мозгом внутри (А – Control, Б – CA\_ig)

Примечание. Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 50$ .

Figure 1. Section of ectopic bone with formed bone marrow inside (A, Control; B, CA\_ig)

Note. Hematoxylin and eosin staining. Magnification  $\times 50$ .

В ходе *in silico* прогнозирования оценки общей биологической активности ХК получены значения активности (Pa) и неактивности (Pi) субстанции в отношении различных молекул-мишеней. Значения Pa и Pi оценивают вероятность принадлежности исследуемого соединения к классу активных веществ, т. е. структур, которые часто встречаются среди активных соединений в обучающей выборке, и к классу неактивных веществ, т. е. структур, характерных для неактивных молекул в обучающей выборке соответственно.

В ходе прогноза общей биоактивности ХК получили упорядоченный список генов и оценок вероятностей Pa и Pi; всего найдено 1168 генов. Для последующей обработки выбрано 358 генов, для которых были справедливы следующие условия: вероятность ХК быть активной в отношении прогноза экспрессии гена  $Pa > 0,5$ ; вероятность быть активной (Pa) больше вероятности быть неактивной (Pi).

В ходе ORA был получен список метаболических путей, из которых пути и онтологии генов, прямо ассоциированные с гемопоэзом и имеющие  $p < 0,05$ . Таким образом было выделено несколько различных путей и онтологий, образованных только генами из группы гиперэкспрессии, среди которых выделяли пути регуляции лейкопоэза (regulation of leukocyte differentiation), лимфопоэза (positive regulation of lymphocyte differentiation), эритропоэза и метаболизма гемоглобина (hematopoietic progenitor cell differentiation, erythrocyte homeostasis, heme metabolic process), и противовоспалительные механизмы организма (IL-4 and IL-13 signaling,

IL-10 signaling). Гены, составляющие эти пути, объединялись в единый список с удалением повторяющихся наименований, таким образом нами найдены целевые гены, экспрессия которых изменяется при добавлении ХК в изучении гемопоэза. Из них (целевых генов) нами был со-

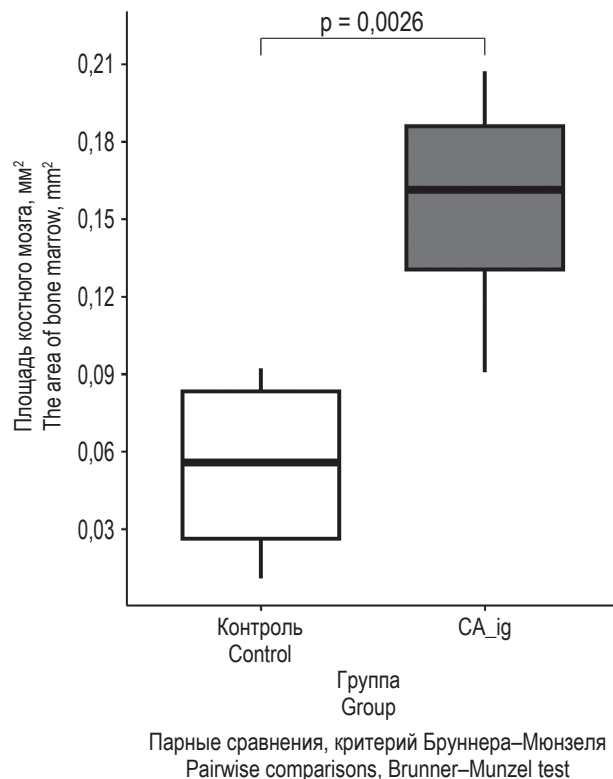


Рисунок 2. График сравнения удельной площади костного мозга в исследуемых группах

Figure 2. Graph comparing the normalized bone marrow areas in the study groups

**ТАБЛИЦА 1. СПИСОК ПРИОРИТЕТНЫХ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПРОВЕРКИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПУТЕЙ ВЛИЯНИЯ ХЕЛИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ГЕМОПОЭЗ**

TABLE 1. LIST OF PRIORITY TARGET GENES FOR EXPERIMENTAL VERIFICATION OF MOLECULAR PATHWAYS OF THE EFFECT OF CHELIDONIC ACID ON HEMATOPOIESIS

Ген Gene	Продукт гена Gene product	Тип регуляции Type of regulation	Влияние на гемопоэз Effect on hematopoiesis	Источник Reference
<b>GATA1</b>	<b>ГАТА-связывающий белок 1</b> GATA Binding Protein 1	Up	<b>Считается «главным» фактором транскрипции эритропоэза, регулирует большинство процессов во время созревания предшественников</b> It is considered the "main" factor of erythropoiesis transcription, regulates most processes during the maturation of precursors	KEGG, GO.db, WikiPathways
<b>CITED2</b>	<b>Трансактиватор, взаимодействующий с Cbp/P300 с богатым Glu/Asp Карбоксиконцевым доменом 2</b> Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 2	Up	<b>Транскрипционный коактиватор транскрипционного комплекса. Действует как мост, связывающий другие факторы транскрипции, участвуя в поддержании ГСК</b> Transcriptional coactivator of the transcription complex. It acts as a bridge linking other transcription factors, participating in the maintenance of HSC	KEGG, GO.db, WikiPathways, Reactome
<b>SFRP1</b>	<b>Секретируемый белок, связанный с завитками, 1</b> Secreted Frizzled Related Protein 1	Up	<b>Ингибирует транслокацию β-катенина в ядро (канонической передачи сигналов WNT), регулируя дифференцировку и самоподдержание ГСК (предотвращает истощение)</b> Inhibits the translocation of β-catenin into the nucleus (canonical WNT signaling), regulating the differentiation and self-maintenance of HSCs (prevents depletion)	GO.db, WikiPathways, Reactome
<b>EP300</b>	<b>Гистонацетилтрансфераза P300</b> E1A Binding Protein P300	Up	<b>Клеточный коактиватор транскрипции, ацетилирует гистоновые и негистоновые белки, тем самым модулирует связывание ДНК с транскрипционными факторами. Играет важную роль в лимфоидной и миелоидной дифференцировке</b> A cellular transcription coactivator, acetylates histone and non-histone proteins, thereby modulating DNA binding to transcription factors. It plays an important role in lymphoid and myeloid differentiation	KEGG, GO.db, WikiPathways, Reactome
<b>LGALS9</b>	<b>Галектин 9</b> Galectin 9	Up	<b>Обильно экспрессируется в остеогенных нишах, необходим для межклеточных контактов в эритропоэзе, лимфопоэзе и миелопоэзе</b> It is abundantly expressed in osteogenic niches, is necessary for intercellular contacts in erythropoiesis, lymphopoiesis and myelopoiesis	KEGG, GO.db

Таблица 1 (окончание)  
Table 1 (continued)

Ген Gene	Продукт гена Gene product	Тип регуляции Type of regulation	Влияние на гемопоэз Effect on hematopoiesis	Источник Reference
VNN1	Ванин 1 Vanin 1	Up	<b>Молекула клеточной адгезии, экспрессируемая периваскулярными клетками, участвует в регуляции хоминга предшественников Т-лимфоцитов из ККМ в тимус</b> The cell adhesion molecule expressed by perivascular cells is involved in the regulation of the homing of T lymphocyte precursors from the RBM to the thymus	KEGG, GO.db, WikiPathways, Reactome
IL10RB	Бета-субъединица рецептора IL-10 IL-10 Receptor Subunit Beta	Up	<b>Вспомогательная цепь, необходимая для активного комплекса IL-10R, лиганд которого (IL-10) участвует в защите предшественников миелопоэза во время воспаления, тем самым обеспечивая устойчивость популяции</b> An auxiliary chain required for the active IL-10R complex, the ligand of which (IL-10) participates in the protection of myelopoiesis precursors during inflammation, thereby ensuring the stability of the population	KEGG, GO.db, WikiPathways
RARA	Альфа-рецептор ретиноевой кислоты Retinoic Acid Receptor Alpha	Up	<b>Ядерный рецептор регулирует транскрипцию лигандзависимым образом. Усиливает конечное созревание коммитированных предшественников, но тормозит дифференцировку ранних предшественников гранулоцитов и моноцитов</b> The nuclear receptor regulates transcription of ligands in a dependent manner. Enhances the final maturation of committed precursors, but inhibits the differentiation of early granulocyte and monocyte precursors	GO.db, WikiPathways
CD83	Антиген CD83 CD83 Antigen	Up	<b>Является членом суперсемейства генов Ig, важным маркером для определения активированных дендритных клеток человека. По современным представлениям может экспрессироваться на Т-лимфоцитах, определяя прогноз в клинической аллопластике</b> It is a member of the Ig gene superfamily, an important marker for determining activated human dendritic cells. According to modern concepts, it can be expressed on T-lymphocytes, determining the prognosis in clinical alloplasty	KEGG, GO.db, Reactome
HMOX1	Гемооксигеназа 1 Heme Oxygenase 1	Up	<b>Фермент, участвующий в катаболизме гема. Участвует в поддержании ГСК ниши и регулирует дифференцировку предшественников в зрелые клетки крови</b> An enzyme involved in heme catabolism. Participates in the maintenance of the HSC niche and regulates the differentiation of precursors into mature blood cells	GO.db, WikiPathways

ставлен «топ-лист», члены которого являются приоритетными для последующего изучения реального влияния хелидоновой кислоты на молекулярные механизмы гемопоэза (табл. 1).

## Заключение

ХК при курсовом пероральном введении в малой дозе существенно усиливает репаративное ремоделирование кроветворной ткани в тесте эктопического остеогенеза. В связи с явным недостатком гемопоэзиндуцирующих средств, обладающих регуляторным эффектом при пе-

роральном назначении, полученные результаты имеют как фундаментальное, так и практическое значение.

Гемостимулирующий эффект субстанции прогностически значимо связан с генами-регуляторами кроветворения по данным исследования *in silico*. Следующим этапом является проверка реальных генов-мишеней и сигнальных путей, реализующих влияние ХК на гемопоэз *in vitro*, *in vivo* и в клинике.

Публикация размещена при участии Балтийского федерального университета им. И. Канта.

## Список литературы / References

1. Мирошниченко Л.А., Полякова Т.Ю., Авдеева Е.Ю., Кривошеков С.В., Хлусов И.А., Белоусов М.В. Хелидоновая кислота и ее дериваты: общий спектр биологической активности и остеогенные свойства // Разработка и регистрация лекарственных средств, 2022, Т. 11, № 4, С. 60-71. [Miroshnichenko L.A., Polyakova T.U., Avdeeva E.Yu., Krivoshchekov S.V., Khlusov I.A., Belousov M.V. Chelidonic acid and its derivatives: general spectrum of biological activity and osteogenic properties. *Razrabotka i registraciya lekarstvennykh sredstv = Development and Registration of Medicines*, 2022, Vol. 11, no. 4, pp. 60-71. (In Russ.)]
2. Avdeeva E., Porokhova E., Khlusov I., Rybalova T., Shults E., Litvinova L., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Sukhodolo I., Belousov M. Calcium chelidonate: semi-synthesis, crystallography, and osteoinductive activity in vitro and in vivo. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, Vol. 14, no. 6, 579. doi: 10.3390/ph14060579.
3. Avdeeva E., Shults E., Rybalova T., Reshetov Y., Porokhova E., Sukhodolo I., Litvinova L., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Khlusov I., Guryev A., Belousov M. Chelidonic acid and its derivatives from saussurea controversa: isolation, structural elucidation and influence on the osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *Biomolecules*, 2019, Vol. 9, no. 5, 189. doi:10.3390/biom9050189.
4. Brunner-Munzel Test // CRAN. Access mode: <https://search.rproject.org/CRAN/refmans/brunnermunzel/html/00Index.html> (Accessed 22 February 2024).
5. Chan C.K., Chen C.C., Luppen C.A., Kim J.B., DeBoer A.T., Wei K., Helms J.A., Kuo C.J., Kraft D.L., Weissman I.L. Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature*, 2009, Vol. 457, no. 7228, pp. 490-494.
6. Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chem. Heterocycl. Compd.*, 2014, Vol. 50, no. 3, pp. 444-457.
7. Korkmaz S., Göksülük D., Zararsiz G. MVN: An R package for assessing multivariate normality. *R Journal*, 2014, Vol. 6, no. 2, pp. 151-162.
8. Lagunin A., Ivanov S., Rudik A., Filimonov D., Poroikov V. DIGEP-Pred: web service for *in silico* prediction of drug-induced gene expression profiles based on structural formula. *Bioinformatics*, 2013, Vol. 29, no. 16, pp. 2062-2063.
9. Scott M.A., Levi B., Askarinam A., Nguyen A., Rackohn T., Ting K., Soo C. James A.W. Brief review of models of ectopic bone formation. *Stem Cells Dev.*, 2012, Vol. 21, no. 5, pp. 655-667.
10. Slenter D.N., Kutmon M., Hanspers K., Riutta A., Windsor J., Nunes N., Mélius J., Cirillo E., Coort S.L., Digles D., Ehrhart F., Giesbertz P., Kalafati M., Martens M., Miller R., Nishida K., Rieswijk L., Waagmeester A., Eijssen L.M.T., Evelo C.T., Willighagen E.L. WikiPathways: a multifaceted pathway database bridging metabolomics to other omics research. *Nucleic Acids Res.*, 2018, Vol. 46, no. D1, pp. D661-D667.
11. Wu T., Hu E., Xu S., Chen M., Guo P., Dai Z., Feng T., Zhou L., Tang W., Zhan L., Fu X., Liu S., Bo X., Yu G. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation (Camb)*, 2021, Vol. 2, no. 3, 100141. doi: 10.1016/j.xinn.2021.100141.



12. Yu G., Wang L.G., Yan G.R., He Q.Y. DOSE: an R/Bioconductor package for disease ontology semantic and enrichment analysis. *Bioinformatics*, 2015, Vol. 31, no. 4, pp. 608-609.
13. Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Melashchenko E.S., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Shupletsova V.V., Ivanov P.A., Khlusov I.A., Litvinova L.S. Cellular and molecular basis of osteoblastic and vascular niches in the processes of hematopoiesis and bone remodeling (a short review of modern views). *Curr. Pharm. Des.*, 2019, Vol. 25, no. 6, pp. 663-669.

---

**Авторы:**

**Насибов Т.Ф.** — сотрудник лаборатории клеточных и микрофлюидных технологий ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Горохова А.В.** — сотрудник лаборатории клеточных и микрофлюидных технологий ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Порохова Е.Д.** — ассистент кафедры морфологии и общей патологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Старосветская А.А.** — студент медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Бариев У.А.** — студент лечебного факультета ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Носов В.Е.** — лаборант кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Authors:**

**Nasibov T.F.**, Laboratory Assistant, Laboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Gorokhova A.V.**, Laboratory Assistant, Laboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Porokhova E.D.**, Assistant Professor, Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Starosvetskaya A.A.**, Student of the Faculty of Medicine and Biology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Bariev U.A.**, Student of the Faculty of Medicine, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Nosov V.E.**, Laboratory Assistant, Department of Normal Physiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

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

**Авдеева Е.Ю.** — д.фарм.н., научный сотрудник лаборатории клеточных и микрофлюидных технологий ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Белюсов М.В.** — д.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных и микрофлюидных технологий ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Хлусов И.А.** — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточных и микрофлюидных технологий ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Litvinova L.S.**, PhD, MD (Medicine), Director, Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

**Avdeeva E.Yu.**, PhD, MD (Pharmaceutical), Research Associate, Laboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Belousov M.V.**, PhD, MD (Pharmaceutical), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Khlyusov I.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Chief, Laboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

---

Поступила 30.03.2024

Отправлена на доработку 01.04.2024

Принята к печати 05.04.2024

Received 30.03.2024

Revision received 01.04.2024

Accepted 05.04.2024

## **ВЛИЯНИЕ ЭНДОМОРФИНОВ-1, 2 НА ОСОБЕННОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ Т- И В-ЛИМФОЦИТАМИ *IN VIVO***

Гейн С.В.<sup>1,2</sup>, Кадочникова Я.А.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

**Резюме.** Основным способом лечения болевого синдрома является применение морфина и его аналогов, обладающих широким спектром побочных эффектов. В связи с этим, многие современные исследования направлены на поиск более безопасных анальгезирующих соединений. В настоящее время, среди аналогов морфина большое внимание уделяется эндогенным опиоидным пептидам, которые вместе с анальгетическим эффектом обладают выраженными иммунорегуляторными свойствами. В настоящее время известно, что функциональная активность иммунных клеток обеспечивается метаболизмом. Данный процесс снабжает клетки энергией, необходимой для активации, дифференцировки, пролиферации, апоптоза и др. Ключевую роль в обеспечении функций иммунных клеток играет метаболизм глюкозы. Цель настоящей работы — оценить влияние эндоморфинов-1, 2 на особенности поглощения глюкозы Т- и В-лимфоцитами *in vivo*. Объектом исследования являлись белые мыши самцы, пептиды вводились мышам внутривенно в дозе 100 мкг/кг, поглощение глюкозы клетками оценивали с использованием флуоресцентных аналогов глюкозы (2-NBDG). Установлено, что эндоморфин-1 не влиял на интенсивность потребления глюкозы как в Т-, так и в В-клетках. Введение животным эндоморфина-2, напротив, приводило к существенному усилению поглощения глюкозы в Т-лимфоцитах. При этом уровень потребления глюкозы в В-клетках после введения эндоморфина-2 значительно не изменялся. При исследовании двух субпопуляций Т-лимфоцитов было отмечено, что эндоморфин-2 приводит к увеличению потребления глюкозы как в CD4<sup>+</sup>, так и в CD4<sup>-</sup>Т-клетках. Введение эндоморфина-1 не оказало существенного влияния на уровень поглощения этого субстрата в обеих субпопуляциях Т-лимфоцитов. Пролиферирующие В-лимфоциты, в отличие от покоящихся клеток, после введения эндоморфина-2 усиливали потребление глюкозы в присутствии LPS. Оба эндоморфина на потребление глюкозы в пролиферирующих CD4<sup>+</sup> и CD4<sup>-</sup>Т-клетках существенного влияния не оказали.

Таким образом, эндоморфин-1, в отличие от эндоморфина-2, не оказывает существенного влияния на метаболизм глюкозы в Т- и В-клетках. Принимая во внимание роль гликолиза в функционировании иммунных клеток и реализации воспаления, можно заключить, что применение эндоморфина-1 может быть сопряжено с меньшим риском возникновения побочных эффектов, связанных с иммунной системой.

*Ключевые слова:* эндоморфины, глюкоза, лимфоциты, опиоидные рецепторы

### **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:**

Sergei 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, Я.А. Кадочникова «Влияние эндоморфинов-1, 2 на особенности поглощения глюкозы Т- и В-лимфоцитами *in vivo*» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 197-202.  
doi: 10.46235/1028-7221-16627-IOE

© Гейн С.В., Кадочникова Я.А., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

S.V. Gein, Ya.A. Kadochnikova "Influence of endomorphins-1, 2 on glucose uptake by T and B lymphocytes *in vivo*", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 197-202.  
doi: 10.46235/1028-7221-16627-IOE

© Gein S.V., Kadochnikova Ya.A., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16627-IOE

## INFLUENCE OF ENDOMORPHINS-1, 2 ON GLUCOSE UPTAKE BY T AND B LYMPHOCYTES *IN VIVO*

Gein S.V.<sup>a, b</sup>, Kadochnikova Ya.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

**Abstract.** The main method of treating pain syndrome is the use of morphine and its analogues, which have a wide range of side effects. In this regard, many modern studies are aimed at finding safer analgesic compounds. Currently, among morphine analogues, much attention is paid to endogenous opioid peptides, which, along with an analgesic effect, have pronounced immunoregulatory properties. It is now known that the functional activity of immune cells is ensured by metabolism. This process supplies cells with the energy necessary for activation, differentiation, proliferation, apoptosis, etc. Glucose metabolism plays a key role in ensuring the functions of immune cells. The aim of this work is to evaluate the effect of endomorphins-1, 2 on the characteristics of glucose uptake by T and B lymphocytes *in vivo*. The subjects of the study were white male mice, peptides were administered to mice intraperitoneally at a dose of 100 µg/kg, and glucose uptake by cells was assessed using fluorescent analogues of glucose (2-NBDG). It was found that endomorphin-1 did not affect at the intensity of glucose consumption in both T and B cells. Administration of endomorphin-2, on the contrary, led to a significant increase in glucose uptake in T lymphocytes. However, the level of glucose consumption in B cells after administration of endomorphin-2 did not change significantly. In a study of two subsets of T lymphocytes, it was noted that endomorphin-2 leads to an increase in glucose uptake in both CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>T cells. Administration of endomorphin-1 had no significant effect on the level of uptake of this substrate in both subsets of T lymphocytes. Proliferating B lymphocytes increased glucose consumption in the presence of LPS after administration of endomorphin-2. Both endomorphins did not have a significant effect on glucose consumption in proliferating CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>T cells.

Thus, endomorphin-1, unlike endomorphin-2, does not have a significant effect on glucose metabolism in T and B cells. Taking into account the role of glycolysis in the functioning of immune cells and inflammation, it can be concluded that the use of endomorphin-1 may be associated with a lower risk of immune system-related side effects.

*Keywords: endomorphins, glucose, lymphocytes, opioid receptors*

Исследования проведены в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы 124021900006-5.

### Введение

Важной проблемой и предметом интенсивных исследований в современной медицине остается терапия боли [5, 10]. В настоящий момент основным способом лечения боли является введение пациентам морфина и его аналогов. Тем не менее продолжительное применение морфина может привести к развитию как физической, так и психологической зависимости, являющейся серьезным препятствием на пути обеспечения обезболивания [9, 12, 14]. Помимо этого, побочным эффектом применения морфина является подавление иммунного ответа и, следовательно, повышение уязвимости к инфекциям [11, 12]. В связи с этим многие современные исследования направлены на поиск более безопасных анальгезирующих соединений.

Среди аналогов морфина большое внимание уделяется соединениям эндогенного происхождения — эндогенным опиоидным пептидам.

Эти вещества проявляют анальгетическую активность, связываясь с опиоидными рецепторами, широко распространенными в центральной нервной системе. Эндоморфины относятся к семейству эндогенных опиоидных пептидов и представляют собой тетрапептиды, являющиеся высокоаффинными селективными агонистами  $\mu$ -рецептора. Благодаря своей структуре эндоморфины представляют собой потенциальный заменитель низкомолекулярных опиатов [8]. Данные соединения действуют подобно морфину, но, предположительно, подавляют боль без некоторых нежелательных побочных эффектов (таких как толерантность и зависимость), вызываемых растительными опиатами [7]. Благодаря этому, в литературе эндоморфины рассматривают как перспективные соединения для терапии боли [6, 8, 15].

Хотя применение эндоморфинов позволяет избежать многих нежелательных эффектов, связанных с приемом опиатов, последние исследования указывают на то, что данные соединения могут оказывать иммуномодулирующий эффект на организм [13]. Так, показано, что эндоморфины-1, 2 угнетают продукцию кислородных

радикалов в лейкоцитах периферической крови и перитонеальных макрофагах, а также увеличивают поглотительную активность нейтрофилов, моноцитов и лейкоцитов периферической крови *in vitro* [2]. Кроме того, данные пептиды стимулируют продукцию IL-1 $\beta$  в спонтанных культурах мононуклеаров периферической крови и снижают выработку IL-10 в стимулированных клетках [3]. Наконец, эндоморфины-1, 2 существенно усиливают антителогенез селезенки и повышают продукцию IL-17 *in vivo*, а также усиливают апоптоз CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов *in vitro* [4]. Несмотря на то, что в литературе представлено мало информации об исследовании иммунорегуляторных эффектов эндоморфинов, статей, посвященных изучению влияния данных пептидов на Т- и В-лимфоциты, практически нет.

В настоящий момент общепризнано, что функциональная активность иммунных клеток обеспечивается метаболизмом. Данный процесс снабжает клетки энергией, необходимой для активации, дифференцировки, пролиферации, апоптоза и др. Ключевую роль в обеспечении функций иммунных клеток играет метаболизм глюкозы [1]. Поскольку изменения метаболического статуса клеток тесно связано с иммунными процессами, в настоящей статье будет рассмотрено как иммуномодулирующее воздействие эндоморфинов способно влиять на изменение поглощения глюкозы лимфоцитами.

**Цель настоящей работы** – оценить влияние эндоморфинов-1, 2 на особенности поглощения глюкозы Т- и В-лимфоцитами *in vivo*.

## Материалы и методы

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям локального биоэтического комитета Института экологии и генетики микроорганизмов – филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН» (Пермь), IRB00010009.

Для изучения влияния эндоморфинов на метаболизм лимфоцитов животные были разделены на 3 группы: 1) контрольные мыши, которым был введен 0,9% раствор NaCl; 2) и 3) мыши, которым были введены эндоморфин-1 и эндоморфин-2 (Sigma, США), соответственно. Пептиды вводились мышам внутривентриально в дозе 100 мкг/кг. Через час после введения пептида, животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Выделенные селезенки гомогенизировали в 4 мл раствора Хенкса (ООО «БиолоТ», Россия), после чего спленоциты центрифугировали 10 мин при 300 g. К полученному осадку добавляли 1 мл полной питательной среды, которую готовили на основе среды RPMI

1640 (Gibco, Великобритания) с добавлением 10 мМ HEPES (Sigma, США), 2мМ Glutamax (Sigma-Aldrich, США), 100 ед/мл гентамицина (BioChemica, Германия), 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Capricorn Scientific, Германия) и 10  $\mu$ М 2-меркаптоэтанола (Gibco, США)).

Спленоциты культивировали в 24-луночных плоскодонных планшетах (Orange Scientific, Бельгия) в течение 96 часов при 37 °С в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток в 1 мл полной питательной среды. В качестве индуктора Т-лимфоцитов использовали конканавалин А (Concanavalin A (ConA), MP Biomedicals, Франция) в концентрации 10 мкг/мл. В-лимфоциты стимулировали липополисахаридом (Lipopolysaccharide (LPS), Serva, Франция) в концентрации 10 мкг/мл. По окончании инкубации производили сбор культур в эппендорфы. Образцы центрифугировали (1000 g, 3 мин) при комнатной температуре и ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко (Dulbecco's phosphate buffered saline – DPBS; Gibco, США) содержащем 0,5М этилендиаминтетрауксусной кислоты.

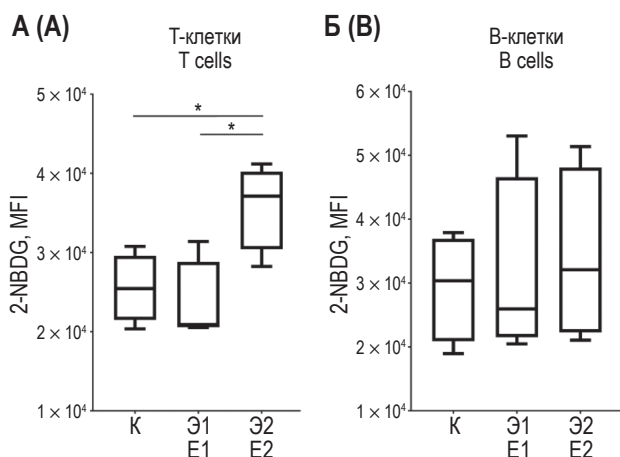
Анализ проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Жизнеспособные клетки определяли по отсутствию окрашивания 7-AAD (Beckman Coulter, США). При определении фенотипа клеток использовали анти-CD3-APC/Cy7, анти-CD19-APC и анти-CD4-PE антитела (BioLegend, США). Определяли Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup> Т-клетки (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>Т-клетки (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и В-лимфоциты (CD19<sup>+</sup>).

Поглощение глюкозы клетками оценивали с использованием флуоресцентных аналогов глюкозы (2-NBDG). Клетки, окрашенные поверхностными антителами, инкубировали в среде, содержащей 80 мкМ 2-NBDG (Abcam, Великобритания) при 37 °С в течение 15 мин. Затем двукратно вносили DPBS, содержащий 1% бычьего сывороточного альбумина (Bovine Serum Albumin – BSA; Sigma-Aldrich, США), и осаждали клетки центрифугированием (1000 g, 3 мин). Образцы ресуспендировали в 100 мкл DPBS и инкубировали в течение 5 мин при температуре +4 °С перед цитометрическим анализом.

Статистический анализ данных осуществляли в программе FlowJo v. 10.0 (FlowJo LLC, США) с использованием t-критерия Уэлча.

## Результаты и обсуждение

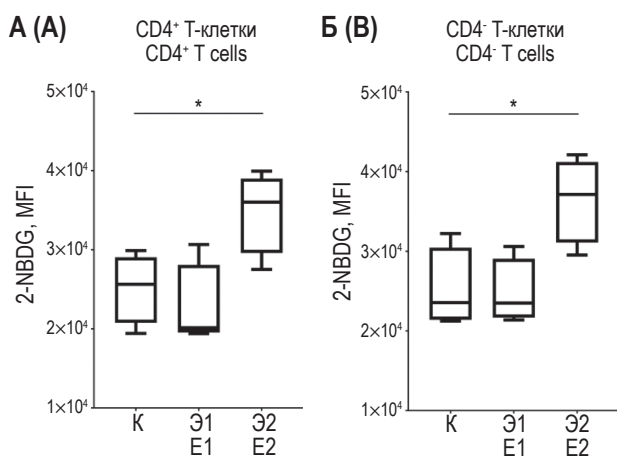
Анализ влияния эндоморфинов на потребление глюкозы в популяциях Т- и В-лимфоцитов мыши (рис. 1А, Б) показал следующее. Эндоморфин-1 не влиял на интенсивность потребления глюкозы как в Т-, так и в В-клетках. Введение животным эндоморфина-2, напротив, приводило к существенному усилению поглощения глюкозы в Т-лимфоцитах. При этом уровень потребления



**Рисунок 1.** Влияние эндоморфинов-1, 2 на потребление глюкозы в популяциях Т-лимфоцитов (А) и В-лимфоцитов (Б) мыши

Примечание. Горизонтальные линии внутри прямоугольников (медианы), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10-90% перцентили (вертикальные отрезки). \* –  $p < 0,05$ . MFI (Mean Fluorescence Intensity) – средняя интенсивность флуоресценции. К – контроль, Э1 – эндоморфин-1, Э2 – эндоморфин-2.

Figure 1. Effect of endomorphins-1, 2 on glucose uptake in populations of mouse T lymphocytes (A) and B lymphocytes (B)  
Note. Horizontal lines inside rectangles (medians), interquartile ranges (rectangles) and 10-90% percentiles (vertical segments). \*,  $p < 0,05$ . MFI (Mean Fluorescence Intensity), average fluorescence intensity. K, control, E1, endomorphin-1, E2, endomorphin-2.



**Рисунок 2.** Влияние эндоморфинов-1, 2 на потребление глюкозы CD4<sup>+</sup> (А) и CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитами (Б) мыши

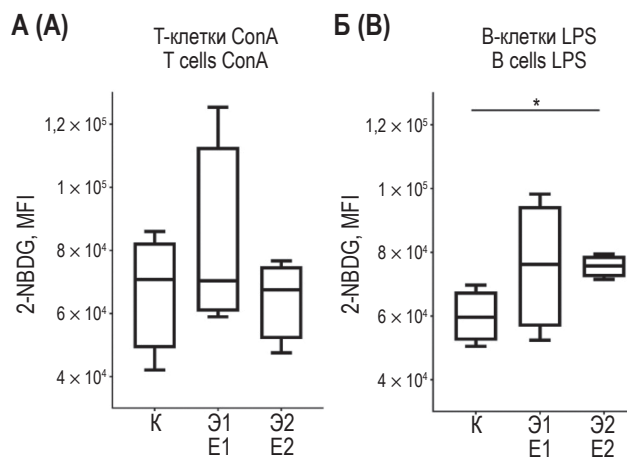
Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Effect of endomorphins-1, 2 on glucose uptake by mouse CD4<sup>+</sup> (A) and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (B)

Note. As for Figure 1.

глюкозы в В-клетках после введения эндоморфина-2 значительно не изменялся.

При исследовании двух субпопуляций Т-лимфоцитов было отмечено, что эндоморфин-2 приводит к увеличению потребления



**Рисунок 3.** Влияние эндоморфинов-1, 2 на потребление глюкозы в Т-лимфоцитах, стимулированных конканавалином А (А), и В-лимфоцитах, стимулированных LPS (Б)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Effect of endomorphins-1, 2 on glucose uptake in T lymphocytes stimulated with Con A (A) and B lymphocytes stimulated with LPS (B)

Note. As for Figure 1.

глюкозы как в CD4<sup>+</sup>, так и в CD4<sup>+</sup>Т-клетках (рис. 2А, Б). Введение эндоморфина-1 не оказало существенного влияния на уровень поглощения этого субстрата в обеих субпопуляциях Т-лимфоцитов.

Пролиферирующие В-лимфоциты, в отличие от покоящихся клеток, после введения эндоморфина-2 усиливали потребление глюкозы в присутствии LPS. Т-клетки, стимулированные ConA, напротив, не отличались по потреблению глюкозы у контрольных мышей и мышей с инъекцией эндоморфинов (рис. 3А).

При оценке влияния эндоморфинов на стимулированные ConA культуры Т-лимфоцитов было установлено, что оба эндоморфина не оказали существенного влияния на потребление глюкозы в пролиферирующих CD4<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>Т-клетках (рис. 4А, Б).

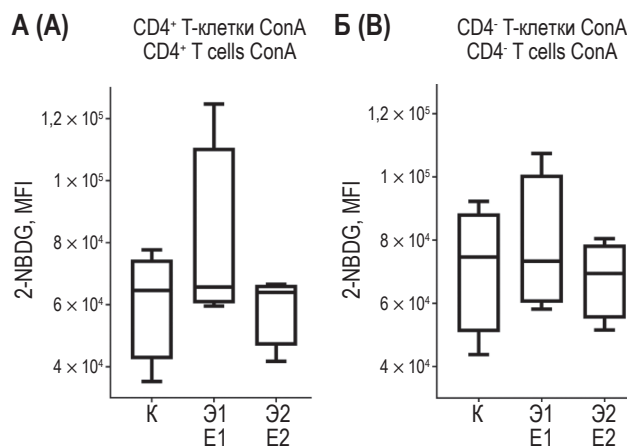
Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что эффект двух пептидов на метаболизм клеток адаптивного иммунитета проявлялся неодинаково. Эндоморфин-1 на потребление глюкозы существенного влияния не оказал, в то время как введение эндоморфина-2 существенно усиливало метаболизм глюкозы в покоящихся Т-лимфоцитах, а также LPS индуцированных В-лимфоцитах. Усиление метаболизма глюкозы в Т- и В-клетках нередко связывают с процессом активации и с усилением воспаления. Так, повышенное потребление глюкозы необходимо для синтеза провоспалительных цитокинов, продукции антител и т. д. Таким образом, можно предположить, что эндоморфин-2, усиливая метаболизм глюкозы, может способствовать приобретению клетками более провоспалительного

фенотипа. Эти данные согласуются с ранее полученными результатами. Так, нами было показано, что эндоморфины-1, 2 стимулируют синтез провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  в спонтанных культурах мононуклеаров периферической крови и IL-17 спленоцитами. При этом продукция IL-10 в стимулированных культурах мононуклеаров периферической крови под действием эндоморфинов снижалась. Также эндоморфины существенно усиливали антителогенез селезенки [3]. При этом эффект эндоморфина-2 во всех проведенных экспериментах проявлял свои эффекты более выражено, по сравнению с эндоморфином-1.

Возможно, эндоморфин-2 в большей мере оказывает провоспалительное действие на адаптивный иммунитет по той причине, что данный пептид способен стимулировать T- и B-клеточный метаболизм.

## Заключение

Таким образом, из вышесказанного следует, что если рассматривать эндоморфины как перспективные соединения, применяемые в терапии боли, необходимо учитывать их иммуномодулирующее воздействие на организм. Настоящее исследование показало, что эндоморфин-1, в отличие от эндоморфина-2, не оказывает существенного влияния на метаболизм глюкозы в T- и B-клетках. Принимая во внимание роль глико-



**Рисунок 4.** Влияние эндоморфинов-1, 2 на потребление глюкозы CD4<sup>+</sup> (А) и CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитами (Б), стимулированными конканавалином А

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 4. Effect of endomorphins-1, 2 on glucose uptake by Con A stimulated mouse CD4<sup>+</sup> (A) and CD4<sup>+</sup>T lymphocytes (B)

Note. As for Figure 1.

лиза в функционировании иммунных клеток и реализации воспаления, можно заключить, что применение эндоморфина-1 может быть сопряжено с меньшим риском возникновения побочных эффектов, связанных с иммунной системой.

## Список литературы / References

1. Власова В.В., Шмагель К.В. Метаболические свойства Т-лимфоцитов и методы их регуляции (обзор) // Биохимия, 2023. Т. 88, № 11, С.2251-2270. [Vlasova V.V., Shmagel K.V. T-lymphocyte metabolic features and techniques to modulate them (review). *Biokhimiya = Biochemistry*, 2023, Vol. 88, no. 11, pp. 2251-2270. (In Russ.)]
2. Гейн С.В., Баева Т.А. Эндоморфины: структура, локализация, иммунорегуляторная активность // Проблемы эндокринологии, 2020. Т. 66, № 1. С. 78-86. [Gein S.V., Baeva T.A. Endomorphins: structure, localization, immunoregulatory activity. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2020, Vol. 66, no. 1, pp. 78-86. (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. 646-651. (In Russ.)]
4. Кадочникова Я.А., Гейн С.В. Влияние эндоморфинов на гуморальный иммунный ответ, продукцию Th1/Th2/Th17-цитокинов и апоптоз CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> лимфоцитов *in vivo* // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 3. С. 545-550. [Kadochnikova Y.A., Gein S.V. Effect of endomorphins on humoral immune response, TH1/TH2/TH17 cytokine production and CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> lymphocyte apoptosis *in vivo*. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 3, pp. 545-550. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-EOE-2783.
5. Bodnar R.J. Endogenous opiates and behavior. *Peptides*, 2010, Vol. 31, pp. 2325-2359.
6. Horvath G. Endomorphin-1 and endomorphin-2: pharmacology of the selective endogenous  $\mu$ -opioid receptor agonists. *Pharmacol Ther.*, 2000, Vol. 88, no. 3, pp. 437-463.
7. Janecka A., Staniszevska R., Fichna J. Endomorphin analogs. *Curr. Med. Chem.*, 2007, Vol. 14, № 30, pp. 3201-3208.
8. Keresztes A., Borics A., Tóth G. Recent advances in endomorphin engineering. *Chem. Med. Chem.*, 2010, Vol. 5, no. 8, pp. 1176-1196.
9. Kimmey B.A., McCall N.M., Wooldridge L.M., Satterthwaite T.D., Corder G. Engaging endogenous opioid circuits in pain affective processes. *J. Neurosci. Res.*, 2022, Vol. 100, no. 1, pp. 66-98.
10. Liu X., Wang Y., Xing Y., Yu J., Ji H., Kai M., Wang Z., Wang D., Zhang Y., Zhao D., Wang R. Design, synthesis, and pharmacological characterization of novel endomorphin-1 analogues as extremely potent  $\mu$ -opioid agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, Vol. 56, no. 7, pp. 3102-3114.

11. Ofoegbu A., Ettienne E.B. Pharmacogenomics and morphine. *J. Clin. Pharmacol.*, 2021, Vol. 61, no. 9, pp. 1149-1155.
12. Plein L.M., Rittner H.L. Opioids and the immune system – friend or foe. *Br. J. Pharmacol.*, 2017, Vol. 175, no. 14, pp. 2717-2725.
13. Pomorska D.K., Gach K., Janecka A. Immunomodulatory effects of endogenous and synthetic peptides activating opioid receptors. *Med. Chem.*, 2014, Vol. 14, pp. 1148-1155.
14. Rivero G., Llorente J., McPherson J., Cooke A., Mundell S.J., McArdle C.A., Rosethorne E.M., Charlton S.J., Krasel C., Bailey C.P., Henderson G., Kelly E. Endomorphin-2: A biased agonist at the  $\mu$ -opioid receptor. *Mol. Pharmacol.*, 2012, Vol. 82, no. 2, pp. 178-188.
15. Zadina J.E., Nilges M.R., Morgenweck J., Zhang X., Hackler L., Fasold M.B. Endomorphin analog analgesics with reduced abuse liability, respiratory depression, motor impairment, tolerance, and glial activation. *Neuropharmacology*, 2016, Vol. 105, pp. 215-227.

---

**Авторы:**

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

**Кадочникова Я.А.** – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

**Authors:**

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

**Kadochnikova Ya.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

---

Поступила 22.03.2024  
Отправлена на доработку 24.03.2024  
Принята к печати 25.03.2024

Received 22.03.2024  
Revision received 24.03.2024  
Accepted 25.03.2024



## МЕХАНИЗМЫ ROR $\alpha$ -ЗАВИСИМЫХ ЭФФЕКТОВ МЕЛАТОНИНА

Куклина Е.М.

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

**Резюме.** Транскрипционному фактору ROR $\alpha$  традиционно не приписывали принципиальной роли в развитии клеток Th17, однако недавними исследованиями показано, что он необходим для формирования патогенного варианта клеток Th17 – так называемых Th1-поляризованных Th17 (Th17.1). Поскольку транскрипционная активность ROR $\alpha$  зависит от связывания лиганда, высокую актуальность имеет поиск таких лигандов, и в этой связи особый интерес представляет мелатонин – вопрос о способности ROR $\alpha$  напрямую связывать мелатонин на сегодняшний день остается открытым, данные по этой проблеме крайне противоречивы. В 1995 г. I. Wiesenberg с коллегами идентифицировали ROR $\alpha$  как ядерный рецептор для мелатонина, продемонстрировав способность гормона усиливать связывание данного фактора с ДНК и определив с помощью классического скэтчардовского анализа константу диссоциации для взаимодействия ROR $\alpha$  с мелатонином. В 2011 г. P.J. Lardone с коллегами «перепроверили» ROR $\alpha$  как рецептор для мелатонина, продемонстрировав копреципитацию мелатонина с ROR $\alpha$ . А в 2016 г. A.J. Slominski и соавт. опубликовали статью, которая поставила под сомнение возможность связывания мелатонина с ROR $\alpha$  – исходя из данных молекулярного моделирования лиганд-рецепторных взаимодействий, подкрепленных функциональными исследованиями. Однако внимательный анализ этих данных указывает на неоднозначность такого вывода, позволяя говорить, скорее, о средней или низкой аффинности связывания гормона с ROR $\alpha$ , но не о его отсутствии. В пользу этого заключения говорит и тот факт, что ROR $\alpha$  опосредует многие эффекты мелатонина – как физиологические, так и фармакологические, включая регуляцию циркадных ритмов и окислительного метаболизма, нейро- и кардиопротекцию, а также контроль иммунного ответа. В целом, имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют рассматривать транскрипционный фактор ROR $\alpha$  как рецептор для мелатонина со средней аффинностью, хотя не исключена и непрякая регуляция этого фактора гормоном, и ROR $\alpha$ -зависимые механизмы должны вносить вклад в ответ клеток на мелатонин как в физиологических условиях, так и в случае фармакологического применения гормона.

**Ключевые слова:** мелатонин, ROR $\alpha$ , T-хелперы, Th17, Th17.1, лиганд-рецепторные взаимодействия, MT1, MT2

## MECHANISMS OF ROR $\alpha$ -DEPENDENT EFFECTS OF MELATONIN

Kuklina E.M.

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

**Abstract.** The transcription factor ROR $\alpha$  has not traditionally been attributed a fundamental role in the development of Th17 cells, but recent studies have shown that it is necessary for the formation of a pathogenic

### Адрес для переписки:

Куклина Елена Михайловна  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения Российской академии наук  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (902) 472-56-95.  
E-mail: ibis\_07@mail.ru

### Address for correspondence:

Elena M. Kuklina  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms  
13 Golev St  
Perm  
614081 Russian Federation  
Phone: +7 (902) 472-56-95.  
E-mail: ibis\_07@mail.ru

### Образец цитирования:

Е.М. Куклина «Механизмы ROR $\alpha$ -зависимых эффектов мелатонина» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 203–206.  
doi: 10.46235/1028-7221-16625-MOR

© Куклина Е.М., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

E.M. Kuklina “Mechanisms of ROR $\alpha$ -dependent effects of melatonin”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 203–206.  
doi: 10.46235/1028-7221-16625-MOR

© Kuklina E.M., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16625-MOR

variant of Th17 cells, the so-called Th1-polarized Th17 (Th17.1). Since the transcriptional activity of ROR $\alpha$  depends on ligand binding, the search for such ligands is highly relevant, and in this regard, melatonin is of particular interest. The question of the ability of ROR $\alpha$  to directly bind melatonin remains open today; data on this problem are extremely contradictory. In 1995, I. Wiesenberg and colleagues identified ROR $\alpha$  as a nuclear receptor for melatonin, demonstrating the hormone's ability to enhance the binding of this factor to DNA and determining the dissociation constant for the interaction of ROR $\alpha$  with melatonin using classical Scatchard analysis. In 2011, P.J. Lardone and colleagues "rediscovered" ROR $\alpha$  as a receptor for melatonin by demonstrating the coprecipitation of melatonin with ROR $\alpha$ . And in 2016, A.J. Slominski and colleagues published a paper that cast doubt on the possibility of melatonin binding to ROR $\alpha$  based on molecular modeling of ligand-receptor interactions supported by functional studies. However, a careful analysis of these data indicates the ambiguity of this conclusion, allowing us to speak, rather, of medium or low binding affinity of the hormone to ROR $\alpha$ , but not of its absence. This conclusion is also supported by the fact that ROR $\alpha$  mediates many of the effects of melatonin, both physiological and pharmacological, including the regulation of circadian rhythms and oxidative metabolism, neuro- and cardioprotection, and control of the immune response. In general, the data available today allow us to consider the transcription factor ROR $\alpha$  as a receptor for melatonin with medium affinity, although indirect regulation of this factor by the hormone is not excluded, and ROR $\alpha$ -dependent mechanisms should contribute to the cellular response to melatonin, both under physiological conditions and in the case of pharmacological use of the hormone.

*Keywords: melatonin, ROR $\alpha$ , T helper cells, Th17, Th17.1, ligand-receptor interactions, MT1, MT2*

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 124020500027-7.

## Введение

ROR $\alpha$  — ядерный орфанный рецептор, родственный рецепторам ретиноевой кислоты, член суперсемейства стероид/тиреоидных рецепторов. Это лиганд-зависимый транскрипционный фактор: в ответ на связывание эндогенного или экзогенного лиганда он изменяет конформацию, ассоциирует с коактиватором или корепрессором и, соответственно, стимулирует или подавляет транскрипцию генов-мишеней. ROR $\alpha$  широко экспрессирован в тканях организма, включая скелетные мышцы, яички, клетки Пуркинье в мозжечке, сетчатку. В иммунной системе экспрессия этого фактора ограничивается преимущественно Т-хелперной популяцией Th17, для которой ROR $\alpha$  является одним из двух ключевых факторов дифференцировки, наряду с ROR $\gamma$ t [14]. Функции ROR $\alpha$  и ROR $\gamma$ t в развитии Th17 частично перекрываются: оба фактора индуцируют транскрипцию ключевых Th17-ассоциированных факторов, включая IL-17A, IL-23R, CCL20 and CCR6, что подтверждается и наличием Th17-зависимого ответа у животных с дефицитными по ROR $\alpha$  Т-лимфоцитами, хотя этот ответ и снижен [14]. Поэтому экспрессию ROR $\alpha$  в клетках Th17 традиционно считали необязательной, «дополнительной». Однако недавними исследованиями показано, что ROR $\alpha$  играет принципиальную роль в этом процессе: он необходим для развития патогенного варианта клеток Th17 — так называемых Th1-поляризованных Th17 (Th17.1), коэкспрессирующих Th1-ассоциированный транскрипционный фактор T-bet и копродукци-

рующих наряду с IL-17 Th1-зависимый IFN $\gamma$ , а также GM-CSF [5]. Учитывая, что транскрипционная активность ROR $\alpha$  зависит от связывания лиганда, высокую актуальность приобретает вопрос о регуляции данного фактора, и в этой связи особый интерес представляет мелатонин — вопрос о способности ROR $\alpha$  напрямую связывать мелатонин на сегодняшний день остается открытым, данные по этой проблеме крайне противоречивы. Между тем, внимательный анализ этих данных позволяет разрешить эти противоречия, что и является задачей данной работы.

## Материалы и методы

Поиск литературы о ROR-зависимых эффектах мелатонина в Т-лимфоцитах и нелимфоидных клетках проводился в базе данных PubMed с использованием соответствующих ключевых слов, без ограничения по языку и дате публикаций.

## Результаты и обсуждение

Способность мелатонина проникать сквозь клеточную мембрану и неоднократная демонстрация его присутствия в ядре, в частности, в ядерных фракциях тимоцитов и спленоцитов крысы, еще тридцать лет назад инициировали поиск ядерных рецепторов для гормона. В 1995 г. I. Wiesenberg с коллегами идентифицировали ROR $\alpha$  как ядерный рецептор для мелатонина [13], продемонстрировав способность гормона усиливать связывание данного фактора с ДНК и определив с помощью классического скэтчардовского анализа константу диссоциации для взаимодействия ROR $\alpha$  с мелатонином ( $K_d = 1,71$  nM). Строго говоря, данный эффект был показан для сплайсинг-варианта ROR $\alpha$ 1, но, согласно сик-

венс-анализу, лиганд-связывающие домены всех вариантов рецептора идентичны. Поэтому данные, полученные для ROR $\alpha$ 1, можно отнести и к другим вариантам ROR $\alpha$  – ROR $\alpha$ 2, ROR $\alpha$ 3 и ROR $\alpha$ 4 [13]. В 2011 г. P.J. Lardone с коллегами «переоткрыли» ROR $\alpha$  как рецептор для мелатонина [9], показав на Т-лимфоцитарной линии Jurkat, что мелатонин копреципитируется (иммуноблоттинг) и колокализуется с ROR $\alpha$  (иммунофлуоресцентный анализ), а также в наномолярных концентрациях вызывает перераспределение ROR $\alpha$  внутри клетки, регистрируемое с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии [9], что, хоть и косвенно, но убедительно указывает на взаимодействие гормона с ROR $\alpha$ .

В 2016 г. вышла статья А.А. Slominski и соавт. под названием “ROR $\alpha$  is not a receptor for melatonin”. Фактически, это комментарий, в котором автор обращает внимание на свою недавнюю работу [12], не выявившую взаимодействия мелатонина с ROR $\alpha$  с помощью молекулярного моделирования лиганд-рецепторных взаимодействий, а также функционального анализа способности мелатонина напрямую регулировать ROR $\alpha$  [12]. Однако внимательный анализ представленных в работе данных указывает на неоднозначность такого вывода, и прежде всего это относится к результатам молекулярного докинга, в котором на основе данных о кристаллической структуре лиганд-связывающего домена ROR $\alpha$  определялась конформация его связывания с лигандами (в том числе с мелатонином) и оценивалась потенциальная энергия такого взаимодействия. Во-первых, молекулярный докинг – это виртуальный анализ, и несмотря на довольно высокую точность, он рассматривается исключительно как инструмент предварительного скрининга, результаты которого требуют последующего экспериментального подтверждения. Во-вторых, по результатам молекулярного докинга, потенциальная энергия взаимодействия мелатонина с лиганд-связывающим доменом ROR $\alpha$  составляет –6,67 ккал/М [12], что позволяет говорить о среднем или низком родстве мелатонина к ROR $\alpha$ , но не о его отсутствии. И этот результат не противоречит полученным ранее экспериментальным данным, согласно которым аффинность связывания мелатонина с ROR $\alpha$  в 5–20 раз ниже таковой для его взаимодействия с классическими мембранными рецепторами, MT1 (Kd = 80,7 pM) и MT2 (Kd = 383 pM) [8]. Что касается функционального теста, использованного в работе, он был сконструирован специально для оценки активности антагонистов ROR: это вариант люциферазного репортерного анализа в клеточной системе с доксициклин-индуцируемой стабильной экспрессией ROR $\alpha$  – последнюю фиксировали по активности репортера, работающего под контролем RORE, в присутствии потенциальных ан-

тагонистов. Мелатонин в такой системе не оказывал значимого влияния на активность ROR $\alpha$ . Однако важно отметить, что в большинстве исследований мелатонин выступает в роли не антагониста, а агониста: он усиливает транскрипционную активность ROR $\alpha$  [7, 9, 13]. А оценка действия потенциального активатора ROR $\alpha$  в условиях изначальной интенсивной активации этого фактора малоинформативна. По крайней мере отсутствие эффектов мелатонина в данной системе не исключает способности гормона самостоятельно индуцировать или усиливать транскрипционную активность ROR $\alpha$ . Кроме того, мелатонин в функциональных тестах использован в микромолярных концентрациях, в которых он неспецифически взаимодействует со многими внутриклеточными мишенями, такими как кальмодулин или глутатион трансфераза, и действие гормона, опосредуемое этими мишенями, может просто перекрывать его ROR $\alpha$ -зависимые эффекты. В связи с вышесказанным, на сегодняшний день нет веских оснований исключать ROR $\alpha$  из состава мелатониновых рецепторов.

В пользу этого заключения говорит и тот факт, что ROR $\alpha$  опосредует многие важные эффекты мелатонина – как физиологические, так и фармакологические, включая регуляцию циркадных ритмов [10] и окислительного метаболизма [2, 6], нейро- и кардиопротекцию [6, 15], стимуляцию дифференцировки одонтобластов [7], а также контроль иммунного ответа [3, 4]. Эффекты мелатонина в этих исследованиях отменялись полностью или частично на фоне блокады ROR $\alpha$  *in vitro* [2, 4, 7] и *in vivo* [3, 10], тогда как блокада мембранных мелатониновых рецепторов (MT1/MT2) в аналогичных условиях не изменяла действия мелатонина. Следует, однако, отметить, что описанные выше эффекты, теоретически, могут быть результатом не прямого связывания мелатонина с ROR $\alpha$ , а опосредованного – в качестве такого посредника может выступать, например, сиртуин 1 (SIRT1), что показано в целом ряде работ [11]. Кроме того, имеется немало данных о посттрансляционных модификациях, модулирующих активность ROR $\alpha$  – так, он может фосфорилироваться протеинкиназой А (PKA) по Ser99 или протеинкиназой ERK2 по Thr128, что существенно усиливает транскрипционную активность данного фактора. Сумоилирование ROR $\alpha$ , т. е. ковалентное присоединение к остаткам лизинов малых убиквитин-подобных модифицирующих белков (SUMO), также приводит к его активации.

В целом имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют рассматривать транскрипционный фактор ROR $\alpha$  как рецептор для мелатонина со средней аффинностью, хотя не исключена и непрякая регуляция этого фактора гормоном, и ROR $\alpha$ -зависимые механизмы должны вносить

вклад в ответ клеток на мелатонин как в физиологических условиях, так и в случае фармакологического применения гормона.

## Заключение

В заключении следует отметить недавнюю работу N. Fang и соавт., демонстрирующую способность мелатонина напрямую взаимодействовать

с лиганд-связывающим доменом рецептора витамина D (VDR), также ядерного рецептора [1]. И хотя константа диссоциации для такого связывания ( $K_d$   $21,2 \pm 1,9$  мкМ) указывает на его низкую аффинность, авторы отмечают, что эти данные вновь открывают дискуссию о возможном существовании ядерных мишеней для мелатонина.

## Список литературы / References

1. Fang N., Chunyi H., Wenqi S., Ying X., Yeqi G., Le W., Qing P., Russel J. R., Lifeng L. Identification of a novel melatonin-binding nuclear receptor: Vitamin D receptor. *J. Pineal Res.*, 2018, Vol. 68, no. 1, e12618. doi.org/10.1111/jpi.12618.
2. Fang Y., Zhang J., Li Y., Guo X., Li J., Zhong R., Zhang X. Melatonin-induced demethylation of antioxidant genes increases antioxidant capacity through ROR $\alpha$  in cumulus cells of prepubertal lambs. *Free Radical Biol. Med.*, 2019, Vol. 131, pp. 173-183.
3. García J.A., Volt H., Venegas C., Doerrier C., Escames G., López L.C., Acuña-Castroviejo D. Disruption of the NF- $\kappa$ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor- $\alpha$  and blocks the septic response in mice. *FASEB J.*, 2015, Vol. 29, pp. 3863-3875.
4. Glebezdina N.S., Nekrasova I.V., Olina A.A., Sadykova G.K., Kuklina E.M. Differentiation of T cells producing interleukin-17 (Th17) against the background of exogenous melatonin during pregnancy. *J. Pineal Res.*, 2023, Vol. 75, e12904. doi:10.1111/jpi.12904.
5. Hall J.A., Pokrovskii M., Kroehling L., Kim B.R., Kim S.Y., Wu L., Lee J.Y., Littman D.R. Transcription factor ROR $\alpha$  enforces stability of the Th17 cell effector program by binding to a Rorc cis-regulatory element. *Immunity*, 2022, Vol. 55, no. 11, pp. 2027-2043.
6. He B., Zhao Y., Xu L., Gao L., Su Y., Lin N., Pu J. The nuclear melatonin receptor ROR $\alpha$  is a novel endogenous defender against myocardial ischemia/reperfusion injury. *J. Pineal Res.*, 2016, Vol. 60, pp. 313-326.
7. Kang J., Chen H., Zhang F., Yan T., Fan W., Jiang L., He H., Huang F. ROR $\alpha$  regulates odontoblastic differentiation and mediates the pro-odontogenic effect of melatonin on dental papilla cells. *Molecules*, 2021, Vol. 26, 1098. doi: 10.3390/molecules26041098.
8. Kato K., Hirai K., Nishiyama K., Uchikawa O., Fukatsu K., Ohkawa S., Kawamata Y., Hinuma S., Miyamoto M. Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. *Neuropharmacology*, 2005, Vol. 48, no. 2, pp. 301-310.
9. Lardone P.J., Guerrero J.M., Fernández-Santos J.M., Rubio A., Martín-Lacave I., Carrillo-Vico A. Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *J. Pineal Res.*, 2011, Vol. 51, pp. 454-462.
10. Sato T.K., Panda S., Miraglia L.J., Reyes T.M., Rudic R.D., McNamara P., Naik K.A., FitzGerald G.A., Kay S.A., Hogenesch J.B. A functional genomics strategy reveals rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 2004, Vol. 43, pp. 527-537.
11. Shah S.A., Khan M., Jo M.H., Jo M.G., Amin F.U., Kim M.O. Melatonin stimulates the SIRT1/Nrf2 signaling pathway counteracting lipopolysaccharide (LPS)-induced oxidative stress to rescue postnatal rat brain. *CNS Neurosci. Ther.*, 2017, Vol. 23, pp. 33-44.
12. Slominski A.T., Kim T.K., Takeda Y., Janjetovic Z., Brozyna A.A., Skobowiat C., Wang J., Postlethwaite A., Li W., Tuckey R.C. ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$  are expressed in human skin and serve as receptors for endogenously produced noncalcemic 20-hydroxy- and 20,23-dihydroxyvitamin D. *FASEB J.*, 2014, Vol. 28, pp. 2775-2789.
13. Wiesenberg I., Missbach M., Kahlen J.P., Schröder M., Carlberg C. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.*, 1995, Vol. 23, pp. 327-333.
14. Yang X.O., Pappu B.P., Nurieva R., Akimzhanov A., Kang H.S., Chung Y., Ma L., Shah B., Panopoulos A.D., Schluns K.S., Watowich S.S., Tian Q., Jetten A.M., Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*, 2008, Vol. 28, pp. 29-39.
15. Zang M., Zhao Y., Gao L., Zhong F., Qin Z., Tong R., Ai L., Petersen L., Yan Y., Gao Y. The circadian nuclear receptor ROR $\alpha$  negatively regulates cerebral ischemia-reperfusion injury and mediates the neuroprotective effects of melatonin. *BBA Mol. Basis Dis.*, 2020, Vol. 1866, 165890. doi: 10.1016/j.bbdis.2020.165890.

### Автор:

**Куклина Е.М.** – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

### Author:

**Kuklina E.M.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 22.03.2024

Отправлена на доработку 24.03.2024

Принята к печати 31.03.2024

Received 22.03.2024

Revision received 24.03.2024

Accepted 31.03.2024

# ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ CD4<sup>+</sup>T-ЛИМФОЦИТОВ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ

**Королевская Л.Б., Шмагель К.В.**

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

**Резюме.** Пул циркулирующих в периферической крови CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов неоднороден и включает в себя наивные элементы, клетки центральной и эффекторной памяти, терминально-дифференцированные эффекторы. Каждая из субпопуляций выполняет различные функции и обладает уникальными метаболическими свойствами. Митохондрии являются жизненно важными органеллами CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов, которые связаны с метаболизмом, производством энергии, продукцией активных форм кислорода, клеточным дыханием, пролиферацией, дифференцировкой и апоптозом. Использование митохондриально-селективных флуоресцентных красителей совместно с мечеными моноклональными антителами является относительно доступным и простым способом оценки ряда параметров митохондрий в CD4<sup>+</sup>T-клетках различной степени зрелости методом проточной цитометрии. Целью данной работы было исследование показателей состояния митохондрий в различных субпопуляциях CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов. Объектом исследования служили мононуклеарные клетки, полученные из периферической крови девяти относительно здоровых добровольцев. Методом проточной цитометрии с использованием коммерческих флуоресцентных красителей MitoTracker Green FM и MitoTracker Deep Red FM были определены, соответственно, масса и заряд мембраны митохондрий в общем пуле CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов и в субпопуляциях клеток: наивных (CD45R0<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), центральной памяти (CD45R0<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), эффекторной памяти (CD45R0<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) и терминально-дифференцированных эффекторах (CD45R0<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>). Показано, что у здоровых лиц CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты центральной и эффекторной памяти по сравнению с наивными клетками обладают более высокой массой и величиной мембранного потенциала митохондрий. Масса органелл в функционально различных субпопуляциях CD4<sup>+</sup>T-клеток памяти существенно отличается: снижена в лимфоцитах центральной памяти относительно таковой в клетках эффекторной памяти. При этом обе субпопуляции клеток памяти не различаются между собой величиной заряда мембраны митохондрий. Терминально-дифференцированные эффекторы отличаются от остальных субпопуляций CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов уникальными характеристиками митохондрий: при высокой массе обладают сниженным зарядом мембраны. Данная особенность может быть связана с «готовностью» клеток, находящихся на терминальной стадии дифференцировки, к программируемой гибели.

*Ключевые слова:* масса митохондрий, мембранный потенциал митохондрий, CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты, наивные клетки, клетки памяти, терминально-дифференцированные элементы, проточная цитометрия

## Адрес для переписки:

Королевская Лариса Борисовна  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (342) 280-83-34.  
Факс: 8 (342) 280-92-11.  
E-mail: bioqueen@mail.ru

## Address for correspondence:

Larisa B. Korolevskaya  
Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms  
13 Golev St  
Perm  
614081 Russian Federation  
Phone: +7 (342) 280-83-34.  
Fax: +7 (342) 280-92-11.  
E-mail: bioqueen@mail.ru

## Образец цитирования:

Л.Б. Королевская, К.В. Шмагель «Особенности состояния митохондрий CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов различных субпопуляций» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 207-212.  
doi: 10.46235/1028-7221-16589-FOM

© Королевская Л.Б., Шмагель К.В., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

L.B. Korolevskaya, K.V. Shmagel "Features of mitochondrial state in CD4<sup>+</sup>T lymphocyte subsets", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 207-212.  
doi: 10.46235/1028-7221-16589-FOM

© Korolevskaya L.B., Shmagel K.V., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16589-FOM

## FEATURES OF MITOCHONDRIAL STATE IN CD4<sup>+</sup>T LYMPHOCYTE SUBSETS

Korolevskaya L.B., Shmagel K.V.

*Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

**Abstract.** Peripheral blood CD4<sup>+</sup>T lymphocytes are heterogenous, including naive, central memory, effector memory, and terminally differentiated effector cells. Each subset performs different functions and possesses unique metabolic properties. Mitochondria are vital organelles of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes, playing critical roles in metabolism, energy and active oxygen species production, cellular respiration, proliferation, differentiation, and apoptosis. The use of mitochondrial-selective fluorescent dyes in combination with labeled monoclonal antibodies is a relatively accessible and simple way to study a range of mitochondrial parameters in CD4<sup>+</sup>T cells of varying maturity by flow cytometry. The aim of this study was to investigate mitochondrial indices in different CD4<sup>+</sup>T lymphocyte subsets. We obtained mononuclear cells from peripheral blood of nine relatively healthy volunteers. By flow cytometry using commercial fluorescent dyes MitoTracker Green FM and MitoTracker Deep Red FM, we determined the mass and membrane potential of mitochondria in the total pool of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes and in their subsets: naive (CD45R0<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), central memory (CD45R0<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), effector memory (CD45R0<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>), and terminally differentiated effectors (CD45R0<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>). We show that in healthy individuals, central and effector memory CD4<sup>+</sup>T lymphocytes compared to naive cells have increased mitochondrial mass and membrane potential. The mass of organelles in functionally different memory CD4<sup>+</sup>T cell subsets vary significantly: it is lower in central memory lymphocytes than in effector memory cells. Nevertheless, two subsets have similar mitochondrial membrane potential. Terminally differentiated effectors differ from other CD4<sup>+</sup>T lymphocyte subsets in unique characteristics of mitochondria: despite high mass, they have a reduced membrane potential. This feature may be linked to cells being prepared for programmed cell death during the terminal differentiation stage.

*Keywords: mitochondrial mass, mitochondrial membrane potential, CD4<sup>+</sup>T lymphocytes, naïve cells, memory cells, terminally differentiated effector cells, flow cytometry*

Работа выполнена в рамках государственного задания «Изучение механизмов регуляции клеток иммунной системы и разработка методов их оценки в норме и патологии» (номер гос. регистрации 124020500027-7).

### Введение

CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты являются ключевыми координаторами адаптивного иммунного ответа. Пул циркулирующих в периферической крови CD4<sup>+</sup>T-клеток неоднороден и на основе экспрессии одной из изоформ общего лейкоцитарного антигена CD45 (CD45RA или CD45R0) и наличия хемокинового рецептора CCR7 может быть разделен на четыре субпопуляции [11]. Наивные лимфоциты экспрессируют высокие уровни CD45RA и CCR7 (CD45RA<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>). Приобретение клетками фенотипа памяти приводит к потере экспрессии CD45RA в лимфоцитах центральной памяти (CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) и дальнейшей утрате экспрессии молекул CCR7 в клетках эффекторной памяти (CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>). Часть CCR7-негативных лимфоцитов восстанавливает экспрессию молекул CD45RA и относится к пулу терминально-дифференцированных клеток (CD45RA<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>). Каждая из субпопуляций CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов выполняет различные функции и обладает уникальными метаболическими свойствами [10].

Митохондрии являются жизненно важными органеллами CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов, которые связаны с метаболизмом, продукцией энергии, клеточным дыханием, пролиферацией, дифференцировкой и апоптозом [2]. Адаптация митохондрий к потребностям клетки реализуется через модификацию формы и размера органелл [2, 4], что сопровождается изменением их массы и числа в клетке. Еще одним важным показателем функционального состояния митохондрий является заряд их мембраны. Митохондриальный мембранный потенциал возникает в результате окислительно-восстановительных реакций, связанных с активностью цикла Кребса, и служит промежуточной формой хранения энергии, которая в дальнейшем используется для синтеза аденозинтрифосфата (АТФ) [2]. Ранее мы показали, что у здоровых субъектов масса и заряд митохондрий CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов, позитивных и негативных по экспрессии молекул CD45RA, существенно различается [1].

**Целью настоящей работы** была оценка состояния митохондрий в различных субпопуляциях CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов.

### Материалы и методы

Объектом исследования были мононуклеарные клетки, полученные из периферической крови относительно здоровых добровольцев (n = 9). Каждый обследованный подписал согласие на участие

в исследовании, проведение которого было одобрено этическим комитетом (рег. № IRB00008964). Забор крови проводили в вакуумные пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (Weihai Hongyu Medical Devices Co Ltd, Китай). Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования двукратно разведенной крови (раствор фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS), Gibco, США) в градиенте плотности Диаколла (1,077, ООО «Диаэм», Россия). Выделенные клетки после двукратного отмывания в растворе DPBS помещали в термоинактивированную эмбриональную телячью сыворотку (Biowest, Колумбия), содержащую 10% диметилсульфоксида (AppliChem, Германия), и подвергали контролируемому замораживанию в жидком азоте. Перед проведением исследования клетки размораживали.

Идентификацию жизнеспособных субпопуляций T-лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных анти-CD3-BV605, анти-CD4-PE, анти-CCR7-PE/Cy7 (BioLegend, США), анти-CD45R0-APC-eFluor™780 антител (Thermo Fisher Scientific, США) и витального красителя Zombie UV Fixable Viability Kit (BioLegend, США). Среди CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов выявляли наивные клетки (CD45R0<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), клетки центральной (CD45R0<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) и эффекторной (CD45R0<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) памяти, а также терминально-дифференцированные эффекторы (CD45R0<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>). Митохондриально-селективные флуоресцентные красители MitoTracker Green FM и MitoTracker™ Deep Red FM (Invitrogen, США) были применены, соответственно, для оценки массы и мембранного потенциала митохондрий в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах. Реагенты готовили согласно прилагаемым инструкциям, конечные концентрации MitoTracker Green FM (MTG) и MitoTracker Deep Red FM (MTDR) составили 100 нМ и 75 нМ соответственно. Блокирование АТФ-связывающих кассетных транспортеров (ATP-binding cassette (ABC) transporters) для предотвращения экспорта митохондриальных красителей [7] осуществляли добавлением верапамила (Sigma, США) в конечной концентрации 40 мкМ.

Статистический анализ выполняли с помощью непараметрических методов. В выборке рассчитывали медиану и интерквартильный размах (25-75 перцентиль). Достоверность различий определяли с помощью критерия Манна–Уитни.

## Результаты и обсуждение

Средний возраст обследованных здоровых субъектов составил 40 лет (32,5-43,5 года), на долю мужчин приходилось 56%. Различий по всем исследованным параметрам между женщинами и мужчинами не выявлено. Относительное количество CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов крови составило 36,7% (34,4-46,8%), что соответствует норме. Субпопуляционный состав CD4<sup>+</sup>T-клеток был представлен следующим образом. Наиболее многочисленными были наивные лимфоциты, на

долю которых приходилось 57,0% (31,7-60,5%) общего пула. Клетки центральной памяти составили почти треть всего пула CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов: 30,9% (25,2-43,9%). Относительное число клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных эффекторов составило 14,6% (11,1-21,8%) и 0,7% (0,4-1,6%) соответственно. Установленные в настоящей работе показатели распределения CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов периферической крови здоровых лиц по субпопуляциям соответствуют ранее представленным данным [13].

Для оценки массы митохондрий в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах был применен флуоресцентный краситель MTG. Данный реагент спонтанно проникает в клетку и предпочтительно аккумулируется в митохондриях, взаимодействуя с остатками цистеина в составе белков матрикса [5]. При этом интенсивность его свечения прямо пропорциональна массе органелл и не зависит от их поляризованности [5]. Цитофлуориметрический анализ выявил отличия в способности накопления красителя MTG разными субпопуляциями CD4<sup>+</sup>T-клеток (рис. 1).

Наивные лимфоциты по сравнению с субпопуляциями клеток памяти и терминально-дифференцированных эффекторов обладали сниженной массой митохондрий ( $p < 0,001$ ). Ранее рядом авторов было установлено, что CD4<sup>+</sup>T-клетки эффекторной памяти содержат митохондрии элонгированной/разветвленной формы [8] и, в отличие от наивных лимфоцитов, демонстрируют более высокую интенсивность свечения при окраске MTG [7]. Повышенная масса митохондрий T-клеток памяти обеспечивает их биоэнергетическое преимущество при повторном контакте с антигеном, что позволяет рассматривать клетки памяти как метаболически более адаптированную субпопуляцию лимфоцитов [10].

Проведенный нами анализ интенсивности флуоресценции MTG в пуле CD45R0<sup>+</sup> элементов показал, что по сравнению с клетками центральной памяти лимфоциты эффекторной памяти обладали более высокой массой митохондрий ( $p < 0,001$ ). Две субпопуляции клеток памяти отличаются экспрессией хемокинового рецептора CCR7, определяющего пути миграции лимфоцитов. Циркулирующие в крови CCR7<sup>+</sup> лимфоциты центральной памяти способны входить в лимфатические узлы, тогда как CCR7-негативные клетки эффекторной памяти экспрессируют рецепторы для миграции в периферические ткани, где по сравнению с кровотоком содержание кислорода значительно ниже [3]. По-видимому, метаболическая адаптация клеток эффекторной памяти к различным условиям микроокружения (циркуляция между богатой кислородом кровью и тканями с его дефицитом) обеспечивается, в том числе, и за счет повышенной массы митохондрий. Так, было показано, что в экспериментально созданных условиях гипоксии выживаемость наивных

CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов была снижена по сравнению с клетками эффекторной памяти, при этом последние продуцировали больше АТФ и обладали лучшей миграционной способностью [8].

Ряд авторов указывает на более высокую массу митохондрий в терминальных эффекторах по сравнению с менее дифференцированными субпопуляциями Т-лимфоцитов [4]. Проведенная нами оценка интенсивности флуоресценции красителя MTG показала, что масса митохондрий в терминально-дифференцированных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах не отличалась от таковой в клетках эффекторной памяти, но была выше, чем в лимфоцитах центральной памяти ( $p < 0,01$ ) и наивных элементах ( $p < 0,001$ ).

В целом, полученные данные указывают на то, что наивные CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты здоровых добровольцев обладают сниженной массой митохондрий, чем более дифференцированные субпопуляции. При этом масса органелл в функционально различных субпопуляциях клеток памяти

существенно отличается: повышена в лимфоцитах эффекторной памяти относительно таковой в клетках центральной памяти. Более зрелые субпопуляции CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов – клетки эффекторной памяти и терминально-дифференцированные эффекторы – не различаются по показателям массы митохондрий, но демонстрируют повышенную массу органелл по сравнению с наивными элементами и клетками центральной памяти.

С целью оценки другого показателя функционального состояния митохондрий – мембранного потенциала – нами был использован флуоресцентный краситель MTDR. Данный реагент относится к группе липофильных катионных красителей, которые свободно диффундируют в клетку и под действием потенциала на внутренней мембране митохондрий накапливаются в водном пространстве матрикса [12]. Ранее было установлено, что деполяризация митохондрий, индуцированная внесением карбонилцианид 3-хлорфенилгидразона (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP)), сопровождается снижением интенсивности свечения MTDR в клетках [15], что позволяет использовать его как потенциал-чувствительный реагент. При исследовании нами показателей флуоресценции MTDR в различных субпопуляциях CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов было выявлено следующее (рис. 2).

Клетки с фенотипом памяти (CD45R0<sup>+</sup>) демонстрировали более высокую интенсивность свечения по сравнению с CD45R0<sup>-</sup> негативными субпопуляциями – наивными лимфоцитами ( $p < 0,01$ ) и терминально-дифференцированными эффекторами ( $p < 0,05$ ). Оценка мембранного потенциала митохондрий в CD45R0<sup>+</sup> субпопуляциях не выявила статистически значимых отличий между показателями в клетках центральной и эффекторной памяти. Хотя средняя интенсивность свечения красителя в терминально-дифференцированных элементах была выше, чем в наивных лимфоцитах, статистически значимых различий заряда мембраны митохондрий между обеими субпопуляциями не установлено ( $p > 0,05$ ).

На основании полученных данных можно заключить, что у здоровых субъектов CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты центральной и эффекторной памяти по сравнению с наивными клетками обладают более высокой массой и величиной мембранного потенциала митохондрий. Необходимо отметить, что при использовании нами ранее потенциал-чувствительного красителя MitoTracker Orange и изоформы общего лейкоцитарного антигена CD45RA были получены аналогичные данные: у здоровых добровольцев масса и заряд мембраны митохондрий в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах памяти (CD45RA<sup>-</sup>) были выше, чем в CD45RA<sup>+</sup> клетках [1]. Известно, что оба пула клеток неоднородны и включают лимфоциты с разными функциональными свойствами и метаболической активностью [10]. Выявленная нами более высокая масса митохондрий в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах эффекторной памяти может

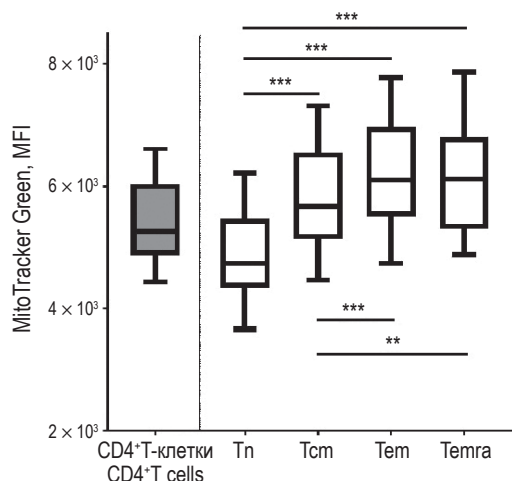


Рисунок 1. Оценка массы митохондрий в различных субпопуляциях CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов с использованием красителя MitoTracker Green

Примечание. CD4<sup>+</sup>T-клетки – общий пул CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов; субпопуляции клеток: T<sub>n</sub> – наивные, T<sub>cm</sub> – центральной памяти, T<sub>em</sub> – эффекторной памяти, T<sub>emra</sub> – терминально-дифференцированные. По оси ординат указана медиана яркости флуоресценции (MFI: Median Fluorescence Intensity) клеток, содержащих краситель в матриксе митохондрий. Представлены медианы (горизонтальные линии), межквартильные интервалы (прямоугольники) и 10-90% размахи (вертикальные отрезки). \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  (критерий Манна–Уитни).

Figure 1. Assessment of mitochondrial mass in CD4<sup>+</sup>T cells using the MitoTracker Green dye

Note. CD4<sup>+</sup>T cells, total pool of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes; cells subsets: T<sub>n</sub>, naive; T<sub>cm</sub>, central memory; T<sub>em</sub>, effector memory; T<sub>emra</sub>, terminally differentiated (effector memory T cells re-expressing CD45RA).

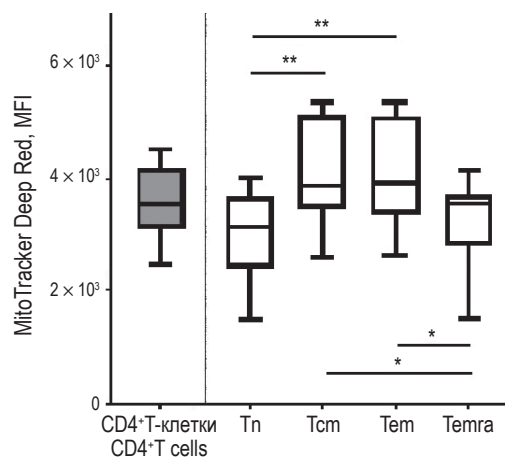
The y-axis shows the median fluorescence intensity (MFI: Median Fluorescence Intensity) of MitoTracker Green in cells containing the dye in the mitochondrial matrix. Medians (horizontal lines within boxes), interquartile ranges (boxes), and 10-90% ranges (vertical bars) are shown. \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (Mann-Whitney U test).



быть связана как с необходимостью адаптации к гипоксическим условиям периферических тканей, так и с готовностью органелл обеспечивать клетку энергией и молекулами для быстрого синтеза эффекторных цитокинов в ответ на антиген.

Ранее рядом авторов было установлено, что величина мембранного потенциала митохондрий является ключевым фактором формирования CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов памяти [14]. Полученные нами данные подтверждают это и для CD4<sup>+</sup>T-клеток: лимфоциты центральной и эффекторной памяти демонстрируют более высокий заряд мембраны митохондрий, чем наивные и терминально-дифференцированные элементы. Что касается пула CD45R0-негативных клеток, то наиболее интересные, на наш взгляд, данные были получены при оценке состояния митохондрий в терминально-дифференцированных эффекторах. Эти клетки рассматривают в качестве самых зрелых форм лимфоцитов [6]. Как и менее дифференцированная субпопуляция клеток эффекторной памяти терминально-дифференцированные лимфоциты демонстрируют схожую массу митохондрий. При этом величина мембранного потенциала митохондрий в терминально-дифференцированных эффекторах была существенно снижена по сравнению с таковыми показателями в обеих субпопуляциях клеток памяти. Исходя из этого, можно заключить, что терминально-дифференцированные эффекторы отличаются от остальных субпопуляций CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов уникальными характеристиками митохондрий: при высокой массе обладают сниженным зарядом мембраны. Известно, что клетки, находящиеся на терминальной стадии дифференцировки, демонстрируют признаки старения, ослабление пролиферативной активности, высокие уровни повреждения ДНК, потерю активности теломеразы, понижение экспрессии антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [6]. Мембранный потенциал митохондрий является важным показателем функционального состояния митохондрий, а его утрата ассоциирована с митохондриальным путем апоптоза [9]. Полученные в настоящем исследовании данные о состоянии митохондрий терминально-дифференцированных эффекторов также свидетельствуют о «готовности» клеток к программируемой гибели.

Необходимо также отметить, что исследование показателей состояния митохондрий с помощью флуоресцентных красителей без внесения в схему эксперимента ингибиторов АТФ-связывающих кассетных транспортеров (АТФ-binding cassette (ABC) transporters) может влиять на оценку результатов цитофлуориметрического анализа. ABC-транспортеры расположены на мембранах клетки и способны выводить из нее различные субстраты. Как правило, большинство исследователей не принимает во внимание наличие данных белков-транспортеров, тогда как их активность представляет реальную проблему при оценке параметров митохондрий с использованием флюо-



**Рисунок 2. Исследование мембранного потенциала митохондрий в различных субпопуляциях CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов с использованием красителя MitoTracker Deep Red**

**Примечание.** CD4<sup>+</sup>T-клетки – общий пул CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов; субпопуляции клеток: T<sub>N</sub> – наивные, T<sub>CM</sub> – центральной памяти, T<sub>EM</sub> – эффекторной памяти, T<sub>EMRA</sub> – терминально-дифференцированные. По оси ординат указана медиана яркости флуоресценции (MFI: Median Fluorescence Intensity) красителя в клетках с функционально активными митохондриями. Представлены медианы (горизонтальные линии), межквартильные интервалы (прямоугольники) и 10-90% размахи (вертикальные отрезки). \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01 (критерий Манна–Уитни).

Figure 2. Assessment of mitochondrial membrane potential in CD4<sup>+</sup>T cells using the MitoTracker Deep Red dye

Note. CD4<sup>+</sup>T cells, total pool of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes; cells subsets: T<sub>N</sub>, naive; T<sub>CM</sub>, central memory; T<sub>EM</sub>, effector memory; T<sub>EMRA</sub>, terminally differentiated (effector memory T cells re-expressing CD45RA). The y-axis shows the median fluorescence intensity (MFI: Median Fluorescence Intensity) of MitoTracker Deep Red in cells with functionally active mitochondria. Medians (horizontal lines within boxes), interquartile ranges (boxes), and 10-90% ranges (vertical bars) are shown. \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01 (Mann-Whitney U test).

ресцентных реагентов. Так, группой авторов была показана способность ABC-транспортеров выкачивать MitoTracker Green из CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов, при этом блокирование транспортеров рядом ингибиторов приводило к росту интенсивности флуоресценции красителя [7]. На наш взгляд, эти данные свидетельствуют о важности стандартизации условий эксперимента при использовании митохондриально-селективных флуоресцентных реагентов. Кроме того, нарушение функционирования ABC-транспортеров может влиять на интерпретацию результатов оценки состояния митохондрий при исследовании их параметров в различных клинических группах.

## Заключение

Таким образом, установлено, что у здоровых субъектов CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты центральной и эффекторной памяти по сравнению с наивными клетками обладают более высокой массой и ве-

личиной мембранного потенциала митохондрий. Масса органелл в функционально различных субпопуляциях клеток памяти существенно отличается: повышена в лимфоцитах эффекторной памяти относительно таковой в клетках центральной памяти. Терминально-дифференцированные эффекторы отличаются от остальных субпопуляций CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов уникальными характеристиками митохондрий: при высокой массе об-

ладают сниженным зарядом мембраны. Данная особенность может быть связана с «готовностью» клеток, находящихся на терминальной стадии дифференцировки, к программируемой гибели.

## Благодарности

В работе было использовано оборудование ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

## Список литературы / References

1. Королевская Л.Б., Сайдакова Е.В., Шмагель Н.Г., Шмагель К.В. Оценка состояния митохондрий CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитов здоровых лиц // Цитология, 2022. Т. 64, № 3. С. 232-239. [Korolevskaya L.B., Saidakova E.V., Shmagel N.G., Shmagel K.V. Assessment of Mitochondrial Condition in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells from Healthy Subjects. *Tsitologiya = Cytology*, 2022, Vol. 64, no. 3, pp. 232-239. (In Russ.)]
2. Breda C.N.S., Davanzo G.G., Basso P.J., Saraiva Câmara N.O., Moraes-Vieira P.M.M. Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox Biol*, 2019, Vol. 26, e101255. doi: 10.1016/j.redox.2019.101255.
3. Caldwell C.C., Kojima H., Lukashov D., Armstrong J., Farber M., Apasov S.G., Sitkovsky M.V. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 11, pp. 6140-6149.
4. Callender L.A., Carroll E.C., Bober E.A., Akbar A.N., Solito E., Henson S.M. Mitochondrial mass governs the extent of human T cell senescence. *Aging Cell*, 2020, Vol. 19, no. 2, e13067. doi: 10.1111/ace1.13067
5. Cottet-Rousselle C., Ronot X., Leverve X., Mayol J.F. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A*, 2011, Vol. 79, no. 6, pp. 405-425.
6. Di Mitri D., Azevedo R.I., Henson S.M., Libri V., Riddell N.E., Macaulay R., Kipling D., Soares M.V., Battistini L., Akbar A.N. Reversible senescence in human CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> memory T cells. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 5, pp. 2093-2100.
7. Dimeloe S., Frick C., Fischer M., Gubser P.M., Razik L., Bantug G.R., Ravon M., Langenkamp A., Hess C. Human regulatory T cells lack the cyclophosphamide-extruding transporter ABCB1 and are more susceptible to cyclophosphamide-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 12, pp. 3614-3620.
8. Dimeloe S., Mehling M., Frick C., Loeliger J., Bantug G.R., Sauder U., Fischer M., Belle R., Develioglu L., Tay S., Langenkamp A., Hess C. The immune-metabolic basis of effector memory CD4<sup>+</sup> T cell function under hypoxic conditions. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 1, pp. 106-114.
9. Gottlieb E., Armour S.M., Harris M.H., Thompson C.B. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ.*, 2003, Vol. 10, no. 6, pp. 709-717.
10. Jameson S.C., Masopust D. Understanding subset diversity in T cell memory. *Immunity*, 2018, Vol. 48, no. 2, pp. 214-226.
11. Sallusto F., Lenig D., Förster R., Lipp M., Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, Vol. 401, no. 6754, pp. 708-712.
12. Solaini G., Sgarbi G., Lenaz G., Baracca A. Evaluating mitochondrial membrane potential in cells. *Biosci. Rep.*, 2007, Vol. 27, no. 1-3, pp. 11-21.
13. Shmagel K.V., Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Shmagel N.G., Chereshev V.A., Anthony D.D., Lederman M.M. Influence of hepatitis C virus coinfection on CD4<sup>+</sup> T cells of HIV-infected patients receiving HAART. *AIDS*, 2014, Vol. 28, no. 16, pp. 2381-2388.
14. Sukumar M., Liu J., Mehta G.U., Patel S.J., Roychoudhuri R., Crompton J.G., Klebanoff C.A., Ji Y., Li P., Yu Z., Whitehill G.D., Clever D., Eil R.L., Palmer D.C., Mitra S., Rao M., Keyvanfar K., Schrumpp D.S., Wang E., Marincola F.M., Gattinoni L., Leonard W.J., Muranski P., Finkel T., Restifo N.P. Mitochondrial membrane potential identifies cells with enhanced stemness for cellular therapy. *Cell Metab.*, 2016, Vol. 23, no. 1, pp. 63-76.
15. Xiao B., Deng X., Zhou W., Tan E.K. Flow cytometry-based assessment of mitophagy using mitotracker. *Front. Cell. Neurosci.*, 2016, Vol. 10, e76. doi: 10.3389/fncel.2016.00076.

### Авторы:

**Королевская Л.Б.** — к.м.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

**Шмагель К.В.** — д.м.н., заведующий лабораторией экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

### Authors:

**Korolevskaya L.B.**, PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Shmagel K.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 11.03.2024  
Принята к печати 17.03.2024

Received 11.03.2024  
Accepted 17.03.2024

# МАРКЕРЫ СИСТЕМНОЙ АКТИВАЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ В ОЦЕНКЕ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

**Зотова Н.В., Журавлева Ю.А.**

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

**Резюме.** Феномен системной активации лейкоцитов можно рассматривать как одну из составляющих более интегрального феномена системного воспаления (СВ) – системной воспалительной реакции (СВР). В настоящее время известны сотни молекулярных маркеров – продуктов активации лейкоцитов, которые возможно применять в качестве критериев их системной активации; к таким маркерам относятся растворимый рецептор к IL-2 (sIL-2R) или CD25,  $\beta$ 2-микроглобулин, эозинофильный катионный белок (ЕСР).

Целью нашего исследования стала оценка возможности использования маркеров системной активации лейкоцитов в качестве критериев острого и хронического системного воспаления.

Для изучения острого СВ были проанализированы данные пациентов с острыми критическими состояниями инфекционного (n = 121) – реанимационные пациенты с сепсисом-2 (согласно консенсусу 2001 г., без ПОН) и сепсисом-3 (консенсус 2016 г., ПОН) и неинфекционного (n = 136) генеза (политравма без/с ПОН), для изучения хронического СВ – данные пациентов с иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями (n = 148).

По авторской методике рассчитывали уровень реактивности (УР) для оценки интенсивности СВР, а также баллы по шкалам острого СВ и хронического СВ (ХрСВ) – для верификации развития СВ на основании измеренных концентраций IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$  и CRP, D-димеров, кортизола, миоглобина и тропонина I. В качестве критериев феномена активации лейкоцитов использовали уровень sIL-2R > 700 ед/мл,  $\beta$ 2-микроглобулина > 3000 нг/мл и ЕСР > 10 нг/мл.

Согласно результатам исследования, наиболее стабильными показателями, позволяющими разделить группы без/с СВ при острых и хронических заболеваниях как по частоте регистрации, так и по концентрации в плазме, стали TNF $\alpha$ , ЕСР и  $\beta$ 2-микроглобулин, что свидетельствует о типовом характере системной активации лейкоцитов и возможности применения данных показателей для оценки интенсивности описываемого феномена при интегрировании в балльную шкалу СВ. Однако самостоятельное применение этих показателей в качестве критериев комплексного процесса СВ и даже феномена СВР весьма сомнительно, поскольку регистрация пороговых значений одновременно двух критериев при остром процессе СВ была лишь в 40,2% случаев, а при хроническом – в 23,7%, при этом была сопоставима с группой без острого СВ. Все три дополнительных критерия одновременно определялись при остром СВ в 20,5% случаев, при хроническом – в 3,4%.

---

## Адрес для переписки:

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

## Address for correspondence:

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

---

## Образец цитирования:

Н.В. Зотова, Ю.А. Журавлева «Маркеры системной активации лейкоцитов в оценке острого и хронического системного воспаления» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 213-218. doi: 10.46235/1028-7221-16668-MOS

© Зотова Н.В., Журавлева Ю.А., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

N.V. Zotova, Yu.A. Zhuravleva “Markers of systemic leukocyte activation for assessing acute and chronic systemic inflammation”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 213-218. doi: 10.46235/1028-7221-16668-MOS

© Zotova N.V., Zhuravleva Yu.A., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16668-MOS

Также не выявлено сильных корреляционных взаимосвязей этих показателей со шкалами УР, СВ и ХрСВ.

Таким образом, маркеры sIL-2R, ECP и  $\beta$ 2-микροглобулин применимы для определения выраженности феномена активации лейкоцитов и для интегрирования в шкалу СВ при условии выделения диапазонов концентрации, соответствующих динамике развития острого и хронического СВ.

*Ключевые слова:* системное воспаление, активация лейкоцитов, системная воспалительная реакция, sIL-2R,  $\beta$ 2-микροглобулин, ECP

## MARKERS OF SYSTEMIC LEUKOCYTE ACTIVATION FOR ASSESSING ACUTE AND CHRONIC SYSTEMIC INFLAMMATION

Zotova N.V., Zhuravleva Yu.A.

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

**Abstract.** The phenomenon of systemic leukocyte activation is a component of systemic inflammation (SI), known as the systemic inflammatory response (SIR). Currently, there are hundreds of molecular markers that can serve as criteria for systemic activation, including soluble receptor to IL-2 (sIL-2R) or CD25,  $\beta$ 2-microglobulin, and eosinophil cationic protein (ECP). The objective of our study was to assess whether markers of systemic leukocyte activation can be used as criteria for acute and chronic systemic inflammation. Data from 121 patients with acute critical infectious conditions – intensive care patients with sepsis-2 (according to the 2001 consensus, without MODS) and sepsis-3 (2016 consensus, with MODS) – and 136 patients with non-infectious genesis (polytrauma with and without MODS) were analyzed to study acute SI. Additionally, data from 148 patients with immune-inflammatory rheumatic diseases were analyzed to study chronic SI. The reactivity level (RL) was calculated using the author's method to assess the intensity of SIR. The development of SI was verified based on the measured concentrations of IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ , CRP, D-dimers, cortisol, myoglobin, and troponin I. Criteria for leukocyte activation phenomenon were sIL-2R > 700 units/mL,  $\beta$ 2-microglobulin > 3000 ng/mL, and ECP > 10 ng/mL.

Based on the study results, TNF $\alpha$ , ECP, and  $\beta$ 2-microglobulin were identified as the most stable indices for dividing groups with and without systemic vasculitis in both acute and chronic diseases. These indices indicate the typical character of systemic leukocyte activation and can be used to assess the intensity of the described phenomenon when integrated into the SI score. However, it is doubtful that these indices can be independently applied as criteria for the complex process of SI and even the SIR phenomenon. This is because the registration of threshold values for two criteria simultaneously during the acute process of SI was only observed in 40.2% of cases, and in chronic processes, it was only observed in 23.7%. These values were comparable to the group without acute SI. Additionally, all three additional criteria were only determined in acute SI in 20.5% of cases and in chronic SI in 3.4%.

*Keywords:* systemic inflammation, leukocyte activation, SIRS, sIL-2R,  $\beta$ 2-microglobulin, ECP

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

### Введение

Согласно современным представлениям, в патогенезе ряда острых и наиболее тяжелых хронических заболеваний значительную роль играет системное воспаление (системное гипервоспаление – СВ). Триггерную роль в активации

механизмов СВ играют микробные антигены (PAMP) и продукты некротического распада клеток (DAMP), которые при массивном поступлении в системный кровоток через Toll-подобные рецепторы (toll-like receptors – TLR) активируют большое количество лейкоцитарных клеток (мононуклеарные фагоциты, дендритные клетки, нейтрофилы, базофилы, мастоциты, эозинофилы, нормальные киллеры). Феномен системной

активации лейкоцитов можно рассматривать как одну из составляющих более интегрального феномена СВ – системной воспалительной реакции (СВР). В настоящее время известны сотни молекулярных маркеров – продуктов активации лейкоцитов, которые могут выступать в качестве критериев их системной активации, к числу которых могут быть отнесены цитокины (IL-6, TNF $\alpha$  и др.), растворимый рецептор к IL-2 (sIL-2R) или CD25,  $\beta$ 2-микроглобулин, эозинофильный катионный белок (ЕСР – eosinophil cationic protein). Рецептор к IL-2 конститутивно экспрессируется на Т- и В-лимфоцитах. После активации лимфоцитов усиливается не только экспрессия на их поверхности IL-2R, но и шеддинг этого рецептора в кровотоки [1]. Таким образом, клиническое значение измерения sIL-2R в сыворотке крови заключается в оценке степени активации клеток лимфоцитарного ряда.  $\beta$ 2-микроглобулин является компонентом легкой цепи главного комплекса гистосовместимости класса I (MHC I), представлен на всех ядродержащих клетках организма человека. Наибольшая его экспрессия наблюдается на лимфоцитах, а усиление продукции  $\beta$ 2-микроглобулина в кровотоки, как правило, связано с повышенным клиренсом клеток (при инфекционных, аутоиммунных, опухолевых заболеваниях) [2]. ЕСР, являясь компонентом гранул эозинофилов, обладает высокой цитотоксической активностью в отношении ряда вирусов, бактерий и паразитов, а также собственных тканей организма [6]. ЕСР-индуцированная деструкция тканей и высвобождение большого количества DAMP вносит вклад в развитие вторичной системной альтерации – отдельного феномена СВ, который замыкает порочный круг патологического процесса СВ и делает его самоподдерживающимся.

**Цель исследования** – оценить возможность применения маркеров системной активации лейкоцитов в качестве критериев острого и хронического системного воспаления.

## Материалы и методы

Для изучения острого СВ были проанализированы данные пациентов с острыми критическими состояниями инфекционного и неинфекционного генеза, для изучения хронического СВ – данные пациентов с иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями (ИВРЗ).

1. Сепсис – реанимационные пациенты без развития полиорганной недостаточности (ПОН, дефиниции консенсуса Сепсис-2 [3]) и с развитием ПОН (Сепсис-3 [5]),  $n = 121$ , возраст –  $42,7 \pm 17,3$  года, мужчин 62,4%, обследование на 1-7 сутки после госпитализации).

2. Травма – множественные повреждения двух и более областей тела с развитием и без

ПОН,  $n = 136$ , возраст –  $39,0 \pm 13,7$  года, мужчин 68,4%, обследование на 1-7-е сутки после госпитализации в отделение интенсивной терапии.

3. Системная красная волчанка ( $n = 49$ , возраст –  $43,7 \pm 13,3$  года, мужчин 6,1%, длительность заболевания –  $11,9 \pm 9,4$  года).

4. Ревматоидный артрит ( $n = 42$ , возраст –  $53,1 \pm 14,3$  года, мужчин 9,5%, длительность заболевания –  $7,1 \pm 7,4$  года).

5. Реактивный артрит, вызванный *Chlamydia trachomatis* ( $n = 30$ , возраст –  $42,4 \pm 14,3$  года, мужчин 39,3%).

6. Псориатический артрит ( $n = 12$ , возраст –  $52,9 \pm 6,1$  года, мужчин 50%).

7. Хроническая ревматическая болезнь сердца ( $n = 15$ , возраст –  $55,3 \pm 13,0$  года, мужчин 14,3%).

В цитратной плазме крови пациентов измеряли уровни воспалительных медиаторов: острофазного С-реактивного белка (СРР) и цитокинов (IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IL-10), на основании которых по оригинальной авторской методике производился расчет интегрального показателя СВР – уровня реактивности – УР (min 0 – max 5) [7], а также маркера паракоагуляции – D-димера, маркера дистресс-реакции – кортизола, маркеров системной альтерации – миоглобина и тропонина I. Наличие острого и хронического СВ определялось с учетом данных показателей по разработанным ранее шкалам [8]. У части пациентов определяли также дополнительные маркеры СВР, свидетельствующие о внутрисосудистой активации различных субпопуляций лейкоцитов: уровни эозинофильного катионного белка, sIL-2R,  $\beta$ 2-микроглобулина. Исследование проводили методом иммунохемилюминесценции (Immulite, Siemens Medical Solution Diagnostic, США).

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США). После проверки данных на тип распределения (тест Колмогорова–Смирнова) для анализа и сравнения использовали непараметрические методы и критерии: Манна–Уитни (U-критерий) и Хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Данные представлены в виде: Медиана (Me) и 25-75 квартили, а также частоты (%) превышения значений, являющихся критериальными для развития СВ. Для оценки взаимосвязей между концентрацией исследуемых маркеров и баллами по шкалам СВ применяли критерий Спирмена (R). Результаты считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Частота выявления СВ при острых процессах составила 77,2%, при хронических – 39,9%, при этом интенсивность его основного феномена – СВР, оцениваемая по УР, значительно отличалась как

в группах с наличием/без СВ обоих вариантов, так и при сравнении соответствующих групп при хроническом и остром процессе (U-критерий,  $p < 0,05$ ). Аналогично, процесс СВ ожидаемо отличался и по выраженности феномена активации лейкоцитов.

Хроническое СВ характеризовалось меньшей интенсивностью этого феномена: частота выявления всех критериев при ХрСВ не превышала 50% случаев и статистически значимо ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ) была ниже, кроме  $\beta 2$ -микроглобулина, по сравнению с острым СВ, при котором указанные критерии выявляли в большинстве случаев (рис. 1). В группах пациентов с острым процессом, как с развитием СВ, так и без него, абсолютные значения исследуемых показателей активации лейкоцитов (табл. 1) также были статистически значимо выше (U-критерий,  $p < 0,05$ ). В целом выраженность указанного феномена у пациентов с ХрСВ была сопоставима с таковой у пациентов с острыми состояниями, но без развития

СВ: выявлено отсутствие статистически значимых отличий групп больных с ХрСВ от «острых» пациентов без СВ по содержанию sIL2R и  $\beta 2$ -микроглобулина (U-критерий,  $p < 0,05$ ).

Очевидно, что принципиальную роль в сдерживании воспалительного процесса при хронических заболеваниях играет длительная противовоспалительная терапия. Возможна также постепенная адаптивная перестройка секреторного и рецепторного фенотипов клеток, на фоне их системной вовлеченности в развитие СВ хронического и острого (сопоставимая частота выявления  $\beta 2$ -микроглобулина, но значимая разница концентрации), которая обуславливает неответственность эффекторных клеток на активационные стимулы в случае хронизации воспаления [4].

В качестве подтверждения вышеуказанного заключения мы рассматриваем и значимость отличий по исследуемым критериям между группами пациентов с острыми и хроническими заболеваниями, у которых СВ не развивалось, как по

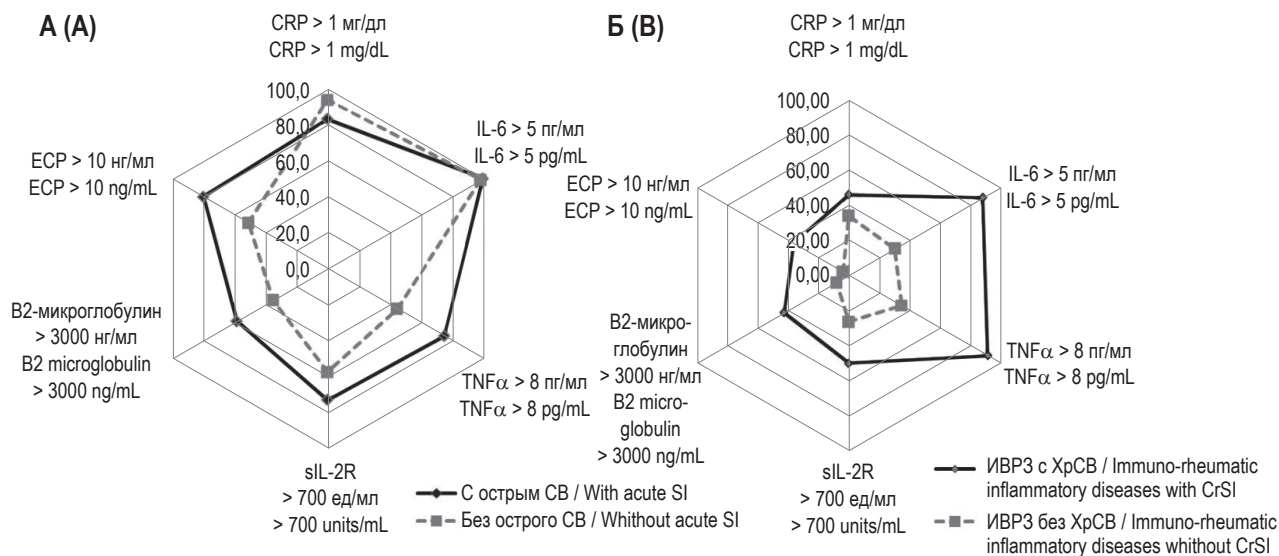
**ТАБЛИЦА 1. ОПИСАТЕЛЬНАЯ СТАТИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ (Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) %) И ЧАСТОТА РЕГИСТРАЦИИ ОДНОВРЕМЕННО ДВУХ И ТРЕХ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ КРИТЕРИЕВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ**

TABLE 1. DESCRIPTIVE STATISTICS OF THE INDICATORS STUDIED (Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) %) AND THE FREQUENCY OF SIMULTANEOUS REGISTRATION OF TWO AND THREE ADDITIONAL CRITERIA IN THE GROUPS STUDIED

Показатель Parameter	Острые состояния Acute condition		Хронические заболевания Chronic nosologies	
	СВ SI	Без СВ Without SI	ХрСВ ChSI	Без ХрСВ Without ChSI
CRP	13,5 <sup>*</sup> (5,1-28,8)	13,1 (5,9-24,4)	0,85 (0,2-2,3)	0,4 (0,15-1,65)
IL-6	96,0 <sup>1</sup> (37,0-261,0)	42,9 (19,0-98,9)	44,9 <sup>2</sup> (12,3-131,0)	2,9 (1,9-5,9)
TNF $\alpha$	9,8 <sup>1</sup> (4,7-23,0)	7,1 (4,0-14,0)	5,03 <sup>2</sup> (27,8-109,0)	5,2 (3,9-11,2)
sIL-2R	1194,0 (612,0-2498,0)	870,5 (579,5-1671,0)	747,5 <sup>2</sup> (581,5-1268,0)	474,0 (369,0-760,0)
$\beta 2$ -микроглобулин $\beta 2$ -microglobulin	2813,0 <sup>1</sup> (1687,5-4760,0)	2440,0 (1680,0-3876,0)	2380,0 <sup>2</sup> (1590,0-3460,0)	2004,0 (1645,0-2480,0)
ЕСР	13,6 <sup>1</sup> (8,1-23,6)	10,1 (6,0-17,7)	6,4 <sup>2</sup> (3,2-15,0)	4,2 (3,0-5,7)
2 доп. критерия, % Two additional criteria	40,2	28,0	23,7	2,2
3 доп. критерия, % Three additional criteria	20,5	8,8	3,4	1,1

Примечание. Представлены медиана и межквартильный интервал – Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). <sup>1</sup> и <sup>2</sup> – значимые отличия между группами с СВ/без СВ при остром и хроническом процессе.

Note. Median and interquartile range – Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) are presented. <sup>1</sup> and <sup>2</sup>, significant differences between groups with/without SI in acute and chronic process.



**Рисунок 1. Частота регистрации медиаторов воспаления и дополнительных критериев**

**Примечание. А – в группах с острым процессом; Б – в группах с хроническим процессом.**

Figure 1. Shows the frequency of registration of inflammatory mediators and additional criteria

Note. Group A represents those with acute processes, while Group B represents those with chronic diseases.

частоте выявления критериев (кроме  $\text{TNF}\alpha$ ), так и по их концентрации в плазме ( $\chi^2$ , U-критерий,  $p < 0,05$ ).

Важно отметить, что превышение исследуемыми показателями нормальных значений при остром и хроническом воспалении не может являться критерием СВ, тем более без учета динамики их изменения. Для использования любого медиатора воспаления в качестве дополнительного критерия оценки выраженности СВ или частного феномена, необходимо определять диапазоны концентраций, которые соответствуют развитию процесса во времени, т. е. выявлять определенный патофизиологический смысл такого повышения.

Так, группы пациентов без и с развитием острого СВ не отличались по частоте регистрации превышения критериального значения IL-6 ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ), но эмпирические значения IL-6 при развитии острого СВ были в два раза выше, по сравнению с группой без СВ (U-критерий,  $p < 0,05$ ). Значимые отличия между группами без/с СВ установлены и по концентрации  $\text{TNF}\alpha$  (U-критерий,  $p < 0,05$ ). А вот содержание «классического» маркера воспаления – CRP значимо не повышалось при развитии СВ, причем описанная динамика широко распространенных маркеров СВР справедлива и для хронического процесса.

Среди дополнительных критериев активации лейкоцитов у пациентов с ХрСВ наиболее часто

выявлялся уровень  $\text{sIL-2R} > 700$  ед/мл, наименее часто – уровень  $\text{ECP} > 10$  нг/мл, при остром СВ, наоборот, ECP чаще всех превышал критериальное значение 10 нг/мл (рис. 1).

Согласно результатам исследования, наиболее стабильными показателями, позволяющими разделить группы без/с СВ при острых и хронических заболеваниях как по частоте регистрации, так и по концентрации в плазме, стали  $\text{TNF}\alpha$ , ECP и  $\beta 2$ -микроглобулин, что свидетельствует о типовом характере системной активации лейкоцитов и возможности их применения для оценки интенсивности описываемого феномена при интегрировании в балльную шкалу СВ. Однако самостоятельное применение этих показателей в качестве критериев комплексного процесса СВ и даже феномена СВР весьма сомнительно, поскольку регистрация пороговых значений одновременно двух критериев при остром процессе СВ была менее чем в половине всех случаев, а при хроническом – не достигала и четверти (табл. 1), при этом была сопоставима с группой без острого СВ. Все три дополнительных критерия определялись при остром СВ в 20,5% случаев, при хроническом – в единичных (табл. 1).

Вышесказанное утверждение подтверждается и слабыми корреляционными связями между балльной оценкой по шкалам УР, СВ и ХрСВ и исследуемыми маркерами активации лейкоцитов. Так, в группе с хроническими заболеваниями максимальный уровень взаимосвязи с баллами

по шкале ХрСВ определяли для sIL-2R ( $R = 0,40$ ,  $p < 0,001$ ), в группе с острыми состояниями для всех дополнительных критериев  $R < 0,3$  ( $p < 0,01$ ). Уровень корреляции между этими критериями и баллами по шкале УР при обоих вариантах воспалительного ответа был менее 0,4 ( $p < 0,05$ ). При этом слабая корреляционная связь выявлена между sIL-2R и  $\beta 2$ -микроглобулином ( $R_{\text{хроника}} = 0,57$  и  $R_{\text{острые}} = 0,47$ ,  $p < 0,05$ ).

## Заключение

Таким образом, можно сделать следующее заключение: маркеры sIL-2R, ЕСР и  $\beta 2$ -микроглобулин возможно использовать для определения выраженности феномена активации лейкоцитов и для интегрирования в шкалу СВ, при условии выделения диапазонов концентрации, соответствующих динамике развития острого и хронического СВ.

## Список литературы / References

1. Dik W.A., Heron M. Clinical significance of soluble interleukin-2 receptor measurement in immune-mediated diseases. *Neth. J. Med.*, 2020, Vol. 78, no. 5, pp. 220-231.
2. Du A.X., Gniadecki R., Osman M. Biomarkers of B cell activation in autoimmune connective tissue diseases: More than markers of disease activity. *Clin. Biochem.*, 2022, Vol. 100, pp. 1-12.
3. Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.L., Ramsay G. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS: 2001 SCCM/ESICM/ ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.*, 2003, Vol. 31, no. 4, pp. 1250-1256.
4. Liang Y., Xu W.D., Peng H., Pan H.F., Ye D.Q. SOCS signaling in autoimmune diseases: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 5, pp. 1265-1275.
5. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Cooper-Smith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016, Vol. 315, no. 8, pp. 801-810.
6. Topic R.Z., Dodig S. Eosinophil cationic protein--current concepts and controversies. *Biochem. Med. (Zagreb)*, 2011, Vol. 21, no. 2, pp. 111-121.
7. Zotova N.V., Zhuravleva Y.A., Zubova T.E., Gusev E.Y. Integral estimation of systemic inflammatory response under sepsis. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2020, Vol. 39, no. 1, pp. 13-26.
8. Zotova N., Zhuravleva Y., Chereshev V., Gusev E. Acute and Chronic Systemic Inflammation: Features and Differences in the Pathogenesis, and Integral Criteria for Verification and Differentiation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 2, 1144. doi: 10.3390/ijms24021144.

---

### Авторы:

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

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

### Authors:

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

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

---

Поступила 28.03.2024

Отправлена на доработку 31.03.2024

Принята к печати 04.04.2024

---

Received 28.03.2024

Revision received 31.03.2024

Accepted 04.04.2024



# ИНГИБИРОВАНИЕ TLR4 И NLRP3-РЕЦЕПТОРОВ УСИЛИВАЕТ ПРОДУКЦИЮ АЛЛЕРГЕН- СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE-АНТИТЕЛ В МОДЕЛЯХ АЛЛЕРГИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОДКОЖНОГО И ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ АНТИГЕНА СООТВЕТСТВЕННО

Чудаков Д.Б., Шустова О.А., Коновалова М.В., Величинский Р.А.,  
Фаттахова Г.В.

ФГБУН «Государственный научный центр «Институт биоорганической химии имени академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»» Российской академии наук, Москва, Россия

**Резюме.** В настоящее время наблюдается повсеместный рост распространенности заболеваний, связанных с продукцией IgE в ответ на попадание в организм безвредных аллергенов. Однако вопрос о роли активации PRR-рецепторов в формировании продукции аллерген-специфических антител еще остается дискуссионным. Существует так называемая гигиеническая гипотеза, согласно которой причиной развития аллергических заболеваний является уменьшение контакта современных людей с различными патогенами, содержащими лиганды PRR-рецепторов. Целью настоящей работы было определить роль активации TLR4 и NLRP3-рецепторов в формировании продукции аллерген-специфических антител.

Мыши линии BALB/c были иммунизированы двумя способами: 1) подкожно в течение 6 недель 2–3 раза в неделю дозой OVA 0,1 мкг; 2) интраназально в течение 8 недель 2 раза в неделю дозой OVA 0,3 мкг с бензо(а)пиреном (BaP) в дозе 4 нг. В обоих случаях части животным вводили низкомолекулярные ингибиторы TLR4 и NLRP3 – TLR4-IN-C34 в дозе 1 мг/кг и CY-09 в дозе 20 мг/кг соответственно. Продукцию специфических антител определяли методом ИФА по окончании протокола.

Введение TLR4-IN-C34 достоверно ( $p < 0,01$ ) и примерно в 2,5 раза усиливало продукцию специфического IgE, но не IgG1, в модели с использованием подкожной иммунизации. Титры специфического IgE в контрольной группе без ингибитора и в опытной группе с TLR4-IN-C34 составили,

## Адрес для переписки:

Чудаков Дмитрий Борисович  
ФГБУН «Государственный научный центр  
«Институт биоорганической химии имени академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»» Российской  
академии наук  
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Макля, 16/10.  
Тел./факс: 8 (495) 330-40-11.  
E-mail: boris-chudakov@yandex.ru

## Address for correspondence:

Dmitrii B. Chudakov  
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences  
16/10 Miklukho-Maklay St  
Moscow  
117997 Russian Federation  
Phone/fax: +7 (495) 330-40-11.  
E-mail: boris-chudakov@yandex.ru

## Образец цитирования:

Д.Б. Чудаков, О.А. Шустова, М.В. Коновалова,  
Р.А. Величинский, Г.В. Фаттахова «Ингибирование  
TLR4 и NLRP3 рецепторов усиливает продукцию  
аллерген-специфических IgE-антител в моделях  
аллергии с использованием подкожного и  
интраназального введения антигена соответственно»  
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,  
№ 2. С. 219–226.  
doi: 10.46235/1028-7221-16617-IOT

doi: 10.46235/1028-7221-16617-IOT

© Чудаков Д.Б. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

D.B. Chudakov, O.A. Shustova, M.V. Konovalova,  
R.A. Velichinskii, G.V. Fattakhova “Inhibition of TLR4 and  
NLRP3 leads to the exacerbation of IgE specific antibodies  
in mouse allergic models based on subcutaneous or intranasal  
immunization respectively”, Russian Journal of Immunology/  
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2,  
pp. 219–226.  
doi: 10.46235/1028-7221-16617-IOT

doi: 10.46235/1028-7221-16617-IOT

© Chudakov D.B. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16617-IOT

соответственно,  $(3 \pm 0,6) \times 10^3$  и  $(8 \pm 2) \times 10^3$ . Введение CY-09 не оказывало влияния на гуморальный ответ в данной модели. Противоположная ситуация наблюдалась в случае интраназальной иммунизации с BaP. BaP достоверно стимулировал формирование продукции специфического IgE и IgG1. В данной модели введение CY-09, но не TLR4-IN-C34 на фоне введения BaP, достоверно ( $p < 0,05$ ) и примерно в 2 раза повышало продукцию специфического IgE, но не влияло на продукцию IgG1. Титры специфического IgE в контрольной группе без ингибитора и в опытной составили  $(2,0 \pm 0,4) \times 10^2$  и  $(5,1 \pm 0,3) \times 10^2$ .

Таким образом, активация PRR, TLR4 и NLRP3 в модели с использованием подкожной иммунизации и в модели с использованием интраназального введения антигена с BaP подавляла продукцию аллерген-специфического IgE, но не IgG1 антител. Полученные данные в целом находятся в согласии с гигиенической гипотезой формирования аллергопатологий.

*Ключевые слова: IgE, TLR4, NLRP3, бензо(а)пирен, низкомолекулярные фармакологические ингибиторы, модель аллергии на мышах*

## INHIBITION OF TLR4 AND NLRP3 LEADS TO THE EXACERBATION OF IgE SPECIFIC ANTIBODIES IN MOUSE ALLERGIC MODELS BASED ON SUBCUTANEOUS OR INTRANASAL IMMUNIZATION RESPECTIVELY

Chudakov D.B., Shustova O.A., Konovalova M.V., Velichinskii R.A., Fattakhova G.V.

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** A significant increase in the prevalence of diseases linked with IgE production can be seen in recent years, but the question about the role of TLR receptors in this process remains controversial. According to the hygiene hypothesis, the decrease of the contact of the individual with pathogens that contain PRR receptor ligands in the recent years leads to the development of allergic diseases. The aim of this work was to investigate whether TLR4 and NLRP3 receptor activation contributes to allergen-specific antibody formation.

BALB/c mice were immunized according to two different protocols. In the first one, OVA antigen was administered in 0.1  $\mu\text{g}$  dose 2–3 times a week for 6 weeks by subcutaneous route. In the second one, OVA was administered in 0.3  $\mu\text{g}$  dose intranasally in combination with 4 ng of benzo(a)pyrene (BaP) 2 times a week for 8 weeks. In both cases, TLR4 and NLRP3 receptor inhibitors, namely TLR4-IN-C34 in 1 mg/kg dose and CY-09 in 20 mg/kg dose respectively were also administered to the some of the mice. Specific antibody production was determined by ELISA.

Immunization of mice with TLR4-IN-C34 significantly ( $p < 0.01$ ) amplify IgE production (about 2.5 times in comparison with control group), but has no effect on specific IgG1 production in subcutaneous model. Specific IgE titers in the control group immunized without small molecule inhibitor and in the TLR4-IN-C34 group were  $(3 \pm 0.6) \times 10^3$  and  $(8 \pm 2) \times 10^3$ , respectively. In this model, CY-09 administration has no effect on humoral immune response. In the secondary (intranasal) model, BaP significantly increase specific IgE and IgG1 production. CY-09 but not TLR4-IN-C34 administered in combination with BaP significant ( $p < 0.05$ ) and approximately 2 times enhances specific IgE but not IgG1 production. Specific IgE titers in the control group without inhibitor and in the CY-09 group were  $(2.0 \pm 0.4) \times 10^2$  and  $(5.1 \pm 0.3) \times 10^2$ , respectively.

So, PRR-activation, in our case activation of TLR4 in the model based on subcutaneous immunization or NLRP3 in the model based on intranasal antigen administration with BaP suppressed the production of allergen-specific IgE, but not IgG1. These data are in consistent with the hygiene theory of allergy development.

*Keywords: IgE, TLR4, NLRP3, benzo(a)pyrene, small molecule inhibitors, mouse allergy model*

Исследование выполнено при поддержке проекта РНФ № 23-25-10044 и бюджета города Москвы.

## Введение

Стремительный рост частоты встречаемости патологий, связанных с продукцией IgE на безвредные антигены, является одним из вызовов, стоящих перед современной медициной [2]. Одной из главных гипотез, объясняющих рост встречаемости патологий данного рода, является так называемая «гигиеническая гипотеза». Согласно данной гипотезе при уменьшении частоты встреч организма с бактериальными и вирусными патогенами, при уменьшении разнообразия антигенов, с которым организм сталкивается в течение жизни, в том числе антигенов, активирующих PRR-рецепторы, происходит смещение равновесия иммунологических реакций в сторону 2-го типа иммунного ответа [14]. Таким образом, организм начинает «неправильно» реагировать на безвредные антигены, чем-то отдаленно похожие на антигены потенциально опасных патогенов. Вместо ответа на потенциально опасные патогены по механизму 1-го типа иммунного ответа, запускаются реакции на безвредные белки преимущественно по механизму 2-го типа иммунного ответа [15]. Интересно, что некоторые белковые аллергены, несмотря на то, что не содержат в своем составе классических агонистов TLR, способны их активировать. В качестве примера можно привести аллерген клещей домашней пыли Der f2, способный активировать TLR4 [12]. В классическом модельном аллергене овальбумине (OVA) примести, являющиеся классическими агонистами TLR (LPS) и активирующие TLR4 [13].

В то же время роль активации TLR в патогенезе продукции аллерген-специфических антител и локального аллергического воспаления не однозначна. Достаточно большое количество работ указывает на то, что активация TLR, в частности TLR4, служит одним из триггеров локального аллергического воспаления [1]. В то же время существуют работы, согласно которым блокирование TLR4 ухудшает общую клиническую картину воспаления (в частности усиливает локальное накопление эозинофилов в ткани легких) [9].

Еще одним PRR, с которым часто связывают формирование локального аллергического воспаления, является NLRP3 инфламасома. Роль этого внутриклеточного PRR в формировании аллергического воспаления показана во многих работах [3]. Обычно к активации NLRP3 приводят изменение концентрации внутриклеточных ионов  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ; активные формы кислорода (АФК); дестабилизация мембран лизосом с выходом содержимого в цитоплазму, например,

под действием кристаллов мочевой кислоты, холестерина, фосфата кальция, частиц асбеста или кремнезема [3, 4]. В то же время существует и другая точка зрения, согласно которой NLRP3-инфламасома не влияет на формирование аллергического воспаления, по крайней мере адаптивного аллергического иммунного ответа [8].

**Целью настоящей работы** было показать роль TLR4-рецептора и NLRP3-инфламасомы в формировании продукции аллерген-специфических антител в двух моделях аллергии с использованием специфических низкомолекулярных ингибиторов этих рецепторов — TLR4-IN-C34 и CY-09 соответственно. В первой модели аллергического гуморального ответа животным вводили модельный аллерген OVA интраназально с аэрополлютантом бензо(а)пиреном (BaP). Во второй модели использовали подкожную иммунизацию в область холки без дополнительных стимулов, как описано нами в работе [7].

## Материалы и методы

### Иммунизация и забор образцов

Мыши линии BALB/c, самки, в возрасте 6-7 недель были приобретены в Научном центре биомедицинских технологий (Андреевка, Россия). Животные содержались в клетках с использованием опилок в качестве подстилки и доступом к воде и корму *ad libitum* при 12-часовом цикле свет-темнота. Все эксперименты на животных были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC) Института биоорганической химии имени Шемякина и Овчинникова РАН (протокол № 147/2021).

В качестве модельного антигена использовался коммерческий белок овальбумин (OVA) (Sigma-Aldrich, Дармштадт, Германия), содержащий в своем составе не более 0,04 EU LPS на 10 мкг белка по результатам LAL-теста.

В работе использовались две модели аллергии. В первой модели животные были иммунизированы подкожно в область холки. Модельный антиген овальбумин (OVA) вводился в дозе 0,1 мкг в физиологическом растворе объемом 0,1 мл. Введение осуществлялось 3 раза в неделю первые 2 недели и по 2 раза в неделю в последующие. Во второй модели иммунизация проводилась интраназально. OVA вводился в дозе 0,3 мкг в физиологическом растворе в объеме 50 мкл. Введение осуществлялось 2 раза в неделю в течение 8 недель. Вместе с OVA части животным вводился аэрополлютант BaP в дозе 4 нг. Для оценки роли активации TLR4 и NLRP3 в формировании гуморального ответа на вводимый аллерген части животным опытных групп вводили ингибиторы этих рецепторов — TLR4-IN-C34 [6] в дозе

1 мг/кг и СУ-09 [15] в дозе 20 мг/кг соответственно. В качестве отрицательного контроля служили интактные животные, а также животные, иммунизированные носителем (физиологическим раствором).

Забор крови для оценки уровня продукции специфических антител проводился из подглазничного синуса. Образцы крови инкубировали при +37 °С 20 минут до образования тромба, который затем отделялся от сыворотки центрифугированием при 600 g. Сыворотки хранили при -20 °С до момента использования.

#### Постановка иммуноферментного анализа (ИФА)

В лунки 96-луночного планшета (Costar, MaxiSorb) наносили 50 мкл раствора OVA в PBS pH = 7,2 и оставляли инкубироваться на 18 часов при +4 °С. При постановке ИФА на определение специфического IgE использовали раствор с концентрацией белка 20 мкг/мл, а при постановке на специфический IgG1 – 5 мкг/мл. Между стадиями проводили трехкратную отмывку раствором Твин-20 0,05% в PBS. Блокирование осуществляли раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) объемом 100 мкл в PBS концентрации 5% при определении специфического IgE, или 1% при определении специфического IgG1. Инкубацию с блокирующим буфером осуществляли в течение часа. Затем в лунки наносились сыворотки в различном разведении в соответствующем блокирующем буфере. Инкубацию с сыворотками осуществляли на ночь при +4 °С. Далее наносились коммерческие конъюгаты антител. При определении специфических IgE использовали анти-мышинные IgE, меченые пероксидазой хрена (ПХ) (клон 23G3, Abcam, Великобритания) в разведении 1:2000 и инкубировали в течение 3 часов. Для определения специфического IgG1 использовали меченые биотином антитела (клон RMG1-1, BioLegend, США) в разведении 1:5000. В качестве вторичного конъюгата в последнем случае добавляли на завершающей стадии конъюгат ПХ со стрептавидином (BioLegend, США) в разведении 1:7000. Проявление реакции осуществляли с использованием субстрата на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) в присутствии 4 mM перекиси водорода. Оптическая плотность измерялась с помощью автоматического спектрофотометра (Thermo Fisher Scientific, США), на длине волны 450 нм за вычетом оптической плотности при 620 нм как фоновой. За титр сыворотки принималось наибольшее ее разведение, при котором оптическая плотность согласно титровочной кривой превышала фоновую на 3 стандартных отклонения последней.

#### Статистика

Все результаты представлены в виде средних значений и соответствующих величин стандарт-

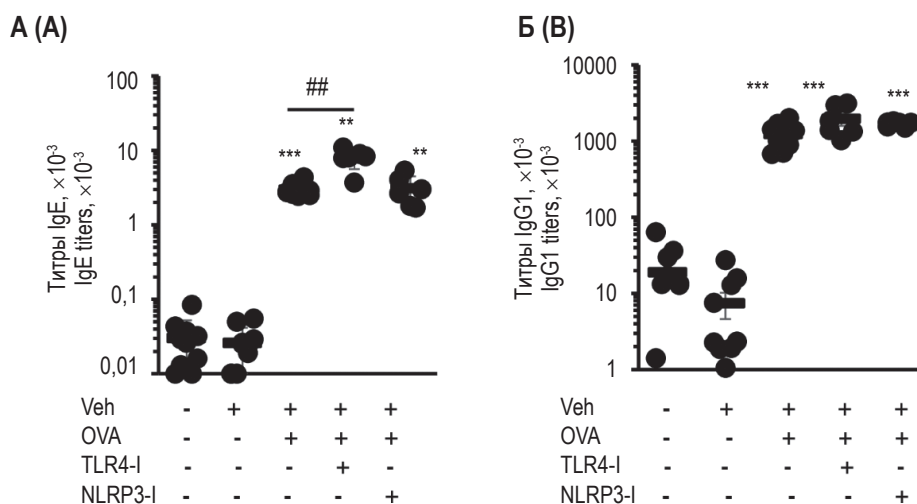
ного отклонения. Статистическую значимость различий между группами определяли с использованием теста ANOVA с поправкой на множественное сравнение по методу Sidak. Значения  $p$  по данному тесту, эквивалентные  $p < 0,05$  с поправкой на множественное сравнение, считали статистически достоверными.

## Результаты и обсуждение

Для того чтобы выяснить роль TLR4 и NLRP3 PRR-рецепторов в формировании аллергенспецифического гуморального ответа, в данной работе использовали низкомолекулярные фармакологические ингибиторы. Для изучения роли TLR4 использовали ингибитор TLR4-IN-C34 [6], а для изучения роли NLRP3 – ингибитор СУ-09 [15].

Введение антигена животным в модели подкожной иммунизации в область холки достоверно стимулировала у последних продукцию специфических антител классов IgE и IgG1, как было показано нами ранее [7] (рис. 1). Дополнительное введение вместе с антигеном ингибитора TLR4-IN-C34 достоверно ( $p < 0,01$ ) и существенно усиливало продукцию OVA специфического IgE. Продукция специфического IgE повысилась примерно в 2,5 раза (значения титров в группе без ингибитора и с ингибитором, соответственно,  $2950 \pm 180$  и  $8000 \pm 1000$ ) (рис. 1А). В то же время достоверного влияния на продукцию специфического IgG1 обнаружено не было (титры соответственно  $1,23 \pm 0,14 \times 10^6$  и  $1,9 \pm 0,4 \times 10^6$ ) (рис. 1Б). Ингибитор инфламмосомы СУ-09 не оказывал достоверного влияния на продукцию аллергенспецифических антител в данной модели (рис. 1).

Известно, что частицы, являющиеся продуктами неполного сгорания дизельного топлива, индуцируют формирование локального воспаления при попадании в легкие [5]. В данной работе был использован основной действующий компонент подобных частиц – бензо(а)пирен (BaP). В модели аллергии с использованием интраназального протокола достоверная в сравнении с группой, иммунизированной физраствором, продукция аллерген-специфических антител возникала только в группах, которым вводили BaP. Аэрополлютант достоверно повышал продукцию специфического IgE ( $p < 0,05$ ). Также под действием BaP повышалась продукция аллерген-специфических IgG1 ( $p < 0,01$ ) (рис. 2). Продукция специфического IgE под действием BaP возрастала более чем в 2 раза (титры в группе с антигеном без BaP и с BaP соответственно  $80 \pm 30$  и  $200 \pm 40$  соответственно), а продукция специфического IgG1 более чем в 10 раз (титры  $0,10 \pm 0,04 \times 10^6$  и  $1,2 \pm 0,3 \times 10^6$  соответственно) (рис. 2).



**Рисунок 1. Влияние ингибиторов TLR4 и NLRP3 на гуморальный ответ в модели аллергии с подкожной иммунизацией**

**Примечание.** Продукция специфических антител класса IgE (А) и IgG1 (Б) у мышей линии BALB/c после 6 недель иммунизации физиологическим раствором (Veh, «носитель») без антигена, OVA в дозе 0,1 мкг без ингибиторов, а также с ингибитором TLR4 рецептора TLR4-IN-C34 в дозе 1 мг/кг или с ингибитором NLRP3 рецептора CY-09 в дозе 20 мг/кг. \*/\*\*/\*\*\* –  $p < 0,05/0,01/0,001$  при сравнении с животными, которым вводили только физиологический раствор; ### –  $p < 0,05/0,01$  при сравнении с животными, иммунизированными антигеном без ингибитора.

Figure 1. Effect of TLR4 and NLRP3 inhibitors on humoral response in a subcutaneous allergy model

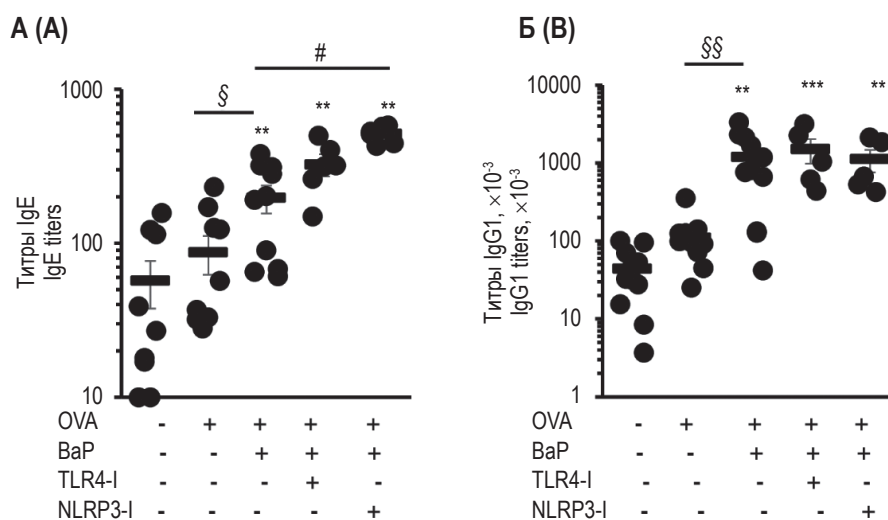
Note. Production of specific antibodies of the IgE (A) and IgG1 (B) classes in BALB/c mice after 6 weeks of immunization with saline solution (Veh, “vehicle”) without antigen, with OVA at a dose of 0.1  $\mu\text{g}$  without inhibitors, and also in the presence of TLR4 receptor inhibitor TLR4-IN-C34 at a dose of 1 mg/kg or with the NLRP3 receptor inhibitor CY-09 at a dose of 20 mg/kg. \*/\*\*/\*\*\*,  $p < 0.05/0.01/0.001$  significance of the difference when compared with saline immunized mice; ###,  $p < 0.05/0.01$  significance of the difference when compared with mice immunized by OVA without inhibitors.

В данной модели ингибитор TLR4-IN-C34 не оказывал достоверного влияния на продукцию аллерген-специфических антител. Напротив, ингибитор NLRP3 инфламмосомы CY-09 достоверно ( $p < 0,05$ ) повышал продукцию аллерген-специфических антител класса IgE. Повышение было довольно значительным, почти в 3 раза, титры в группе без ингибитора и с ингибитором соответственно  $200 \pm 40$  и  $500 \pm 20$  (рис. 2А). В то же время достоверного влияния на продукцию специфического IgG1 этот компонент не оказывал (титры в группе без ингибитора и с ингибитором соответственно  $1,2 \pm 0,3 \times 10^6$  и  $1,1 \pm 0,4 \times 10^6$  соответственно).

Таким образом, роль активации TLR4 присутствует в модели с использованием подкожной иммунизации, а роль NLRP3 инфламмосомы в модели с использованием интраназальной иммунизации и аэрополююганта.

Роль TLR4 в формировании локального аллергического воспаления и продукции аллерген-специфических антител показана во многих работах, например [1], другое дело что данная роль

неоднозначна. Однако существуют работы, где показана и его ингибирующая роль в развитии патологического процесса [9]. Эффект сильно зависит от количества агониста TLR4 LPS, содержащейся как примесь в белковых аллергенах. В настоящей работе нами показано, что активация TLR4 в процессе аллергического воспаления, блокировавшаяся низкомолекулярным ингибитором TLR4-IN-C34, подавляла продукцию специфического IgE в модели с подкожной иммунизацией. Ингибитор достоверно и примерно в 2 раза усиливал продукцию белок-специфического IgE, но не IgG1 в данной модели, но не в модели с интраназальным введением аллергена. Используемый нами OVA содержал минимальные примеси LPS (0,04 EU в 10 мкг белка), что, возможно, было достаточно для слабой активации TLR4. Однако активировать TLR4 способен не только LPS, но также некоторые белковые алармины, высвобождающиеся из повреждаемых клеток, такие как HMGB1 [10]. Скорее всего, эффект был обусловлен именно ими.



**Рисунок 2.** Влияние ингибиторов TLR4 и NLRP3 на гуморальный ответ в модели аллергии с интраназальной иммунизацией

**Примечание.** Продукция специфических антител класса IgE (А) и IgG1 (Б) у мышей линии BALB/c после 8 недель иммунизации антигеном OVA в дозе 0,3 мкг без дополнительных стимулов и ингибиторов, OVA в присутствии BaP в дозе 4 нг, а также OVA и BaP с ингибитором TLR4-рецептора TLR4-IN-C34 в дозе 1 мг/кг или с ингибитором NLRP3-рецептора CY-09 в дозе 20 мг/кг. \*/\*\*/\*\*\* –  $p < 0,05/0,01/0,001$  при сравнении с животными, которым вводили только физиологический раствор; §/§§ –  $p < 0,05/0,01$  при сравнении животных, иммунизированных антигеном с BaP и без него; ### –  $p < 0,05/0,01$  при сравнении с животными, иммунизированными антигеном без ингибитора.

Figure 2. Effect of TLR4 and NLRP3 inhibitors on the humoral response in the allergy model with intranasal immunization

Note. Production of specific antibodies of the IgE (A) and IgG1 (B) classes in BALB/c mice after 8 weeks of immunization with the OVA antigen at a dose of 0.3  $\mu$ g without additional stimuli and inhibitors, with OVA in the presence of BaP at a dose of 4 ng, and OVA and BaP with the TLR4 receptor inhibitor TLR4-IN-C34 at a dose of 1 mg/kg or with the NLRP3 receptor inhibitor CY-09 at a dose of 20 mg/kg. \*/\*\*/\*\*\*,  $p < 0.05/0.01/0.001$  significance of the difference when compared with saline immunized mice; §/§§,  $p < 0.05/0.01$  significance of difference when compared the groups immunized by antigen with and without BaP; ###,  $p < 0.05/0.01$  significance of the difference when compared with mice immunized by OVA without inhibitors.

Напротив, роль активации NLRP3-инфлам- масомы присутствовала в модели с использо- ванием интраназальной иммунизации. В этом случае эффект ингибитора CY-09 также носил стимулирующий характер и проявлялся только в отношении продукции специфического IgE (подъем продукции в 2,5 раза), но не IgG1. Это, казалось бы, противоречит литературным дан- ным, показавшим необходимость активации NLRP3-инфламмосомы для развития аллерги- ческого воспаления [3]. Возможное объяснение заключается в том, что в некоторых условиях ак- тивация NLRP3-инфламмосомы может вызвать особый вид клеточной смерти – пироптоз, свя- занный с формированием больших пор в цито- плазматической мембране с участием гасдермина D [4]. При этом пироптоз может наблюдаться не только в макрофагах, но и в В-лимфоцитах [11]. В-лимфоцитах он возможен при действии на них высоких доз фактора BAFF при условии отсут- ствия параллельной стимуляции В-клеточного рецептора антигеном, процесс зависит от форми-

рования АФК и выхода ионов  $K^+$  из клеток [11]. В том случае, если предшественники  $IgE^+$ В- лимфоцитов и плазматических клеток, либо сами эти клетки, подвергались подобному процессу, ингибирование NLRP3-инфламмосомы могло способствовать их выживаемости.

Важно отметить, что в обоих случаях эффект низкомолекулярных ингибиторов проявлялся именно в отношении продукции специфических IgE. Таким образом, разработка и использование мягких агонистов TLR4 и NLRP3 представляется нам перспективной для использования в методе аллерген-специфической иммунотерапии.

## Заключение

Таким образом, ингибитор TLR4 и NLRP3 повышали продукцию специфического IgE соот- ветственно в модели с использованием подкож- ной иммунизации и в модели с использованием интраназальной иммунизации соответственно. Достоверного влияния на продукцию специфи- ческих IgG1 не было.

## Список литературы / References

1. Белоглазов В.А., Лугачев Б.И. Молекулярные механизмы роли Толл-подобных рецепторов 4-го типа и убиквитин-модифицирующего фермента A20 в патогенезе бронхиальной астмы // Иммунология, 2019. Т. 40, № 1. С. 61-66. [Beloglazov V.A., Lugachyov B.I. Molecular mechanisms of the role of Toll-like receptors type 4 and ubiquitin-modifying enzyme A20 in the pathogenesis of bronchial asthma. *Immunologiya = Immunologiya*, 2019, Vol. 40, no 1, pp. 61-66. (In Russ.)]
2. Захарова И.А. Распространенность бронхиальной астмы среди лиц молодого возраста, проживающих в крупном промышленном городе // Казанский медицинский журнал, 2014. Т. 95, № 4. С. 548-552. [Zakharova I.A. Prevalence of bronchial asthma among young people living in a large industrial city. *Kazanskiy medicinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2014, Vol. 95, no. 4, pp. 548-552. (In Russ.)]
3. Пирожков С.В., Литвицкий П.Ф. Роль инфламмосом в патогенезе социально-значимых заболеваний человека // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2008. Т. 62, № 1. С. 77-89. [Pirozhkov S.V., Litvickij P.F. The role of inflammasomes in the pathogenesis of socially significant human diseases. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy*, 2008, Vol. 62, no. 1, pp. 77-89. (In Russ.)]
4. Русецкая Н.Ю., Логинова Н.Ю., Покровская Е.П., Чесовских Ю.С., Титова Л.Е. Редокс-регуляция NLRP3-опосредованного воспаления и пироптоза // Биомедицинская химия, 2023. Т. 69, № 6. С. 333-352. [Ruseckaya N.Yu., Loginova N.Yu., Pokrovskaya E.P., Chesovskih Yu.S., Titova L.E. Redox regulation of NLRP3-dependent inflammation and pyroptosis. *Biomedicinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2023, Vol. 69, no. 6, pp. 333-352. (In Russ.)]
5. Сопрун Л.А., Акулин И.М., Лукашенко М.В., Чурилов Л.П., Старшинова А.А., Яблонский П.К. Твердые пылевые частицы и проблема их определения при бронхолегочной патологии (обзор литературы) // Медицинский альянс, 2019. Т. 7, № 4. С. 69-76. [Soprun L.A., Akulin I.M., Lukashenko M.V., Churilov L.P., Starshinova A.A., Yablonskiy P.K. Solid dust particles and the problem of their determination in bronchopulmonary pathology (literature review). *Medicinskiy aliyans = Medical Alliance*, 2019, Vol. 7, no. 4, pp. 69-76. (In Russ.)]
6. Chen Y., Li D., Sun L., Qi K., Shi L. Pharmacological inhibition of toll-like receptor 4 with TLR4-IN-C34 modulates the intestinal flora homeostasis and the MyD88/NF- $\kappa$ B axis in ulcerative colitis. *Eur. J. Pharmacol.*, 2022, Vol. 934, 175294. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.175294.
7. Chudakov D.B., Kotsareva O.D., Konovalova M.V., Tsaregorodtseva D.S., Shevchenko M.A., Sergeev A.A., Fattakhova G.V. Early IgE production is linked with extrafollicular B- and T-cell activation in low-dose allergy model. *Vaccines (Basel)*, 2022, Vol. 10, no. 6, 969. doi: 10.3390/vaccines10060969.
8. Hirota J.A., Gold M.J., Hiebert P.R., Parkinson L.G., Wee T., Smith D., Hansbro P.M., Carlsten C., VanEeden S., Sin D.D., McNaghy K.M., Knight D.A. The nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat protein 3 inflammasome/IL-1 receptor I axis mediates innate, but not adaptive, immune responses after exposure to particulate matter under 10  $\mu$ m. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2015, Vol. 52, no. 1, pp 96-105.
9. Hyde E.J., Wakelin K.A., Daniels N.J., Ghosh S., Ronchese F. Similar immune mechanisms control experimental airway eosinophilia elicited by different allergens and treatment protocols. *BMC Immunol.*, 2019, Vol. 20, 18. doi: 10.1186/s12865-019-0295-y.
10. Kim S., Kim S.Y., Pribis J.P., Lotze M., Mollen K.P., Shapiro R., Loughran P., Scott M.J., Billiar T.R. Signaling of high mobility group box 1 (HMGB1) through toll-like receptor 4 in macrophages requires CD14. *Mol. Med.*, 2013, Vol. 19, no. 1, pp. 88-98.
11. Lim K.-H., Chen L.-C., Hsu K., Chang C.-C., Chang C.-Y., Kao C.-W., Chang Y.-F., Chang M.-C., Chen C.G. BAFF-driven NLRP3 inflammasome activation in B cells. *Cell Death Dis.*, 2020, Vol. 11, 820. doi: 10.1038/s41419-020-03035-2.
12. Trompette A., Divanovic S., Visintin A., Blanchard C., Hegde R.S., Madan R., Thorne P.S., Wills-Karp M., Giovannini T.L., Weiss J.P., Karp C.L. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature*, 2009, Vol. 457, no. 7229, pp. 585-588.
13. Tsuchiya K., Siddiqui S., Risse P.-A., Hirota N., Martic J.G. The presence of LPS in OVA inhalations affects airway inflammation and AHR but not remodeling in a rodent model of asthma. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2012, Vol. 303, no 1, pp 54-63.

14. van Tilburg Bernandes E., Arrieta M.-C. Hygiene hypothesis in asthma development: is hygiene to blame? *Arch. Med. Res.*, 2017, Vol. 48, no 8, pp. 717-726.

15. Yang M., Zhao L. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor CY-09 ameliorates kidney injury in diabetic nephropathy by inhibiting NLRP3-inflammasome activation. *Curr. Med. Chem.*, 2023, Vol. 30, no 28, pp. 3261-3270.

---

**Авторы:**

**Чудаков Д.Б.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Государственный научный центр «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»» Российской академии наук, Москва, Россия

**Шустова О.А.** — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Государственный научный центр «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»» Российской академии наук, Москва, Россия

**Коновалова М.В.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Государственный научный центр «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»» Российской академии наук, Москва, Россия

**Величинский Р.А.** — инженер-исследователь лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Государственный научный центр «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»» Российской академии наук, Москва, Россия

**Фаттахова Г.В.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Государственный научный центр «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»» Российской академии наук, Москва, Россия

**Authors:**

**Chudakov D.B.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Shustova O.A.**, PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Konovallava M.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Velichinskii R.A.**, Research Engineer, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Fattakhova G.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 21.03.2024  
Отправлена на доработку 23.03.2024  
Принята к печати 25.03.2024

Received 21.03.2024  
Revision received 23.03.2024  
Accepted 25.03.2024



## **АЛЛЕРГИЯ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ (НА ПРИМЕРЕ КЛИНИЧЕСКОГО НАБЛЮДЕНИЯ)**

**Иванова О.Н., Иванова И.С.**

*Медицинский институт ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет», г. Якутск, Россия*

**Резюме.** Статья посвящена изучению причин формирования аллергических заболеваний у пациентов с ВИЧ на примере клинического случая. Пациентка Ц., 35 лет, находилась на диспансерном наблюдении в клинике «Виктори» с 2013 года по 2015 год с проявлениями кожной аллергии. В течение последующих четырех лет пациентка получала терапию при обострении атопического дерматита, придерживалась диеты с исключением молочных продуктов и говядины. Состояние пациентки можно было оценить как удовлетворительное, рецидивы атопического дерматита отмечались 2 раза после нарушений диеты. В 2017 году после незащищенного контакта пациентка заметила: слабость, снижение веса, сухость кожи и увеличение периферических лимфоузлов. В июне 2017 года пациентка обратилась к участковому педиатру, который выписал направление на общий анализ крови и мочи, анализ крови на СПИД и гепатиты. В результате обследования у пациентки выявлена ВИЧ-инфекция. Больная была обследована и пролечена в СПИД-центре города Якутска. С августа 2017 года пациентку беспокоит заложенность носа, чихание, слезотечение, головные боли.

В начале сентября 2017 года пациентка обратилась к аллергологу-иммунологу. Было проведено обследование: взят анализ крови на аллергоскрин панель № 1 и иммунограмму, риноцитогамму.

Были получены следующие результаты: по аллергоскрину № 1 – аллергия на березу 3.0, молоко 3.2, пшеничную муку 2.8. Данные риноцитогаммы от 28.09.2017: нейтрофилы 67 в п/зр, эозинофилы 10 в п/зр.

У людей, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), наблюдается высокий уровень аллергических состояний, включая аллергический ринит (сенную лихорадку), лекарственную аллергию и астму. Вирус ВИЧ заражает и разрушает CD4<sup>+</sup>T-клетки, тип белых кровяных телец. Это приводит к изменению иммунной функции, что способствует развитию аллергии, инфекций, рака и других иммунных проблем. У пациентки с ВИЧ-инфекцией, после выявления патологии наблюдается формирование и трансформация аллергических заболеваний. Формирование аллергопатологии у пациентов с ВИЧ связано с сниженным уровнем клеток CD4<sup>+</sup>, что является одним из факторов, способствующим развитию трансформации аллергии. Лечение аллергических заболеваний: бронхиальной астмы, атопического дерматита, аллергического ринита и аллергической крапивницы у пациентов с ВИЧ такое же, как у пациентов, не инфицированных ВИЧ. Следует избегать перорального приема глюкокортикостероидов ввиду иммунодепрессивного воздействия данной группы препаратов.

*Ключевые слова:* инфекция, пациентка, аллергия, иммунодефицит, препараты, патология, иммунитет

### **Адрес для переписки:**

Иванова Ольга Николаевна  
ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный  
университет»  
677018, Россия, Республика Саха (Якутия),  
ул. Крупской, 37.  
Тел.: 8 (914) 290-61-25.  
E-mail: olgadoctor@list.ru

### **Address for correspondence:**

Olga N. Ivanova  
North-Eastern Federal University  
37 Krupskaya St  
Yakutsk, Republic of Sakha  
677018 Russian Federation  
Phone: +7 (914) 290-61-25.  
E-mail: olgadoctor@list.ru

### **Образец цитирования:**

О.Н. Иванова, И.С. Иванова «Аллергия у ВИЧ-инфицированных пациентов (на примере клинического наблюдения)» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 227-230.  
doi: 10.46235/1028-7221-16601-AIH

© 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 "Allergy in HIV-Infected patients (on the example of clinical observation)", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 227-230.  
doi: 10.46235/1028-7221-16601-AIH

© Ivanova O.N., Ivanova I.S., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16601-AIH

## ALLERGY IN HIV-INFECTED PATIENTS (ON THE EXAMPLE OF CLINICAL OBSERVATION)

Ivanova O.N., Ivanova I.S.

Medical Institute, North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russian Federation

**Abstract.** The article is devoted to the study of the causes of the formation of allergic diseases in patients with HIV infection on the example of a clinical case. Patient C., 35 years old, was under medical supervision at the Victory Clinic from 2013 to 2015 with manifestations of skin allergies. Over the next four years, the patient received therapy for exacerbation of atopic dermatitis, followed a diet with the exception of dairy products and beef. The patient's condition could be assessed as satisfactory; relapses of atopic dermatitis were noted 2 times after a violation of the diet. In 2017, after an unprotected contact, the patient noticed: weakness, weight loss, dry skin and enlarged peripheral lymph nodes. In June 2017, the patient turned to the district pediatrician, who prescribed a referral for a general blood and urine test, a blood test for AIDS and hepatitis. As a result of the examination, the patient was diagnosed with HIV infection. The patient was examined and treated at the Yakutsk AIDS center. Since August 2017, the patient has been worried about nasal congestion, sneezing, watery eyes, and headaches. In early September 2017, the patient turned to an allergist-immunologist. An examination was conducted: a blood test was taken for allergoscreen panel No. 1 and an immunogram, rhinocytogram. The following results were obtained: according to allergoscreen No. 1, allergy to birch 3.0, milk 3.2, wheat flour 2.8. Rhinocytogram data from 09/28/2017: neutrophils 67 per-field and eosinophils 10 per-field. People infected with the human immunodeficiency virus (HIV) have high levels of allergic conditions, including allergic rhinitis (hay fever), drug allergies and asthma. The HIV virus infects and destroys CD4<sup>+</sup>T cells, a type of white blood cell. This leads to a change in immune function, which contributes to the development of allergies, infections, cancer and other immune problems. In a patient with HIV infection, after the pathology is detected, the formation and transformation of allergic diseases is observed. The formation of allergopathology in HIV patients is associated with a reduced level of CD4<sup>+</sup> cells, which is one of the factors contributing to the development of allergy transformation. The treatment of allergic diseases such as: bronchial asthma, atopic dermatitis, allergic rhinitis and allergic urticaria in patients with HIV is the same as in patients not infected with HIV. Oral administration of glucocorticosteroids should be avoided due to the immunosuppressive effects of this group of drugs.

*Keywords:* infection, patient, allergy, immunodeficiency, drugs, pathology, immunity

### Введение

Изучение проявлений аллергии у пациентов с ВИЧ является актуальной проблемой современной медицины. У людей с ВИЧ отмечен высокий уровень проявлений аллергии. Различные исследования также показывают, что люди, инфицированные ВИЧ, имеют высокий процент положительных результатов при кожном тестировании на аллергию по сравнению с людьми без ВИЧ-инфекции [1, 2, 3, 4, 5]. При ВИЧ наблюдается учащение симптомов астмы. У больных ВИЧ отмечаются проявления аллергической крапивницы, атопического дерматита, аллергического ринита и бронхиальной астмы [4, 6].

Эти исследования показывают, что люди с ВИЧ-инфекцией особенно восприимчивы к раздражающему воздействию табачного дыма [1, 2, 3].

Эти проблемы не являются показанием к отсрочке или избеганию лечения ВИЧ. ВИЧ —

смертельное заболевание, если его не лечить, но с хрипами и другими симптомами астмы можно справиться. Требуется дополнительное исследование, чтобы лучше понять связь между лечением от ВИЧ и симптомами астмы [4].

**Цель исследования** — продемонстрировать трансформацию аллергических заболеваний у пациентки с ВИЧ-инфекцией.

### Материалы и методы

Амбулаторные карты поликлиники, амбулаторные карты клиник «Виктори» и «Аврора» города Якутск с 2013 по 2023 годы.

Пациентка Ц., 35 лет находилась на диспансерном наблюдении в клинике «Виктори» с 2013 года по 2015 год с проявлениями кожной аллергии. По результатам аллерготестирования в 2013 году пациентки выявлена аллергия на молоко+++ . В общем анализе крови от 5.04.2013: гемоглобин

(HGB) – 120 г/л (РИ: 115-145 г/л); эритроциты (RBC) –  $4,37 \times 10^{12}$ /л (РИ:  $3,7-4,9 \times 10^{12}$ /л); тромбоциты (PLT) –  $350 \times 10^9$ /л (РИ:  $150 - 400 \times 10^9$ /л); лейкоциты (WBC) –  $11,8 \times 10^9$ /л (РИ:  $5,5 - 14,5 \times 10^9$ /л); лимфоциты (LYMF) – 29,1% (РИ 19-37%); моноциты –  $0,4 \times 10^9$ /л (РИ:  $0,05 - 0,4 \times 10^9$ /л); палочкоядерные нейтрофилы – 2% (РИ: 1-6%); сегментоядерные нейтрофилы – 60% (РИ: 32-55%); эозинофилы – 9% (РИ: 0-5%); определение СОЭ по Панченкову – 11 мм/ч (РИ: 1-15 мм/ч). Заключение по анализу: повышение уровня эозинофилов.

Результаты иммунограммы: иммуноглобулин А – 0,9 г/л (РИ: 0,7-3,0 г/л); иммуноглобулин М – 1,2 мг/мл (РИ: 0,6-2,00 мг/мл); иммуноглобулин G – 15,2 мг/мл (РИ: 8,00-16,26 мг/мл); иммуноглобулин E – 122 ЕД/мл (РИ: 0-100 ЕД/мл); CD3<sup>+</sup> 65,00% (РИ: 62,0-69,0%); CD4<sup>+</sup> 35,00% (РИ: 28,1-65,0%); CD8<sup>+</sup> 27,00% (РИ: 26,0-68,0%). Заключение по анализу: отмечается повышение иммуноглобулина E.

Биохимический анализ крови от 5.09.2023: аланинаминотрансфераза 10,3 ед/л (РИ: 00-29,00 ед/л), аспаратаминотрансфераза 29,4 ед/л (РИ: 00-36 ед/л), альбумин 35,5 г/л (РИ: 38,00-54,00 г/л), билирубин общий 9,00 мкмоль/л (РИ: 3,4-7,1 мкмоль/л), ферритин 9,77 мкг/л (РИ: 7,00-140,00 мкг/л), фосфор 1,67 ммоль/л (РИ: 1,46-1,78 ммоль/л), общий белок 68,9 г/л (РИ: 60,00-80,00 г/л), мочевины 5,8 ммоль/л (РИ: 1,8-6,4 ммоль/л), глюкоза 3,08 ммоль/л (РИ: 3,3-5,6 ммоль/л), железо 9,7 мкмоль/л (РИ: 8,95-21,48 мкмоль/л), кальций общий 2,4 ммоль/л (РИ: 2,2-2,7 ммоль/л). Заключение: снижение содержания альбумина крови.

В течение последующих четырех лет пациентка получала терапию при обострении atopического дерматита, придерживалась диеты с исключением молочных продуктов и говядины. Состояние пациентки можно было оценить как удовлетворительное, рецидивы atopического дерматита отмечались 2 раза после нарушений диеты. В 2017 году после незащищенного контакта пациентка заметила: слабость, снижение веса, сухость кожи и увеличение периферических лимфоузлов. В июне 2017 года пациентка обратилась к участковому педиатру, который выписал направление на общий анализ крови и мочи, анализ крови на СПИД и гепатиты. В результате обследования у пациентки выявлена ВИЧ-инфекция. Больная была обследована и пролечена в СПИД-центре города Якутска. С августа 2017 года пациентку беспокоит заложенность носа, чихание, слезотечение, головные боли.

В начале сентября 2017 года пациентка обратилась к аллергологу-иммунологу. Было проведено

обследование: взят анализ крови на аллергоскрин панель № 1 и иммунограмму, риноцитогамму.

Были получены следующие результаты: по аллергоскрину № 1 – аллергия на березу 3,0, молоко – 3,2, пшеничную муку – 2,8. Данные риноцитогаммы от 28.09.2017 нейтрофилы 67 в п/зр, эозинофилы 10 в п/зр.

Результаты иммунограммы: иммуноглобулин А – 0,9 г/л (РИ: 0,7-3,0 г/л); иммуноглобулин М – 1,2 мг/мл (РИ: 0,6-2,00 мг/мл); иммуноглобулин G – 15,2 мг/мл (РИ: 8,00-16,26 мг/мл); иммуноглобулин E – 252 ЕД/мл (РИ: 0-100 ЕД/мл); CD3<sup>+</sup> 65,00% (РИ: 62,0-69,0%); CD4<sup>+</sup> 25,00% (РИ: 28,1-65,0%); CD8<sup>+</sup> 27,00% (РИ: 26,0-68,0%). Заключение: снижение субпопуляции CD4<sup>+</sup> 25,00%.

В течение последующих двух лет пациентка придерживалась диеты: с исключением пшеничной муки, молочных продуктов, косточковых фруктов, меда, орехов и т. д.

В течение 2018-2020 гг. пациентка весной и осенью страдала от проявлений аллергического ринита и конъюнктивита. Получала терапию назонекс (авамис) и синглон в дозе 10 мг в сутки в течение 3 суток два раза в год (весна и лето).

В 2021 году, в период пандемии гриппа, пациентка получила прививку против инфекции COVID-19. Через день после получения вакцины у пациентки появилась одышка при ходьбе, затрудненное дыхание. Пульмонолог назначил обследование: определение общего иммуноглобулина E и спирометрию. По результатам обследования был выявлен уровень иммуноглобулина E 1670 МЕ/мл, а также заключение спирометрии: нарушение вентиляции по рестриктивному типу. ОФВ1 снижено до 30% от ЖЕЛ. Проба с бронходилататорами положительная. Пациентке поставлен диагноз «бронхиальная астма, atopическая форма средней степени тяжести, обострение». Назначено лечение: Симбикорт 4.5/160 2 раза в сутки 6 мес., затем монтелар 10 мг 1 таблетка на ночь 3 мес.

В 2022 году у пациентки на фоне нарушения диеты: съела медовый торт и выпила вина на празднике – были отмечены высыпания по типу крапивницы и отек губ и ушей. Пациентке был поставлен диагноз: L50.0 «Аллергическая крапивница, отек Квинке». Пациентке внутривенно капельно введен дексаметазон 4 мг, супрастинекс 1 табл. на ночь до 10 дней, полисорб 1 столовая ложка 3 раза в день 10 дней. На второй день пациентка почувствовала себя лучше – отек спал.

Таким образом, у людей, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), наблюдается высокий уровень аллергических состояний, включая аллергический ринит (сенную лихорадку), лекарственную аллергию и астму.

## Результаты и обсуждение

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) – это инфекция, которая поражает иммунную систему организма, в частности белые кровяные тельца, называемые клетками CD4. ВИЧ разрушает эти клетки CD4, ослабляя иммунитет человека против оппортунистических инфекций, таких как туберкулез и грибковые инфекции, тяжелые бактериальные инфекции и некоторые виды рака [5]. В доступной литературе данные о развитии и трансформации аллергических заболеваний у больных ВИЧ немногочисленны, но это одно из грозных осложнений ВИЧ-инфекции. Лечение аллергии у больных ВИЧ требует дальнейшего изучения, с целью разработки стандартов лечения.

## Выводы

1. У пациентки с ВИЧ-инфекцией после выявления патологии наблюдается формирование аллергических заболеваний.

2. Формирование аллергопатологии у пациентов с ВИЧ связано со сниженным уровнем клеток CD4<sup>+</sup>, что является одним из факторов, способствующих развитию трансформации аллергии.

3. Лечение аллергических заболеваний: бронхиальной астмы, атопического дерматита, аллергического ринита и аллергической крапивницы у пациентов с ВИЧ, такое же, как у пациентов, не инфицированных ВИЧ. Назначение глюкокортикостероидов пациентам с ВИЧ проблематично ввиду иммунодепрессивного воздействия данной группы препаратов.

## Список литературы / References

1. Нора С.А., Архипов Г.С., Архипова Е.И., Никитина Н.Н. Иммуногенетические особенности коморбидности ВИЧ-инфекции и аллергии // Казанский медицинский журнал, 2021. Т. 102, № 6. С. 887-892. [Nora S.A., Arkhipov G.S., Arkhipova E.I., Nikitina N.N. Immunogenetic features of HIV infection and allergy comorbidity. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2021, Vol. 102, no. 6, pp. 887-892. (In Russ.)]
2. Нора С.А., Архипов Г.С., Архипова Е.И. Изучение показателей иммунного статуса у ВИЧ-инфицированных пациентов с сочетанной аллергической патологией // Казанский медицинский журнал, 2021. Т. 102, № 6. С. 821-826. [Nora S.A., Arkhipov G.S., Arkhipova E.I., The study of immune status indicators in HIV-infected patients with combined allergic pathology. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2021, Vol. 102, no. 6, pp. 821-826. (In Russ.)]
3. Нора С.А., Архипов Г.С. Диагностика аллергических заболеваний у ВИЧ-инфицированных пациентов с применением компьютерных технологий // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии, 2022. Т. 14, № 1. С. 121-127. [Nora S.A., Arkhipov G.S. Diagnosis of allergic diseases in HIV-infected patients using computer technology. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppression*. 2022, Vol. 14, no. 1, pp. 121-127. (In Russ.)]
4. Семенова Н.С., Шабанова А.В., Нора С.А., Трофимова Т.С. ВИЧ-инфекция и аллергозы: ретроспективный анализ коморбидности на территории Новгородской области // Вестник Новгородского государственного университета, 2022. № 1 (126). С. 34-37. [Semenova N.S., Shabanova A.V., Nora S.A., Trofimova T.S. HIV infection and allergoses: a retrospective analysis of comorbidity in the Novgorod region. *Vestnik Novgorodskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of the Novgorod State University*, 2022, no. 1 (126), pp. 34-37. (In Russ.)]
5. European AIDS Clinical Society Guidelines. Version 8.2 2017. 96 p. (<http://www.who.int/hiv>)
6. Guidelines on when to start antiretroviral therapy and pre-exposure prophylaxis for HIV. WHO, September 2015. Available at on the WHO. doi: 10.1093/ofid/ofv126 (<https://www.researchgate.net/publication/281619496>).

---

### Авторы:

**Иванова О.Н.** – д.м.н., член РАЕН, Союза педиатров России, Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов, главный внештатный аллерголог-иммунолог Министерства здравоохранения Республики Саха (Якутия), профессор кафедры педиатрии и детской хирургии, Медицинский институт ФГАУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет», г. Якутск, Россия

**Иванова И.С.** – студентка Медицинского института ФГАУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет», г. Якутск, Россия

### Authors:

**Ivanova O.N.**, PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Natural Sciences, Union of Pediatricians of Russia, Russian Association of Allergists and Subsequent Immunologists, Mainly Freelance Allergist-Immunologist of the Ministry of Health of the Republic of Sakha (Yakutia), Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Surgery, Medical Institute, North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russian Federation

**Ivanova I.S.**, Student, Medical Institute, North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russian Federation

---

Поступила 17.03.2024

Отправлена на доработку 19.03.2024

Принята к печати 05.04.2024

---

Received 17.03.2024

Revision received 19.03.2024

Accepted 05.04.2024

# ВЫЯВЛЕНИЕ IgE-ОПОСРЕДОВАННОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ У ДЕТЕЙ МЕТОДАМИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО И ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Соколова Т.Ф.<sup>1</sup>, Щеглова Е.Л.<sup>1</sup>, Соколов Е.Ю.<sup>2</sup>, Емельянов Ю.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», г. Омск, Россия

<sup>2</sup> Научно-клинический центр «Карповка», Санкт-Петербург, Россия

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

**Резюме.** Нашей целью было определение частоты выявления и структуры причинно-значимой сенсibilизации к основным группам аллергенов у детей с аллергическими заболеваниями в Сибири при оценке результатов методами иммуноферментного и иммунофлуоресцентного анализа. Всего обследовано 968 детей с аллергическим ринитом, бронхиальной астмой, крапивницей, аллергическим дерматитом, проходящими лечение в консультативно-диагностическом центре аллергологии и иммунологии ГДКБ № 2 им. В.П. Бисяриной г. Омска. В лаборатории клинической иммунологии была проведена диагностика образцов сыворотки крови и определены аллергенспецифические концентрации IgE к 109 аллергенам, включая пищевые аллергены (молоко, яйцо, мясо, рыба, крупы, фрукты, овощи), бытовые аллергены (эпидермальные домашних животных, пыль и клещей домашней пыли, плесневые грибы), ингаляционные антигены (трава, деревья). Обследование 435 детей проведено методом иммуноферментного анализа, 533 детей – методом непрямой иммунофлуоресценции. Проведенное исследование выявило преобладание у детей с аллергическими заболеваниями в Сибири IgE-опосредованной сенсibilизации на бытовые аллергены, которые были выявлены у 33,7% обследованных. IgE-опосредованная сенсibilизация на ингаляционные и пищевые аллергены встречалась в 1,5 раза реже. Самым распространенным причинно-значимым аллергеном среди бытовых являлась домашняя пыль (90%), перхоть и эпителий животных (86%), клещи домашней пыли (13,5%), плесневые грибы (1,4%). Наиболее распространенным причинно-значимым аллергеном среди пылевых оказались аллергены деревьев (47,8%), злаковые (23,5%) и сорные травы (20,1%). Установлено наличие поливалентной сенсibilизации с преимущественным сочетанием бытовых и респираторных аллергенов и более редким сочетанием бытовых и пищевых аллергенов. Уровень специфических IgE антител в сыворотке крови большинства обследованных детей с аллергическими заболеваниями в Сибири был высоким и одинаково хорошо выявлялся как методом иммуноферментного анализа, так и методом иммунофлуоресценции на аппарате Phadia ImmunoCAP. При низкой концентрации специфических IgE в сыворотке крови наибольшей чувствительностью обладал метод ImmunoCAP.

## Адрес для переписки:

Щеглова Елена Леонидовна  
ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский  
университет»  
644043, Россия, г. Омск, ул. Ленина, 12.  
Тел.: 8 (999) 459-18-47.  
E-mail: eleon\_74@mail.ru

## Address for correspondence:

Elena L. Scheglova  
Omsk State Medical University  
12 Lenin St  
Omsk  
644043 Russian Federation  
Phone: +7 (999) 459-18-47.  
E-mail: eleon\_74@mail.ru

## Образец цитирования:

Т.Ф. Соколова, Е.Л. Щеглова, Е.Ю. Соколов,  
Ю.В. Емельянов «Выявление IgE-опосредованной  
сенсibilизации у детей методами иммуноферментного  
и иммунофлуоресцентного анализа» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 231-236.  
doi: 10.46235/1028-7221-16710-IOI

© Соколова Т.Ф. и соавт., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

T.F. Sokolova, E.L. Scheglova, E.Yu. Sokolov,  
Yu.V. Emelyanov "Identification of IgE-mediated sensitization  
in children by enzyme immunoassay and immunofluorescence  
methods", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 231-236.  
doi: 10.46235/1028-7221-16710-IOI

© Sokolova T.F. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16710-IOI

Возможность сочетания и рационального использования методов ИФА и ImmunoCAP повышают качество диагностики аллергических заболеваний у детей и ее доступность в регионах Сибири.

*Ключевые слова:* дети, аллергические заболевания, пищевые аллергены, бытовые аллергены, ингаляционные антигены, иммуноглобулин E, методы ИФА, ImmunoCAP

## IDENTIFICATION OF IgE-MEDIATED SENSITIZATION IN CHILDREN BY ENZYME IMMUNOASSAY AND IMMUNOFLUORESCENCE METHODS

Sokolova T.F.<sup>a</sup>, Scheglova E.L.<sup>a</sup>, Sokolov E.Yu.<sup>b</sup>, Emelyanov Yu.V.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Scientific and Clinical Center "Karpovka", St. Peterburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The goal of research was to determine the frequency of detection and the structure of causally significant sensitization to the main groups of allergens in children with allergic diseases in Siberia when evaluating the results by enzyme immunoassay and immunofluorescence analysis. We researched 968 children with allergic rhinitis, bronchial asthma, urticaria, and/or allergic dermatitis undergoing treatment at the Consultative and Diagnostic Center for Allergology and Immunology, GDKB No. 2 named after V.P. Bisyarina of Omsk. Blood serum samples were diagnosed in the laboratory of clinical immunology. Also, the allergen-specific IgE concentrations were determined for 109 allergens, including food allergens (milk, egg, meat, fish, cereals, fruits, vegetables), household allergens (epidermal pets, dust and house dust mites, molds), and inhaled antigens (grass, trees). Analysis of 435 children was carried out by enzyme immunoassay, and 533 children by indirect immunofluorescence. The research revealed the predominance in children with allergic diseases in Siberia of IgE-mediated sensitization to household allergens, which were detected in 33.7% of the examined. IgE-mediated sensitization to inhalation and food allergens was 1.5 times less common. According to our research, the most common causative allergen among households was house dust (90%), dandruff and animal epithelium (86%), house dust mites (13.5%), and molds (1.4%). The most common causative allergen among pollen was tree allergens (47.8%), cereals (23.5%) and weeds (20.1%). The presence of multivalent sensitization with a predominant combination of household and respiratory allergens and a rarer combination of household and food allergens has been experimentally established.

*Keywords:* children, allergic diseases, food allergens, household allergens, inhaled antigens, immunoglobulin E, ELISA, ImmunoCAP

### Введение

Аллергические заболевания занимают ведущие позиции в общей структуре нозологий и характеризуются глобальным ростом [9]. В последние 20-30 лет становится все более очевидным увеличение количества аллергических заболеваний [4]. Эта тенденция свойственна большинству стран, в том числе отмечается она и в нашей стране. По данным Всемирной организации здравоохранения аллергические заболевания являются одной из наиболее значимых проблем, особенно в педиатрии: у детей данная патология по распространенности занимает второе место и по прогнозам ВОЗ в XXI веке аллергические и иммунодефицитные заболевания по распространенности выйдут на первое место. Кроме того, повсеместно отмечается увеличение частоты тяжелых аллергических реакций, полисенсibilизации и все более раннее начало клинических проявлений,

которые могут возникать у ребенка даже в возрасте нескольких месяцев жизни и в дальнейшем прогрессировать [5]. Эпидемиологические исследования, проведенные за последние десятилетия в различных регионах России, показали высокую (от 15% до 35%) распространенность аллергии, особенно у лиц детского возраста, и высокую вариабельность частоты сенсibilизации к определенным аллергенам и частоты симптомов аллергических заболеваний в различных географических регионах, обусловленную климатогеографическими, экологическими факторами, стилем жизни, уровнем здравоохранения [2, 3, 4, 8]. Так, в центральной полосе России поллиноз чаще связан с сенсibilизацией к пыльце злаковых трав, деревьев, сорных трав. На юге России основные аллергены амброзия, полынь, подсолнечник, кукуруза. В Сибири в спектре сенсibilизации преобладает пыльца деревьев и злаков.

В странах центральной Европы ведущая роль в этиологии поллинозов принадлежит злаковым травам и деревьям, в северной Европе — злакам и сорнякам, в южной Европе — деревьям, кустарникам и травам, в США — амброзии.

Выявление IgE-опосредованной сенсублизации с определением уровня IgE, являющихся одними из ключевых молекул в патогенезе аллергических болезней, в созданных тест-системах, позволяющих определять не только общую концентрацию IgE, а также выявлять аллергенспецифические IgE в биологических жидкостях значительно расширили возможности диагностики аллергий. [5]. Определение общего уровня IgE и концентрации аллергенспецифических IgE позволило проводить обследование пациентов в период обострения заболевания, на фоне приема антигистаминных препаратов, при выраженном поражении кожных покровов, низком пороге кожной чувствительности, а также обследовать беременных женщин с неспецифической кожной чувствительностью и детей любого возраста. Благодаря развитию технологии иммуноферментного и иммунофлуоресцентного анализа стало возможным точное количественное определение содержания антител класса E (IgE) в сыворотке крови пациентов. Современные технологии ИФА отличаются экономической доступностью, простотой эксперимента, универсальностью оборудования для всех ИФА-тестов, высокой чувствительностью и специфичностью, возможностью полноценной автоматизации ИФА-исследований. Наряду с этим, золотым стандартом аллергодиагностики, согласно Всемирной Организацией Здравоохранения, является метод ImmunoCAP. Метод ImmunoCAP обладает большей чувствительностью при низкой концентрации аллергенов в крови. Метод ImmunoCAP сохраняет за собой лидирующее значение при необходимости точного количественного определения концентрации IgE.

В связи с этим проведение своевременной и квалифицированной диагностики аллергопатологий с учетом региональных особенностей структуры причинно-значимой сенсублизации, ее распространенности на тот или иной аллерген, а также выбором наиболее адекватного в конкретных условиях метода исследования становится наиболее актуальным.

**Цель исследования** — определить частоту выявления и структуру причинно-значимой сенсублизации к основным группам аллергенов (пищевых, пыльцевых, бытовых, эпидермальных) у детей с аллергическими заболеваниями в Сибири при оценке результатов методами иммуноферментного и иммунофлуоресцентного анализа.

## Материалы и методы

В консультативно-диагностическом центре аллергологии и иммунологии ГДКБ №2 им.

В.П. Бисяриной г. Омска было обследовано 968 детей с аллергическим ринитом, бронхиальной астмой, крапивницей, аллергическим дерматитом в возрасте от 6 месяцев до 18 лет. В лаборатории клинической иммунологии всем детям была проведена диагностика образцов сыворотки крови *in vitro* и определены аллергенспецифические концентрации IgE к 109 аллергенам, включая пищевые аллергены (молоко, яйца, мясо, рыба, крупы, фрукты, овощи), бытовые аллергены (эпидермальные домашних животных, пыль и клещей домашней пыли, плесневые грибы), ингаляционные антигены (трава, деревья).

Иммунологическое обследование 435 детей с аллергическими заболеваниями проводили методом иммуноферментного анализа с использованием ИФА-анализатора Bio-Rad (США) и реагентов Dr. Foote (Германия).

Наряду с ИФА основные аллерготесты у 533 детей проводили методом непрямой иммунофлуоресценции на анализаторе ImmunoCAP 250 (Швеция). По данным производителя, порог чувствительности анализатора составляет 0,01 кЕ/л, граница cut-off для специфических IgE принята равной 0,35 кЕ/л.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ Statistica 8,0 for Windows. Анализ характера распределения данных осуществляли по критерию Шапиро—Уилка. Использовали параметрические методы (t-критерий Стьюдента). Критический уровень значимости  $p$  принимался равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

Проведенное исследование выявило, что среди обследованных детей с аллергическими заболеваниями в Сибири преобладала IgE-опосредованная сенсублизация на бытовые аллергены: компоненты пыли жилища, микроклещи, перхоть и эпителий животных, сапрофиты и условно-патогенные плесени. Специфические IgE были выявлены у 33,7% обследованных на данный вид аллергенов. IgE-опосредованная сенсублизация на ингаляционные и пищевые аллергены встречалась реже, в 22,9% и 19,5% соответственно. Самым распространенным причинно-значимым аллергеном среди бытовых являлась домашняя пыль, специфические IgE к которым были выявлены в 90% (ИФА), затем следовали перхоть и эпителий животных — 86% (ИФА), клещи домашней — 13,5% (ИФА), 12,3% (ImmunoCAP), плесневые грибы — 1,4% (ИФА). Наиболее распространенным причинно-значимым аллергеном среди пыльцевых оказались аллергены деревьев (47,8% — ИФА, 28,4% — ImmunoCAP) за исключением тополя (4,5% и 0%), затем злаковых (23,5% и 22,1%) и сорных трав (20,1% и 27,4%).

Диагностическая значимость исследований зависела от их объема. При обследовании пациента на 1 предполагаемый аллерген положительный результат был выявлен лишь у 22%, на 2-5 аллергенов – у 50%, 6-10 аллергенов – 81%, более 11 аллергенов – 100%. Между объемом обследования и количеством выявленных причинно-значимых аллергенов наблюдалась прямая зависимость. Отмечено частое сочетание бытовых и респираторных аллергенов (71,5%), реже бытовых и пищевых (14,3%), бытовых и гельминтов (11,9%). Сочетание пищевых и респираторных аллергенов наблюдалось в 1,4%.

При сопоставлении результатов выявления специфических IgE методами ИФА и ImmunoCAP статистически значимых различий между количеством выявленных причинно-значимых аллергенов данными методами не обнаружено (табл. 1, 2). Процент положительных результатов в ИФА составил 76,1%, в ImmunoCAP – 79,8%.

Как видно из результатов исследования, наиболее частой причиной аллергических заболеваний у детей в Сибири являлись бытовые аллергены, с которыми связана IgE-опосредованная сенсibilизация у трети детей с аллергическими заболеваниями и прежде всего домашняя пыль. Домашняя пыль считается одним из наиболее активных ингаляционных аллергенов, гиперчувствительность к которой играет важную роль в развитии таких аллергических заболеваний, как аллергический ринит, бронхиальная астма, атопический дерматит [4]. Известно, что домашняя пыль по аллергенному составу многокомпонентна и ее аллергенный профиль могут определять клещевые, эпидермальные, грибковые, и другие инсектные аллергены, а также бактериальные, химические и прочие компоненты. Основным

компонентом домашней пыли в жилых помещениях г. Москвы являются клещи домашней пыли и их аллергены, обуславливающих распространенность аллергии к внутрижилищным инсектным аллергенам [1, 7]. Нами выявлено, что у детей с аллергическими заболеваниями в Сибири IgE-опосредованная сенсibilизация связана прежде всего с эпидермальными компонентами, источниками которых являются домашние животные, которые в 7 раз чаще, чем клещи, участвовали в создании высокого алергизирующего фона. Сенсibilизация к ингаляционным аллергенам домашних животных в настоящее время абсолютно правомерно считается одним из ключевых факторов риска аллергического ринита и бронхиальной астмы и в значительной степени определяет развитие тяжелых форм атопического дерматита и респираторных алергозов [10, 11, 12]. При этом в отличие от других причин, вызывающих у больных симптомы аллергических заболеваний, в случае гиперчувствительности к аллергенам домашних животных элиминация последних зачастую связана с внутренним сопротивлением со стороны больных и их родственников, считающих домашних питомцев полноценными членами семьи. Безусловно, различные аспекты рассматриваемой проблемы связаны с огромным количеством безосновательных утверждений, ведущих к неадекватной профилактике и терапии, а также негативно отражающихся на социальной активности больных и их семей [4]. Иная картина наблюдалась у детей с аллергическими заболеваниями в Сибири, в основе которых лежала IgE-опосредованная сенсibilизация к ингаляционным и пищевым аллергенам, которые в 1,5 раза реже являлись причиной аллергии, чем бытовые. При этом наиболее распространенными

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МЕТОДОВ ИФА И ImmunoCAP

TABLE 1. QUANTITATIVE CHARACTERIZATION OF THE SENSITIVITY OF ELISA AND ImmunoCAP

Концентрация специфического IgE Specific IgE concentration	Методы исследования Research methods	
	ИФА Linked immunosorbent assay	ImmunoCAP
<b>Сверхвысокая</b> Superhigh	<b>&gt; 100 МЕ/мл</b> > 100 IU/mL	<b>&gt; 100 кЕд/л</b> > 100 kU/L
% выявления % of detection	10%	8%
<b>Средняя, высокая</b> Medium, high	<b>1,0-99,9 МЕ/мл</b> 1.0-99.9 IU/mL	<b>0,7-99,9 кЕд/л</b> 0.7-99.9 kU/L
% выявления % of detection	75%	73%
<b>Низкая</b> Low	<b>0,5-1,0 МЕ/мл</b> 0.5-1.0 IU/mL	<b>0,35-0,79 кЕд/л</b> 0.35-0.70 kU/L
% выявления % of detection	15%	19%



ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВО СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE-АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЕЙ

TABLE 2. NUMBER OF SPECIFIC IgE ANTIBODIES IN SERUM IN CHILDREN WITH ALLERGIES

Классы IgE-антител (референсные значения kU/L) IgE antibody classes (kU/L reference values)	Уровень антител Antibody level	Методы исследования Research methods		Процент совпадений Match percentage
		ИФА, МЕ/мл Linked immunosorbent assay, IU/ mL	ImmunoCAP, kU/L	
0 (< 0,34)	Отрицательный Negative	–	< 0,34	–
1a (0,351-0,490)	Низкий Low	< 0,5	0,39±0,01	–
1в (0,50-0,69)	Низкий Low	0,61±0,08	0,57±0,03	93,4
2 (0,70-3,49)	Средний Medium	2,92±0,15	3,21±0,11	91,0
3 (3,50-17,49)	Высокий High	8,72±0,41	9,02±0,38	96,6
4 (17,50-49,99)	Очень высокий Superhigh	30,70±0,81	29,20±0,68	95,1
5 (50,0-99,9)	Насыщенно высокий Saturated high	78,80±1,18	71,90±1,30	91,2
6 (> 100,0)	Крайне высокий Extremely high	100±0	100±0	100

Примечание. Классы, интерпретация результатов согласно стандартной классификации; kU/L = МЕ/мл = 2,4 нг/л.

Note. Classes, interpretation of results according to standard classification; kU/L = IU/mL = 2.4 ng/L.

среди ингаляционных были аллергены деревьев. Контакт с аллергенами злаковых и сорных трав в 2 раза реже, чем с аллергенами деревьев являлся причиной атопии.

## Заключение

В результате исследований структуры причинно-значимой сенсibilизации при аллергических заболеваниях у части детей в Сибири было установлено наличие поливалентной сенсibilизации с преимущественным сочетанием бытовых и респираторных аллергенов, и более редким сочетанием бытовых и пищевых аллергенов.

Следует отметить, что уровень специфических IgE антител в сыворотке крови большинства об-

следованных детей с аллергическими заболеваниями в Сибири был высоким и одинаково хорошо выявлялся как методом ИФА, так и методом ImmunoCAP. При низкой концентрации специфических IgE в сыворотке крови наибольшей чувствительностью обладал метод ImmunoCAP, который сохраняет за собой лидирующее значение при необходимости точного количественного определения содержания IgE, особенно при низкой их концентрации. Возможность сочетания и рационального использования методов ИФА и ImmunoCAP повышают качество диагностики аллергических заболеваний у детей и ее доступность в регионах Сибири.

## Список литературы / References

1. Ахапкина И.Г., Желтикова Т.М. Сравнительный анализ содержания клещей домашней пыли и их аллергенов в жилых помещениях г. Москвы // Иммунология, 2013. № 2. С. 108-111. [Akhapkina I.G., Zheltikova T.M. A comparative analysis of the content of house dust mites and their allergens in residential premises of Moscow. *Immunologiya = Immunology*, 2013, no. 2, pp. 108-111. (In Russ.)]
2. Байшева М.Г., Дьячкова А.А., Прокопьева А.А., Хлопенкова О.В. Характеристика распространенности аллергических заболеваний и инвалидности больных бронхиальной астмой в республике Мордовия за период 2019-2021 г. // Клиническая больница, 2023. № 4 (39). С. 5-9. [Baysheva M.G., Dyachkova A.A., Prokopieva A.A., Khlopenkova O.V. Characteristics of allergic diseases and disability of patients of the prevalence with bronchial asthma in the republic of Mordovia for the period 2019-2021. *Klinicheskaya bolnitsa = Clinical Hospital*, 2023, no. 4 (39), pp. 5-9. (In Russ.)]

3. Знаменская Л.К., Тришина С.В., Гостищева Е.В., Реган О.В. Опыт применения алергенспецифической иммунотерапии (асит) препаратом антиполлин микст сорных трав-2 в лечении сезонного аллергического ринита, вызванного пыльцой сорных трав // Таврический медико-биологический вестник, 2023. Т. 26, № 1. С. 22-26. [Znamenskaya L.K., Trishina S.V., Gostishheva E.V., Regan O.V. Application experience allergen-specific immunotherapy (ASIT) with the drug antipollin mixed weed herbs-2 in the treatment of seasonal allergic rhinitis caused by weed pollen. *Tavrisheskiy mediko-biologicheskii vestnik = Taurida of the Medical and Biological Bulletin*, 2023, Vol. 26, no. 1, pp. 22-26. (In Russ.)]
4. Мельникова К.С., Кувшинова Е.Д., Ревякина В.А. Аллергические заболевания в раннем возрасте // Педиатрия. Consilium Medicum, 2021. № 2. С. 141-145. [Melnikova K.S., Kuwshinova E.D., Reviakina V.A. Allergic diseases at an early age. *Pediatriya. Consilium Medicum = Pediatrics. Consilium Medicum*, 2021, no. 2, pp. 141-145. (In Russ.)]
5. Намазова-Баранова Л.С., Сновская М.А., Митюшин И.Л., Кожевникова О.В., Батырова А.С. Особенности диагностики аллергии у детей // Вестник РАМН, 2017. Т. 72, № 1. С. 33-41. [Namazova-Baranova L.S., Snovskaya M.A., Mityushin I.L., Kozhevnikova O.V., Batyrova A.S. Features of the diagnosis of allergies in children. *Vestnik RAMN = Bulletin of RAMS*, 2017, Vol. 72, no. 1, pp. 33-41. (In Russ.)]
6. Пампура А.Н., Варламов Е.Е., Конюкова Н.Г. Сенситизация к алергенам домашних животных // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2018. Т. 63, № 2. С. 22-26. [Pampura A.N., Varlamov E.E., Konnyukova N.G. Sensitization to pet allergens. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2018, Vol. 63, no. 2, pp. 22-26. (In Russ.)]
7. Петрова С.Ю., Халгатын С.В., Бержец В.М., Емельянова О.Ю. Десятилетнее наблюдение за сенситизацией к клещам домашней пыли // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2021. Т. 98: online-first. [Petrova S.Yu., Khlgtatyan S.V., Berzhets V.M., Emelyanova O.Yu. Ten-year monitoring of sensitization to house dust mites. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2021, Vol. 98: online-first. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-49.
8. Перевощикова Н.К., Гладков С.Ф., Черных Н.С. Возможности профилактики аллергических заболеваний с учетом региональных особенностей // Мать и дитя в Кузбассе, 2017. Т. 69, № 2. С. 38-46. [Perevoshchikova N.K., Gladkov S.F., Chernykh N.S. Possibilities for the prevention of allergic diseases, taking into account regional characteristics. *Mat i ditya v Kuzbasse = Mother and Child in Kuzbass*, 2017, Vol. 69, no. 2, pp. 38-46. (In Russ.)]
9. Хабибулина Л.Р., Власова Н.В., Манжос М.В., Кавеленова Л.М. Анализ роли алергокомпонентов в комплексной диагностике поллиноза и прогнозировании эффективности алерген-специфической иммунотерапии // РМЖ, 2019. № 3. С. 7-10. [Khabibulina L.R., Vlasova N.V., Manzhos M.V., Kavelenova L.M. Blood analysis of allergic components in the comprehensive diagnosis of hay fever and predicting the effectiveness of allergen-specific immunotherapy. *RMZh = Russian Medical Journal*, 2019, no. 3, pp. 7-10. (In Russ.)]
10. Asarnej A., Hamsten C., Waden K., Lupinek C., Andersson N., Kull I., Curin M., Anto J., Bousquet J., Valenta R., Wickman M., van Hage M. Sensitization to cat and dog allergen molecules in childhood and prediction of symptoms of cat and dog allergy in adolescence: A BAMSE/MeDALL study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 137, no 3, pp. 813-821.
11. Konraden J.R., Fujisawa T., van Hage M., Hedlin G., Hilger C., Kleine-Tebbe J., Matsui E.C., Roberts G., Rönmark E., Platts-Mills T.A.E. Allergy to furry animals: New insights, diagnostic approaches, and challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 135, no. 3, pp. 616-625.
12. Pyrhonen K., Nayha S., Laara E. Dog and cat exposure and respective pet allergy in early childhood. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2015, Vol. 26, no. 3, pp. 247-255.

**Авторы:**

**Соколова Т.Ф.** — д.м.н., доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», г. Омск, Россия

**Щеглова Е.Л.** — к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», г. Омск, Россия

**Соколов Е.Ю.** — к.м.н., врач-психотерапевт Научно-клинического центра «Карповка», Санкт-Петербург, Россия

**Емельянов Ю.В.** — к.м.н., доцент кафедры психотерапии Института клинической психологии и социальной работы; ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Sokolova T.F.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

**Scheglova E.L.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathological Physiology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

**Sokolov E. Yu.**, PhD (Medicine), Psychotherapist, Scientific and Clinical Center "Karpovka", St. Petersburg, Russian Federation

**Emelyanov Yu.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Psychotherapy, Institute of Clinical Psychology and Social Work, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.03.2024

Отправлена на доработку 30.03.2024

Принята к печати 08.04.2024

Received 29.03.2024

Revision received 30.03.2024

Accepted 08.04.2024

# РАСТВОРИМЫЙ РЕЦЕПТОР КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ КАК НОВЫЙ БИОМАРКЕР БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ: КРАТКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ

Терещенко С.Ю., Смольникова М.В., Горбачева Н.Н.

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

**Резюме.** В последние годы внимание исследователей все чаще привлекает рецептор конечных продуктов гликозилирования (RAGE), который играет важную роль в различных заболеваниях, связанных с деструкцией тканей, метаболическими и нейродегенеративными процессами, инфекциями, иммунными реакциями и воспалением различного генеза. Особенно актуальным становится изучение растворимой формы этого рецептора (sRAGE) как потенциального биомаркера для диагностики и мониторинга бронхиальной астмы (БА) у детей.

В данной статье представлен краткий обзор литературы, посвященной роли RAGE и его лигандов в патогенезе респираторных заболеваний, а также анализируются собственные данные по изучению уровней sRAGE у детей с БА.

Был обследован 101 ребенок в возрасте 7-18 лет страдающий БА, направленный в детский аллергологический центр (Красноярск, Россия). Дети с БА были разделены на три группы: контролируемая (n = 45), частично контролируемая (n = 19) и неконтролируемая астма (n = 37) в соответствии с GINA-2023. Контрольную группу составили 92 сопоставимых по возрасту и полу ребенка (практически здоровые дети без признаков инфекции или аллергии). Уровень sRAGE в сыворотке крови определяли с помощью магнитно-иммуноферментного анализа (MAGPIX, Luminex, США; Merk Millipore, США). Данные представлены в виде медианы (25-75% квартили). Использовался тест Краскела–Уоллиса.

Уровень сывороточного sRAGE был снижен только при неконтролируемой БА у обследованных детей (рис. 1, p (тест Краскела–Уоллиса) = 0,001). Кроме того, уровень sRAGE в сыворотке крови был снижен в группах обострения астмы, независимо от статуса обострения, вызванного вирусной инфекцией либо аллергенами.

## Адрес для переписки:

Смольникова Марина Викторовна  
Научно-исследовательский институт медицинских  
проблем Севера  
660022, Россия, г. Красноярск,  
ул. Партизана Железняка, 3г.  
Тел.: 8 (391) 228-06-81.  
E-mail: legise@mail.ru

## Address for correspondence:

Marina V. Smolnikova  
Research Institute of Medical Problems of the North  
3g Partizan Zheleznyak St  
Krasnoyarsk  
660022 Russian Federation  
Phone: +7 (391) 228-06-81.  
E-mail: legise@mail.ru

## Образец цитирования:

С.Ю. Терещенко, М.В. Смольникова, Н.Н. Горбачева  
«Растворимый рецептор конечных продуктов  
гликозилирования как новый биомаркер  
бронхиальной астмы у детей: краткий обзор  
литературы и собственные данные» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 237-242.  
doi: 10.46235/1028-7221-16663-SRF

© Терещенко С.Ю. и соавт., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

S.Yu. Tereshchenko, M.V. Smolnikova, N.N. Gorbacheva  
“Soluble receptor for advanced glycation endproducts (srage)  
as a new biomarker of asthma in children: a brief review  
of the literature and our own findings”, Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024,  
Vol. 27, no. 2, pp. 237-242.  
doi: 10.46235/1028-7221-16663-SRF

© Tereshchenko S.Yu. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16663-SRF

Уровень сывороточного sRAGE тесно связан с контролем астмы и состоянием обострения у детей с БА и может быть использован как новый маркер потери контроля над заболеванием и, возможно, как потенциальная мишень для терапевтического вмешательства.

*Ключевые слова:* бронхиальная астма, дети, рецептор конечных продуктов гликозилирования, патогенез, воспаление, биомаркеры

## SOLUBLE RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS (SRAGE) AS A NEW BIOMARKER OF ASTHMA IN CHILDREN: A BRIEF REVIEW OF THE LITERATURE AND OUR OWN FINDINGS

Tereshchenko S.Yu., Smolnikova M.V., Gorbacheva N.N.

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

**Abstract.** In recent years, the receptor of glycosylation end products (RAGE) has increasingly attracted the attention of researchers and plays an important role in various in various diseases associated with tissue destruction, metabolic and neurodegenerative processes, infections, immune reactions and inflammation of various origins. The study of the soluble form of this receptor (sRAGE) as a potential biomarker for the diagnosis and monitoring of bronchial asthma (BA) in children is becoming particularly relevant.

This article presents a brief review of the literature on the role of RAGE and its ligands in the pathogenesis of respiratory diseases, and analyzes our own data on the study of sRAGE levels in children with AD.

We examined 101 children aged 7-18 years suffering from AD referred to the Children's Allergy Center (Krasnoyarsk, Russia). Children with AD were divided into three groups: controlled (n = 45), partially controlled (n = 19) and uncontrolled asthma (n = 37) according to GINA-2023. The control group consisted of 92 age- and sex-matched children (virtually healthy children without signs of infection or allergy). Serum sRAGE levels were determined by magnetic immunoassay (MAGPIX, Luminex, USA; Merk Millipore, USA). Data are presented as median (25-75% quartiles). The Kruskal–Wallis test was used.

Serum sRAGE levels were reduced only in uncontrolled AD in the examined children (Figure 1, p (Kruskal–Wallis test) = 0.001). In addition, serum sRAGE levels were reduced in the asthma exacerbation groups, regardless of exacerbation status caused by viral infection or allergens.

Thus, serum sRAGE levels are closely related to asthma control and exacerbation status in children with AD in and may be used as a novel marker of loss of disease control and possibly as a potential target for therapeutic intervention.

*Keywords:* asthma, children, receptor for advanced glycation endproducts, pathogenesis, inflammation, biomarkers

Исследование выполнено в НИИ медицинских проблем Севера – обособленном подразделении ФИЦ КНЦ СО РАН в рамках Госзадания № 124020100065-3.

### Введение

Рецептор конечных продуктов гликозилирования (RAGE, receptor for advanced glycation endproducts) – это паттерн-распознающий мембранный рецептор суперсемейства иммуноглобулинов, который взаимодействует с большим количеством эндогенных лигандов, сопряженных с локальным и системным ответом организма на

деструкцию/дегенерацию тканей, инфекцию и воспаление [2, 5, 9]. Подробная классификация паттерн-распознающих рецепторов была представлена в нашем недавнем обзоре [1]. Известно, что в среди всех клеток организма человека наиболее высокую экспрессию RAGE имеют альвеолоциты 2-го типа. RAGE-лиганды включают в себя собственно конечные продукты гликозилирования, HMGB1 (high-mobility group box-1) протеин, сывороточный амилоид А (S100A12, serum amyloid A), β амилоид, семейство S100 протеинов и β2-интегрин (CD11b) и др. Взаимодействие RAGE с лигандами вызывает активацию иммун-

ного ответа, усиление воспалительной реакции, оксидативного стресса и ремоделинг тканей.

Известны две формы RAGE – мембранная и растворимая (sRAGE), которая может образовываться либо путем протеолитического отщепления, либо альтернативного РНК-сплайсинга. Классически, sRAGE является естественным антагонистом RAGE, ингибируя его рецепторопосредованные метаболические эффекты по механизму обратной связи. Фактически, sRAGE действует как ловушка для лигандов RAGE, подавляя воспаление и повреждение клеток.

Чрезвычайно интенсивному изучению подверглась роль метаболических процессов с участием RAGE за последние 5-10 лет. Многочисленными кросс-секциональными исследованиями показана протективная роль sRAGE при метаболических (диабете, в том числе гестационном, ожирении, метаболическом синдроме), нейродегенеративных (болезни Альцгеймера), сердечно-сосудистых и ревматологических заболеваниях [3]. Крупные популяционные исследования показывают обратную корреляцию плазменной концентрации sRAGE и индекса массы тела, концентрации С-реактивного протеина, гликированного гемоглобина и маркеров хронической болезни почек. Патофизиологическая роль таких взаимосвязей не установлена и является предметом интенсивного изучения и обсуждения.

В настоящее время накопилось большое количество экспериментальных данных, свидетельствующих о критической роли метаболической оси лиганды-RAGE-sRAGE в патогенезе многих хронических заболеваний респираторного тракта. Подробный анализ современного состояния проблемы участия RAGE, sRAGE и лигандов в патогенезе заболеваний респираторного тракта проведен в фундаментальном обзоре Sukkar и соавт. [12]. Основная часть исследований убедительно доказывает увеличение продукции лигандов с параллельным ростом экспрессии RAGE и снижением концентрации sRAGE при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Меньше данных о такой взаимосвязи при бронхиальной астме (БА), однако отдельные кросс-секциональные исследования показывают увеличение RAGE-лигандов (HMGB1) в плазме и мокроте пациентов с персистирующим аллергическим воспалением, что, как и в случае с ХОБЛ, отрицательно коррелирует с бронхиальной обструкцией (FEV1). Примечательно, что два недавних независимых Европейских “genome-wide” исследования убедительно показали наличие ассоциации варианта гена RAGE (SNP rs2070600) и степени бронхиальной обструкции у здоровых лиц по отношению FEV1/FVC [4, 10]. Исследование Sierra-Colomina и соавт. (2020) подчеркивает

противовоспалительные свойства sRAGE, указывая на его потенциал в регулировании иммунных реакций и воспаления, особенно в легочной ткани [11].

В настоящее время активно обсуждаются гипотезы связи метаболических процессов в оси лиганды-RAGE с формированием нейтрофильного характера воспаления респираторного тракта [12] и ремоделингом мелких бронхов под влиянием экзогенных поллютантов (сигаретного дыма и промышленных выбросов). Наконец, значительная часть исследований этого направления респираторной медицины посвящена участию RAGE и его лигандов в модуляции врожденного и адаптивного иммунного ответа. В частности, обсуждается роль взаимодействия RAGE и Toll-like рецепторов, участия лигандов RAGE в поляризации Т-хелперов в сторону формирования Th2 и Th17 паттернов с соответствующим цитокиновым спектром в нижних отделах респираторного тракта [8]. Не исключено, что RAGE-зависимый путь бактериального воспаления в нижних дыхательных путях реципрокно модулируется важными механизмами врожденного иммунитета, обеспечивающими противобактериальную защиту: нарушением лектинового пути активации комплемента (низкой функциональной активностью маннозосвязывающего лектина и фиколина), дисфункцией Toll-like рецепторов второго типа (TLR2) и молекул каскада TLR-активации (IRAK4, MYD88 и TIRAP).

Как указывалось выше, растворимая форма RAGE (sRAGE) действует как своеобразная ловушка для лигандов RAGE, подавляя воспаление и повреждение клеток, и была предложена в качестве нового биомаркера астмы. Снижение уровня sRAGE наблюдается при ХОБЛ и нейтрофильной астме [12]. Более того, уровни оксида азота (FeNO) и sRAGE в сыворотке крови отрицательно коррелируют у детей с рецидивирующими хрипами [7]. В исследовании, опубликованном в 2023 году, изучалось клиническое значение растворимого рецептора конечных продуктов гликирования в сыворотке крови для оценки состояния пациентов с БА [5]. Исследование было направлено на определение значимости уровня sRAGE в сыворотке крови при оценке тяжести бронхиальной астмы, предполагая, что sRAGE может служить потенциальным биомаркером тяжести астмы [5]. Исследование Birben и соавт. выявило ассоциации между полиморфизмами Gly82Ser и -374 T/A в гене RAGE с более низким уровнем sRAGE в плазме крови, что указывает на генетическое влияние на экспрессию sRAGE и его потенциальные последствия в механизмах формирования БА [2]. Патобиологические механизмы, связывающие sRAGE с астмой,

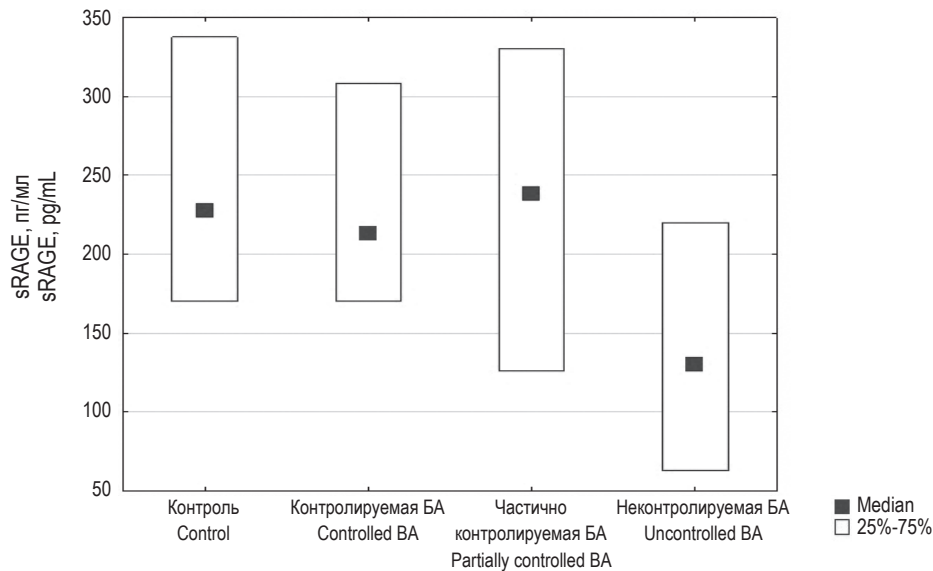


Рисунок 1. Уровень sRAGE в сыворотке крови при различной степени контроля БА у детей

Figure 1. Serum sRAGE levels at different degrees of asthma control in children

были дополнительно выяснены в исследовании с использованием менделевской рандомизации, в котором особое внимание уделялось иммунным компонентам, участвующим в патофизиологии астмы, с акцентом на роль RAGE [9]. Чрезвычайно интересное исследование было опубликовано исследователями из Нидерландов и Великобритании: авторам удалось показать, что рецидивирующие бронхиальные обструкции у детей раннего возраста ассоциированы с уже упоминавшейся мутацией гена RAGE (SNP rs2070600), ранее считавшейся исключительно генетическим маркером бронхообструктивных заболеваний взрослых [6].

Учитывая предполагаемую защитную роль sRAGE при астме, в нескольких исследованиях изучался его терапевтический потенциал. Sukkar и соавт. провели обзор данных, подтверждающих использование sRAGE в качестве терапевтической мишени при астме и других воспалительных заболеваниях [12]. Предполагается, что стратегии, направленные на повышение уровня sRAGE, такие как введение рекомбинантного sRAGE или использование малых молекулярных ингибиторов RAGE, могут стать перспективными терапевтическими подходами для лечения астмы.

**Целью настоящего исследования** было оценить уровень sRAGE в сыворотке крови в зависимости от степени контроля БА у детей.

## Материалы и методы

Был обследован 101 ребенок в возрасте 7-18 лет, страдающий БА (детский аллергологический центр, Красноярск, Россия). Дети с БА были разделены на три группы: контролируемая ( $n = 45$ ),

частично контролируемая ( $n = 19$ ) и неконтролируемая астма ( $n = 37$ ) в соответствии с GINA-2023. Контрольную группу составили 92 сопоставимых по возрасту и полу ребенка (практически здоровые дети без признаков инфекции или аллергии). Уровень sRAGE в сыворотке крови определяли с помощью магнитно-иммуноферментного анализа (MAGPIX, Luminex, США; Merk Millipore, США). Данные представлены в виде медианы (25-75% квартили). Использовался тест Краскела–Уоллиса.

## Результаты и обсуждение

Уровень сывороточного sRAGE был снижен только при неконтролируемой БА у обследованных детей (рис. 1,  $p$  (тест Краскела–Уоллиса) = 0,001). Кроме того, уровень sRAGE в сыворотке крови был снижен в группах обострения астмы, независимо от статуса обострения, вызванного вирусной инфекцией либо аллергенами: контрольная группа ( $n = 92$ ) – 227,5 (170-337,5) пг/мл, ремиссия ( $n = 67$ ) – 213 (157-320) пг/мл, вирусиндуцированное обострение ( $n = 15$ ) – 157 (63-242) пг/мл, аллерген-индуцированное обострение ( $n = 24$ ) – 128 (70,5-218) пг/мл,  $p$  (тест Краскела–Уоллиса) = 0,005.

## Заключение

Уровень сывороточного sRAGE тесно связан с контролем астмы и состоянием обострения у детей с БА и может быть использован как новый маркер потери контроля над заболеванием и, возможно, как потенциальная мишень для терапевтического вмешательства.

## Список литературы / References

1. Терещенко С., Смольникова М. Врожденные дисфункции паттерн-распознающих рецепторов в патогенезе инвазивной и рецидивирующей пневмококковой инфекции у детей // *Инфекция и иммунитет*, 2019. Т. 9, № 2. С. 229-238. [Congenital dysfunctions of pattern-recognizing receptors in the pathogenesis of invasive and recurrent pneumococcal infection in children. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, Vol. 9, no. 2, pp. 229-238. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-229-238.
2. Birben E., Şahiner Ü.M., Kalaycı C. Determination of the effects of advanced glycation end products receptor polymorphisms and its activation on structural cell responses and inflammation in asthma. *Turk. J. Med. Sci.*, 2023, Vol. 53, no. 1, pp. 160-170.
3. Delrue C., Delanghe J.R., Speeckaert M.M. The role of sRAGE in cardiovascular diseases. *Adv. Clin. Chem.*, 2023, Vol. 117, pp. 53-102.
4. Hancock D.B., Eijgelsheim M., Wilk J.B., Gharib S.A., Loehr L.R., Marcianti K.D., Franceschini N., van Durme Y.M.T.A., Chen T.-H., Barr R.G., Schabath M.B., Couper D.J., Brusselle G.G., Psaty B.M., van Duijn C.M., Rotter J.I., Uitterlinden A.G., Hofman A., Punjabi N.M., Rivadeneira F., Morrison A.C., Enright P.L., North K.E., Heckbert S.R., Lumley T., Stricker B.H.C., O'Connor G.T., London S.J. Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. *Nat. Genet.*, 2010, Vol. 42, no. 1, pp. 45-52.
5. Hu H., Hu X., Wang Z., Gao L., Jin J., Xia J., Huang L., Li S. Clinical value of serum soluble receptor for advanced glycation end products in evaluating the condition of patients with bronchial asthma. *Allergy Asthma Proc.*, 2023, Vol. 44, no. 4, pp. 258-264.
6. Kerkhof M., Boezen H.M., Granell R., Wijga A.H., Brunekreef B., Smit H.A., de Jongste J.C., Thijs C., Mommers M., Penders J., Henderson J., Koppelman G.H., Postma D.S. Transient early wheeze and lung function in early childhood associated with chronic obstructive pulmonary disease genes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 133, no. 1, pp. 68-76.e61-64.
7. Li Y., Wu R., Tian Y., Bao T., Tian Z. Fraction of exhaled nitric oxide and soluble receptors for advanced glycation end products are negatively correlated in children with recurrent wheezing. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 2017, Vol. 35, no. 1, pp. 33-37.
8. Moser B., Desai D.D., Downie M.P., Chen Y., Yan Sh.F., Herold K., Schmidt A.M., Clynes R. Receptor for advanced glycation end products expression on T cells contributes to antigen-specific cellular expansion in vivo. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 12, pp. 8051-8058.
9. Raita Y., Zhu Z., Freishtat R.J., Fujiogi M., Liang L., Patregiani J.T., Camargo C.A., Hasegawa K. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and asthma: Mendelian randomisation study. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2021, Vol. 32, no. 5, pp. 1100-1103.
10. Repapi E., Sayers I., Wain L.V., Burton P.R., Johnson T., Obeidat M., Zhao J.H., Ramasamy A., Zhai G., Vitart V., Huffman J.E., Igl W., Albrecht E., Deloukas P., Henderson J., Granell R., McArdle W.L., Rudnicka A.R.; Wellcome Trust Case Control Consortium; Barroso I., Loos R.J.F., Wareham N.J., Mustelin L., Rantanen T., Surakka I., Imboden M., Wichmann H.E., Grkovic I., Jankovic S., Zgaga L., Hartikainen A.-L., Peltonen L., Gyllenstein U., Johansson A., Zaboli G., Campbell H., Wild S.H., Wilson J.F., Gläser S., Homuth G., Völzke H., Mangino M., Soranzo N., Spector T.D., Polasek O., Rudan I., Wright A.F., Heliövaara M., Ripatti S., Pouta A., Naluai A.T., Olin A.C., Torén K., Cooper M.N., James A.L., Palmer L.J., Hingorani A.D., Wannamethee S.G., Whincup P.H., Smith G.D., Ebrahim S., McKeever T.M., Pavord I.D., MacLeod A.K., Morris A.D., Porteous D.J., Cooper C., Dennison E., Shaheen S., Karrasch S., Schnabel E., Schulz H., Grallert H., Bouatia-Naji N., Delplanque J., Froguel P., Blakey J.D.; NSHD Respiratory Study Team; Britton J.R., Morris R.W., Holloway J.W., Lawlor D.A., Hui J., Nyberg F., Jarvelin M.-R., Jackson C., Kähönen M., Kaprio J., Probst-Hensch N.M., Koch B., Hayward C., Evans D.M., Elliott P., Strachan D.P., Hall I.P., Tobin M.D. Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function. *Nat. Genet.*, 2010, Vol. 42, no. 1, pp. 36-44.
11. Sierra-Colomina M., García-Salido A., Leoz-Gordillo I., de Azagra-Garde A.M., Melen G., García-Teresa M.Á., Iglesias-Bouzas M., Nieto-Moro M., Ramírez-Orellana M., Serrano-González A. sRAGE as severe acute bronchiolitis biomarker, prospective observational study. *Pediatr. Pulmonol.*, 2020, Vol. 55, no. 12, pp. 3429-3436.
12. Sukkar M.B., Ullah M.A., Gan W.J., Wark P.A., Chung K.F., Hughes J.M., Armour C.L., Phipps S. RAGE: a new frontier in chronic airways disease. *Br. J. Pharmacol.*, 2012, vol. 167, no. 6, pp. 1161-1176.

### Авторы:

**Смольникова М.В.** — к.б.н., руководитель группы молекулярно-генетических исследований, ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

### Authors:

**Smolnikova M.V.**, PhD (Biology), Head, Molecular Genetic Research Group, Leading Research Associate, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Терещенко С.Ю.** — д.м.н., профессор, заведующий клиническим отделением соматического и психического здоровья детей, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

**Горбачева Н.Н.** — старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

**Tereshchenko S.Yu.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Clinical Department of Somatic and Mental Health of Children, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Gorbacheva N.N.**, Senior Research Associate, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

---

Поступила 27.03.2024  
Отправлена на доработку 29.03.2024  
Принята к печати 30.03.2024

Received 27.03.2024  
Revision received 29.03.2024  
Accepted 30.03.2024



## СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ В ЭПИКАРДИАЛЬНОЙ, ТИМУСНОЙ И ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ ВЫРАЖЕННОМ КОРОНАРНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Кологривова И.В.<sup>1</sup>, Дмитриуков А.А.<sup>1</sup>, Нарыжная Н.В.<sup>1</sup>,  
Кошельская О.А.<sup>1</sup>, Харитоновна О.А.<sup>1</sup>, Выросткова А.И.<sup>1</sup>,  
Евтушенко В.В.<sup>1</sup>, Крапивина А.С.<sup>1</sup>, Рябченко П.Е.<sup>2</sup>, Сулова Т.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

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

**Резюме.** Обсуждается важная роль эпикардиальной (ЭЖТ) и тимусной (ТЖТ) жировой ткани в развитии атеросклероза у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). Целью данной работы стало исследование субпопуляций лимфоцитов и свойств FoxP3<sup>+</sup>Treg-лимфоцитов в эпикардиальной, тимусной и подкожной жировой ткани в зависимости от выраженности коронарного атеросклероза у пациентов с хронической ИБС. Обследовано 24 пациента с ИБС (21 мужчина; средний возраст 65,0 (58,0-68,0) лет), имеющих показания для проведения хирургической операции на открытом сердце. В образцах ЭЖТ, ТЖТ и подкожной жировой ткани (ПЖТ) методом проточной цитометрии с визуализацией определяли содержание CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, В-лимфоцитов, NK- и NKT-клеток, а также оценивали долю CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>T-регуляторных лимфоцитов (Treg) и долю Treg с транслокацией FoxP3 в ядро. В зависимости от выраженности атеросклероза, оцененной по данным селективной ангиографии и расчетному индексу Gensini Score, пациенты были разделены на две группы: группа 1 – пациенты с Gensini Score < 65 баллов; группа 2 – пациенты с Gensini Score ≥ 65 баллов (наиболее выраженный и распространенный коронарный атеросклероз). В ЭЖТ для пациентов группы 2 было характерно большее относительное содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>Treg-клеток с внутриядерной транслокацией FoxP3, а в ТЖТ – большее содержание CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов и NK-клеток и меньшее – двойных позитивных CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов. Также в ТЖТ выявлена тенденция к снижению отно-

### Адрес для переписки:

Кологривова Ирина Вячеславовна  
Научно-исследовательский институт кардиологии  
634012, Россия, г. Томск, ул. Киевская, 111а.  
Тел.: 8 (913) 105-38-69.  
E-mail: ikologrivova@gmail.com

### Address for correspondence:

Irina V. Kologrivova  
Cardiology Research Institute  
111a Kievskaya St  
Tomsk  
634012 Russian Federation  
Phone: +7 (913) 105-38-69.  
E-mail: ikologrivova@gmail.com

### Образец цитирования:

И.В. Кологривова, А.А. Дмитриуков, Н.В. Нарыжная, О.А. Кошельская, О.А. Харитоновна, А.И. Выросткова, В.В. Евтушенко, А.С. Крапивина, П.Е. Рябченко, Т.Е. Сулова «Субпопуляции лимфоцитов в эпикардиальной, тимусной и подкожной жировой ткани при выраженном коронарном атеросклерозе у пациентов с ишемической болезнью сердца» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 243-252.  
doi: 10.46235/1028-7221-16594-LSI

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

### For citation:

I.V. Kologrivova, A.A. Dmitriukov, N.V. Naryzhnaya, O.A. Koshelskaya, O.A. Kharitonova, A.I. Vyrostkova, V.V. Evtushenko, A.S. Krapivina, P.E. Riabchenko, T.E. Suslova "Lymphocyte subsets in epicardial, thymic and subcutaneous adipose tissue during advanced coronary atherosclerosis in patients with coronary artery disease", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 243-252.  
doi: 10.46235/1028-7221-16594-LSI

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16594-LSI

сительного содержания CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Treg-клеток с внутриядерной транслокацией FoxP3 по сравнению с пациентами группы 1. Уровень ядерной транслокации FoxP3 в CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Treg-клетках ТЖТ был обратно взаимосвязан с долей CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов ( $r_s = -0,653$ ;  $p = 0,012$ ) и NK-клеток ( $r_s = -0,723$ ;  $p = 0,003$ ) в ТЖТ, и прямо – с долей двойных позитивных CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов в ТЖТ ( $r_s = 0,567$ ;  $p = 0,034$ ) и значением отношения окружности талии к окружности бедер ( $r_s = -0,474$ ;  $p = 0,041$ ). Требуется проведение дальнейших исследований для изучения молекулярных механизмов реализации данных взаимосвязей у пациентов с коронарным атеросклерозом и хронической ИБС.

*Ключевые слова:* FoxP3<sup>+</sup>T-регуляторные лимфоциты, субпопуляции лимфоцитов, NK-клетки, атеросклероз, эпикардальная жировая ткань, тимус

## LYMPHOCYTE SUBSETS IN EPICARDIAL, THYMIC AND SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE DURING ADVANCED CORONARY ATHEROSCLEROSIS IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE

Kologrivova I.V.<sup>a</sup>, Dmitriukov A.A.<sup>a</sup>, Naryzhnaya N.V.<sup>a</sup>,  
Koshelskaya O.A.<sup>a</sup>, Kharitonova O.A.<sup>a</sup>, Vyrostkova A.I.<sup>a</sup>,  
Evtushenko V.V.<sup>a</sup>, Krapivina A.S.<sup>a</sup>, Riabchenko P.E.<sup>b</sup>, Suslova T.E.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Abstract.** The important role of epicardial (EAT) and thymic (TAT) adipose tissue in the development of atherosclerosis in patients with coronary artery disease (CAD) is widely discussed. The purpose of the study was to investigate the lymphocyte subsets and FoxP3<sup>+</sup>Treg lymphocytes in epicardial, thymic and subcutaneous adipose tissue depending on the severity of coronary atherosclerosis in patients with chronic CAD. We examined 24 patients with CAD (21 men; mean age 65.0 (58.0–68.0) years) scheduled for open-heart surgery. In samples of EAT, TAT and subcutaneous adipose tissue (SAT), the content of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, B lymphocytes, NK and NKT cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>T regulatory lymphocytes (Treg) and a proportion of Tregs with FoxP3 nuclear translocation was determined by imaging flow cytometry. Depending on the severity of atherosclerosis, assessed according to Gensini Score, patients were divided into groups: group 1 – patients with Gensini Score < 65; group 2 – patients with Gensini Score ≥ 65. Patients in group 2 had higher frequency of EAT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>Treg with FoxP3 nuclear translocation, TAT CD8<sup>+</sup>T lymphocytes and NK cells, a lower content of TAT double positive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T lymphocytes, and a tendency towards a decrease of frequency of TAT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Treg with FoxP3 nuclear translocation compared to patients in group 1. The level of nuclear translocation of FoxP3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Treg cells in TAT was inversely related to the proportion of CD8<sup>+</sup>T lymphocytes ( $r_s = -0.653$ ;  $p = 0.012$ ) and NK cells ( $r_s = -0.723$ ;  $p = 0.003$ ) in TAT, and directly – to the proportion of double positive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in TAT ( $r_s = 0.567$ ;  $p = 0.034$ ) and the value of the waist-to-hip ratio ( $r_s = -0.474$ ;  $p = 0.041$ ). Further research is required to study the molecular mechanisms of these relationships in patients with coronary atherosclerosis and chronic coronary artery disease.

*Keywords:* FoxP3<sup>+</sup>T regulatory lymphocytes, lymphocyte subsets, NK cells, atherosclerosis, epicardial adipose tissue, thymus

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00010).

### Введение

В настоящее время важная роль жировой ткани в регуляции метаболизма, процессов ре-

продукции, иммунорегуляции и увеличения риска сердечно-сосудистых заболеваний является общепризнанной. Кроме того, установлено, что свойства различных жировых депо различаются как по характеристикам адипоцитов, основных клеточных элементов жировой ткани, так и по составу клеток стромально-сосудистой фракции

жировой ткани, которые очень тесно взаимодействуют с адипоцитами [4].

Отличительной чертой висцеральной жировой ткани является значительная доля в ней FoxP3<sup>+</sup>T-регуляторных (Treg)-лимфоцитов, которые в норме могут составлять до 50% от всех CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов [15]. FoxP3 является основным транскрипционным фактором Treg, что подразумевает необходимость его транслокации в ядро для участия Treg-лимфоцитов в подавлении иммунного ответа и воспаления [10]. В последнее время обсуждается наличие субпопуляций Treg-лимфоцитов с высокой и низкой экспрессией молекулы CD25 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg), которые, по-видимому, представляют собой клетки на различных стадиях зрелости. Причем увеличение доли клеток с низкой экспрессией CD25 оказалось характерным для пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями [2].

Следует признать, что для пациентов с сердечно-сосудистой патологией, в том числе атеросклеротической природы, важнейшую роль играет морфология и функциональная активность эпикардиальной жировой ткани (ЭЖТ) [3]. ЭЖТ непосредственно прилежит к ткани миокарда и имеет с ней общее кровоснабжение. Несмотря на то, что адипоциты ЭЖТ имеют морфологию, свойственную белой жировой ткани, они обладают рядом черт бурой жировой ткани, что определяет их уникальность [7]. У пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) ЭЖТ характеризуется более выраженным воспалением по сравнению с подкожной жировой тканью (ПЖТ) и висцеральными жировыми депо [7]. Однако на сегодняшний день получено крайне мало данных о вовлеченности лимфоцитарного звена иммунной системы в модуляцию воспаления в ЭЖТ у пациентов с ИБС, а также о взаимосвязи выраженности коронарного атеросклероза с долей иммуносупрессорных FoxP3<sup>+</sup>T-регуляторных лимфоцитов в составе стромально-сосудистой фракции ЭЖТ.

Жировая ткань тимуса (ТЖТ) представляет собой наименее изученное в функциональном аспекте депо жировой ткани, начиная с того, что отсутствует однозначное мнение о происхождении тимусных адипоцитов [9]. При этом показано, что тимус в зрелом возрасте сохраняет очаги функциональной активности. FoxP3<sup>+</sup>Treg-лимфоциты в свою очередь оказались способными к рециркуляции в тимус. Рециркулировавшие Treg могут подавлять развитие Treg-лимфоцитов *de novo* и таким образом способствовать срыву аутоиммунной толерантности, что особенно актуально у пациентов с ИБС и атеросклерозом [1, 6], однако взаимосвязь клеточного состава ТЖТ с

выраженностью коронарного атеросклероза по-прежнему остается неизученной.

**Целью данной работы** стало исследование состава субпопуляций лимфоцитов и свойств FoxP3<sup>+</sup>Treg-лимфоцитов в эпикардиальной, тимусной и подкожной жировой ткани в зависимости от выраженности коронарного атеросклероза у пациентов с хронической ИБС.

## Материалы и методы

Проведено наблюдательное одноцентровое одномоментное исследование на базе института (директор – директор). В исследование вошло 24 пациента с ИБС, имеющие показания для проведения хирургической операции на открытом сердце. Все исследования и манипуляции были проведены в рамках Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом института (протокол № 241 от 09.03.2023 г.). Все пациенты, вошедшие в исследование, подписали добровольное информированное согласие. Критерии включения в исследование: возраст пациентов от 40 до 70 лет; наличие верифицированного диагноза «хроническая ИБС со стабильной стенокардией II–III ФК»; наличие показаний для проведения селективной ангиографии и проведения кардиохирургического вмешательства на открытом сердце. Критерии исключения из исследования: острые атеросклеротические осложнения или проведение хирургического вмешательства в течение последних 6 месяцев; любое острое воспалительное заболевание или хроническое заболевание в стадии обострения; хроническая болезнь почек выше с3б; любое онкологическое или гематологическое заболевание; отказ от участия в исследовании.

Все пациенты получали стандартную медикаментозную терапию. Как минимум за неделю до хирургического вмешательства всем пациентам была выполнена селективная ангиография на ангиографическом комплексе Artis one и Digitron-3NAC компьютерной системе (Siemens Shenzhen Magnetic Resonance Ltd., Shenzhen, Китай). На основании данных ангиографии оценивали выраженность коронарного атеросклероза путем расчета индекса Gensini Score [13].

Материалом для исследования служили образцы ЭЖТ, ПЖТ и ТЖТ, взятые в ходе операционного вмешательства, массой 0,2-1 г. Транспор-

тировку образцов в лабораторию осуществляли в течение 15 минут после помещения жировой ткани в среду M199. Выделение стромально-сосудистой фракции жировой ткани проводили следующим образом: образцы жировой ткани механически измельчали, добавляли раствор коллагеназы I типа в буфере Кребса–Рингера (1 мг/мл, НПП «ПанЭко», Россия) и помещали в термостат при 37 °С и постоянном мягком перемешивании; затем добавляли раствор Кребса–Рингера в соотношении 1:1 для нейтрализации коллагеназы; полученную суспензию клеток пропускали через нейлонный фильтр (Falcon Cell strainer, диаметр пор 100 мкм), центрифугировали 5 мин при 400 g, пропускали через нейлонный фильтр (Falcon Cell strainer, диаметр пор 700 мкм), центрифугировали 5 мин при 400 g и ресуспендировали осадок в полной среде RPMI 1640 (10% фетальной бычьей сыворотки; 1% L-глутамин; 1% пенициллина/стрептомицина).

Суспензию клеток стромально-сосудистой фракции ЭЖТ, ПЖТ и ТЖТ аликвотировали по 100 мкл и проводили окрашивание основных субпопуляций лимфоцитов и НК-клеток (использовали коктейль моноклональных антител: анти-CD3-FITC; анти-CD16/CD56-PE; анти-CD45-PerCP-Cy5.5; анти-CD4-PE-Cy7; анти-CD19-APC; анти-CD8-APC-Cy7; BD, США), а также FoxP3<sup>+</sup>Treg-лимфоцитов. Для окрашивания поверхностных маркеров FoxP3<sup>+</sup>Treg-лимфоцитов использовали моноклональные антитела, меченные флуорохромами: анти-CD45-APC-Cy7; анти-CD4-FITC, анти-CD25-PE (BD Pharmingen, США). Затем клетки фиксировали, пермеабилizировали, и окрашивали антителами анти-FoxP3-AF647 (BD Pharmingen, США). В качестве ДНК-тропного красителя использовали 7-аминоактиномицин D (7-AAD).

Клетки собирали на проточной цитометре Amnis FlowSight (Cytex Biosciences, Fremont, США), оснащенном лазерами 488 нм и 642 нм, используя программное обеспечение INSIRE (Amnis Corporation, США). Светлополюсные изображения собирали на канале 1. Регистрацию бокового светорассеяния производили с помощью лазера 785 нм. Анализ данных проводили в программе IDEAS 6.2.64.0 (Amnis Corporation, США). Выделяли субпопуляции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg. Оценивали долю Treg в каждой субпопуляции с FoxP3, транслоцированным в ядро, с помощью мастера для анализа изображений клеток Nuclear Localization Wizard.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения STATISTICA 10.0 (StatSoft, США). Для оценки характера распределения данных использовали критерий Шапиро–Уилка. Количественные

данные представляли в виде медианы и межквартильного интервала – Me (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>). Категориальные данные представляли в виде абсолютных значений (n). Для исследования значимости различий количественных данных применяли U-критерий Манна–Уитни. Ранговый коэффициент корреляции Спирмена (rs) использовали для оценки взаимосвязи между переменными. Значения p < 0,05 считали статистически значимыми.

## Результаты и обсуждение

Верхний квартиль индекса Gensini Score в общей выборке пациентов с ИБС составил 65,0 баллов. Мы разделили всех пациентов в зависимости от выраженности коронарного атеросклероза в соответствии с индексом Gensini Score: группа 1 – пациенты с Gensini Score < 65 баллов; группа 2 – пациенты с Gensini Score ≥ 65 баллов (наиболее выраженный и распространенный коронарный атеросклероз). Группы пациентов были сопоставимы по полу, возрасту, продолжительности ИБС, окружности талии, статусу курения, качеству контроля артериального давления. Все пациенты принимали препараты статинов. Пациенты с Gensini Score ≥ 65 баллов характеризовались более высоким ИМТ по сравнению с пациентами с Gensini Score < 65 баллов (табл. 1).

В общей группе мы выявили прямую корреляционную взаимосвязь между уровнем Gensini Score и долей CD4<sup>+</sup>CD25<sup>lo</sup>Treg-клеток с внутриядерной транслокацией FoxP3 в ЭЖТ (r<sub>s</sub> = 0,468; p = 0,021). Относительное содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Treg-клеток с внутриядерной транслокацией FoxP3 в ТЖТ было обратно взаимосвязано со значением отношения окружности талии к окружности бедер (r<sub>s</sub> = -0,474; p = 0,041).

В группе с Gensini Score ≥ 65 баллов пациенты характеризовались большим относительным содержанием CD4<sup>+</sup>CD25<sup>lo</sup>Treg-клеток в ЭЖТ с внутриядерной транслокацией FoxP3, а также имели тенденцию к снижению относительного содержания CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Treg-клеток с внутриядерной транслокацией FoxP3 в ТЖТ (табл. 2).

Кроме того, у пациентов с Gensini Score ≥ 65 баллов мы выявили статистически значимо большее содержание CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов и НК-клеток и меньшее содержание двойных позитивных CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов в ТЖТ по сравнению с пациентами с Gensini Score < 65 баллов (табл. 3).

По данным корреляционного анализа уровень ядерной транслокации FoxP3 в CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Treg-клетках ТЖТ был обратно взаимосвязан с долей CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов (r<sub>s</sub> = -0,653; p = 0,012) и НК-клеток (r<sub>s</sub> = -0,723; p = 0,003) в ТЖТ и пря-

ТАБЛИЦА 1. БАЗОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. BASIC CHARACTERISTICS OF PATIENTS

Параметр Parameter	Gensini Score < 65 баллов Gensini Score < 65 points (n = 15)	Gensini Score ≥ 65 баллов Gensini Score ≥ 65 points (n = 9)	p
Пол (муж/жен), n Sex (male/female), n	12/3	9/0	0,266
Возраст, лет Age, years	65,0 (58,0-67,0)	65,0 (55,0-68,0)	0,953
Gensini Score, баллы Gensini Score, points	33,5 (9,0-56,0)	77,5 (75,0-100,0)	< 0,001
Продолжительность ИБС, лет CAD duration, years	4,5 (1,0-12,0)	8,5 (2,3-12,5)	0,482
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> BMI, kg/m <sup>2</sup>	27,3 (24,7-29,0)	30,5 (28,7-32,4)	0,035
Окружность талии, см Waist circumference, cm	100,0 (96,5-106,5)	106,0 (100,0-111,0)	0,310
Курение, n Smoking, n	7	3	0,679
Систолическое АД, мм рт. ст. Systolic BP, mmHg	137,0 (125,0-144,0)	125,0 (111,0-133,0)	0,088
Диастолическое АД, мм рт. ст. Diastolic BP, mmHg	68,0 (65,0-77,0)	70,0 (68,0-73,0)	0,689
Прием статинов, n Statins intake, n	15	9	0,999

Примечание. АД – артериальное давление; ИМТ – индекс массы тела; ИБС – ишемическая болезнь сердца.

Note. BP, blood pressure; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease.

мо – с долей двойных позитивных CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов в ТЖТ (rs = 0,567; p = 0,034).

Ранее были получены сведения, что сохранность функциональной активности тимуса непосредственно взаимосвязана с тяжестью коронарного атеросклероза. Отчасти это можно объяснить нарушением негативной селекции в тимусе и выходу аутореактивных клонов T-лимфоцитов, способных распознавать молекулу ApoB [6]. При этом была также показана тесная взаимосвязь между состоянием тимуса и метаболической дисфункцией: полная жировая дегенерация тимуса ассоциировалась с мужским полом, более высоким ИМТ, дислипидемией и артериальной гипертензией [12].

На наш взгляд, присутствие меньшего количества двойных позитивных CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов в ТЖТ при более выраженном коронарном атеросклерозе может отражать более выраженное угасание тимопоэза у пациентов с ИБС и может находиться в непосредственной взаимосвязи с функциональной активностью

Treg-лимфоцитов. Помимо тимуса, присутствие двойных позитивных CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов было показано в жировой ткани средостения и дуге аорты [14]. Остается открытым вопрос, способны ли CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоциты мигрировать из жировой ткани в стенки сосуда и какую функцию они там могут выполнять.

Для CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов жировой ткани в свою очередь была показана способность к переключению фенотипа макрофагов на провоспалительный M1-фенотип и поддержанию воспаления в жировой ткани [8]. Схожую функцию, по-видимому, могут выполнять и NK-клетки жировой ткани [5]. Мы показали взаимосвязь этих клеточных популяций, расположенных в ТЖТ, с развитием выраженного атеросклеротического поражения коронарных артерий у пациентов с ИБС, и их ассоциацию с уровнем ядерной транслокации FoxP3 в Treg-лимфоцитах.

В соответствии с нашими данными, Treg-лимфоциты в ЭЖТ, непосредственно прилегающей к ткани миокарда, при наиболее выра-

**ТАБЛИЦА 2. ДОЛЯ FоxP3<sup>+</sup>T-РЕГУЛЯТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ И УРОВЕНЬ ТРАНСЛОКАЦИИ FоxP3 В ЯДРО КЛЕТОК В РАЗЛИЧНЫХ ЖИРОВЫХ ДЕПО ПАЦИЕНТОВ С ИБС**

TABLE 2. FоxP3<sup>+</sup>T REGULATORY LYMPHOCYTES FREQUENCY AND FоxP3 NUCLEAR TRANSLOCATION IN VARIOUS FAT DEPOTS OF CAD PATIENTS

Параметр Parameter	Gensini Score < 65 баллов Gensini Score < 65 points (n = 15)	Gensini Score ≥ 65 баллов Gensini Score ≥ 65 points (n = 9)	p
ТЖТ CD25 <sup>hi</sup> FоxP3 <sup>+</sup> Treg, % TAT CD25 <sup>hi</sup> FоxP3 <sup>+</sup> Treg, %	7,5 (4,5-13,9)	9,1 (6,5-16,3)	0,482
ТЖТ CD25 <sup>lo</sup> FоxP3 <sup>+</sup> Treg, % TAT CD25 <sup>lo</sup> FоxP3 <sup>+</sup> Treg, %	3,2 (2,2-6,7)	5,5 (3,9-6,8)	0,411
ТЖТ ядр FоxP3 CD25 <sup>hi</sup> Treg, % TAT nucl FоxP3 CD25 <sup>hi</sup> Treg, %	34,3 (22,8-51,4)	19,4 (14,9-26,0)	0,084
ТЖТ ядр FоxP3 CD25 <sup>lo</sup> Treg, % TAT nucl FоxP3 CD25 <sup>lo</sup> Treg, %	23,1 (11,6-38,8)	13,8 (5,8-18,7)	0,138
ЭЖТ CD25 <sup>hi</sup> FоxP3 <sup>+</sup> Treg, % EAT CD25 <sup>hi</sup> FоxP3 <sup>+</sup> Treg, %	9,5 (4,2-17,2)	8,9 (5,6-22,3)	0,770
ЭЖТ CD25 <sup>lo</sup> FоxP3 <sup>+</sup> Treg, % EAT CD25 <sup>lo</sup> FоxP3 <sup>+</sup> Treg, %	3,0 (0,9-11,0)	3,1 (2,2-6,2)	0,999
ЭЖТ ядр FоxP3 CD25 <sup>hi</sup> Treg, % EAT nucl FоxP3 CD25 <sup>hi</sup> Treg, %	19,6 (0,0-32,0)	16,7 (11,8-22,1)	0,770
ЭЖТ ядр FоxP3 CD25 <sup>lo</sup> Treg, % EAT nucl FоxP3 CD25 <sup>lo</sup> Treg, %	11,0 (0,0-26,1)	27,6 (20,0-33,3)	0,014
ПЖТ CD25 <sup>hi</sup> FоxP3 <sup>+</sup> Treg, % SAT CD25 <sup>hi</sup> FоxP3 <sup>+</sup> Treg, %	13,1 (9,8-20,0)	8,8 (4,5-17,5)	0,411
ПЖТ CD25 <sup>lo</sup> FоxP3 <sup>+</sup> Treg, % SAT CD25 <sup>lo</sup> FоxP3 <sup>+</sup> Treg, %	4,6 (1,4-10,5)	3,5 (1,8-8,2)	0,999
ПЖТ ядр FоxP3 CD25 <sup>hi</sup> Treg, % SAT nucl FоxP3 CD25 <sup>hi</sup> Treg, %	15,8 (7,8-33,0)	16,3 (0,0-20,9)	0,640
ПЖТ ядр FоxP3 CD25 <sup>lo</sup> Treg, % SAT nucl FоxP3 CD25 <sup>lo</sup> Treg, %	16,4 (0,0-24,5)	0 (0,0-14,3)	0,411

Примечание. ТЖТ – тимусная жировая ткань; ПЖТ – подкожная жировая ткань; ЭЖТ – эпикардиальная жировая ткань; ядр FоxP3 – доля клеток с FоxP3, локализованным в ядре; для субпопуляций Treg указана доля клеток от всех CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов; доля клеток с транслокацией FоxP3 в ядро указана от всех CD25<sup>hi</sup>Treg или CD25<sup>lo</sup>Treg.

Note. TAT, thymic adipose tissue; SAT, subcutaneous adipose tissue; EAT, epicardial adipose tissue; nucl FоxP3, frequency of cells with FоxP3, localized in nucleus; Treg frequency represents percentage of all CD4<sup>+</sup>T lymphocytes; frequency of cells with FоxP3 nuclear translocation represents percentage of all CD25<sup>hi</sup>Treg или CD25<sup>lo</sup>Treg.

женном коронарном атеросклерозе находятся в активированном состоянии, так как уровень транслокации FоxP3 в их ядро был выше. Учитывая способность Treg-лимфоцитов к рециркуляции в тимус из периферических органов и систем [1], нельзя исключить, что субпопуляции ТЖТ и ЭЖТ Treg-лимфоцитов взаимосвязаны между собой, а Treg из ЭЖТ при возвращении в тимус, могут подавлять генерацию Treg *de novo* и приводить к угнетению ауто толерантности. ЭЖТ даже в физиологических условиях характеризуется более выраженной экспрессией генов, контро-

лирующих развитие воспаления, и снижением регуляции со стороны генов, контролирующей пролиферацию и катаболизм, по сравнению с ПЖТ. Нельзя исключить, что в условиях ишемии, адипоциты, взаимодействуя напрямую с кардиомиоцитами и стромальными клетками миокарда, могут получать дополнительные паракринные сигналы, способствующие прогрессированию воспаления [11]. Природа данных сигналов и место Treg-лимфоцитов в регуляции данных процессов требует дальнейшего изучения.

**ТАБЛИЦА 3. СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ В РАЗЛИЧНЫХ ЖИРОВЫХ ДЕПО ПАЦИЕНТОВ С ИБС**

TABLE 3. LYMPHOCYTE SUBSETS IN VARIOUS FAT DEPOTS OF CAD PATIENTS

Параметр Parameter	Gensini Score < 65 баллов Gensini Score < 65 points (n = 15)	Gensini Score ≥ 65 баллов Gensini Score ≥ 65 points (n = 9)	р
ТЖТ CD4 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, % TAT CD4 <sup>+</sup> T lymphocytes, %	33,6 (30,5-43,5)	29,6 (25,4-31,6)	0,112
ТЖТ CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, % TAT CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes, %	19,5 (15,8-27,2)	30,3 (29,9-30,9)	0,029
ТЖТ CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, % TAT CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes, %	1,3 (0,7-2,4)	0,3 (0,2-0,6)	0,038
ТЖТ НК-клетки, % TAT NK cells, %	3,1 (1,8-6,0)	14,2 (10,9-16,7)	0,022
ТЖТ NKT-клетки, % TAT NKT cells, %	9,9 (4,7-14,6)	10,9 (5,8-18,9)	0,596
ТЖТ В-лимфоциты, % TAT B lymphocytes, %	5,7 (3,8-8,5)	3,3 (2,6-4,2)	0,316
ЭЖТ CD4 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, % EAT CD4 <sup>+</sup> T lymphocytes, %	35,2 (31,0-37,9)	31,2 (23,5-39,8)	0,680
ЭЖТ CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, % EAT CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes, %	26,8 (19,6-28,4)	30,6 (22,7-35,9)	0,517
ЭЖТ НК-клетки, % EAT NK cells, %	10,7 (6,6-15,4)	10,1 (5,9-12,9)	0,680
ЭЖТ NKT-клетки, % EAT NKT cells, %	13,0 (5,0-13,4)	14,7 (6,4-20,2)	0,596
ЭЖТ В-лимфоциты, % EAT B lymphocytes, %	4,8 (2,7-11,1)	7,9 (4,2-10,8)	0,680
ПЖТ CD4 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, % SAT CD4 <sup>+</sup> T lymphocytes, %	32,8 (23,7-32,9)	34,1 (32,7-36,4)	0,216
ПЖТ CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, % SAT CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes, %	16,3 (13,4-20,5)	27,1 (18,6-28,7)	0,216
ПЖТ НК-клетки, % SAT NK cells, %	21,5 (16,3-26,1)	14,6 (10,8-21,9)	0,215
ПЖТ NKT-клетки, % SAT NKT cells, %	14,4 (7,3-17,3)	10,1 (6,7-18,4)	0,723
ПЖТ В-лимфоциты, % SAT B lymphocytes, %	2,2 (1,3-3,7)	1,9 (1,2-2,3)	0,953

Примечание. ТЖТ – тимусная жировая ткань; ПЖТ – подкожная жировая ткань; ЭЖТ – эпикардиальная жировая ткань; доля клеток указана от всех CD45<sup>+</sup> лимфоцитов.

Note. TAT, thymic adipose tissue; SAT, subcutaneous adipose tissue; EAT, epicardial adipose tissue; the frequency of cells is indicated as percentage of all CD45<sup>+</sup> lymphocytes.

## Заключение

Таким образом, мы показали, что у пациентов с хронической ИБС уровень транслокации FoxP3 в ядро в эпикардиальной жировой ткани в CD4<sup>+</sup>CD25<sup>lo</sup>Treg-клетках прямо связан с вы-

раженностью атеросклероза, в то время как в тимусной жировой ткани имеется тенденция к наличию обратной взаимосвязи между выраженностью атеросклероза и уровнем транслокации FoxP3 в ядро в CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Treg-клетках. В жировой ткани тимуса уровень ядерной транслокации

ФохP3 в CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Treg-клетках имеет ассоциацию с антропометрическими показателями ожирения и изменением субпопуляционного состава лимфоцитов. Требуется проведение дальнейших исследований для изучения молекулярных меха-

низмов реализации данных взаимосвязей и определения места данного патофизиологического феномена в стратификации риска и разработке подходов к терапии пациентов с коронарным атеросклерозом и хронической ИБС.

## 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. Кологривова И.В., Кошельская О.А., Сулова Т.Е., Харитонов О.А., Трубачева О.А., Кравченко Е.С., Дмитриуков А.А. Т-лимфоциты ФохP3<sup>+</sup> и их взаимосвязь с выраженностью коронарного атеросклероза у пациентов с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа: пилотное исследование // Сахарный диабет, 2023. Т. 26, № 3. С. 213-223. [Kologrivova I.V., Suslova T.E., Koshelskaya O.A., Kharitonova O.A., Trubacheva O.A., Kravchenko E.S., Dmitriukov A.A. T-lymphocytes FoxP3<sup>+</sup> and their interconnection with the severity of coronary atherosclerosis in patients with coronary artery disease and diabetes mellitus type 2: a pilot study. *Sakharnyy diabet = Diabetes Mellitus*, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 213-223. (In Russ.)]
3. Кошельская О.А., Нарыжная Н.В., Кологривова И.В., Сулова Т.Е., Кравченко Е.С., Харитонов О.А., Андреев С.Л., Марголис Н.Ю., Шарыпова Н.Г., Крапивина А.С. Взаимосвязь гипертрофии эпикардиальных адипоцитов с адипокинами, воспалением и метаболизмом глюкозы и липидов // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины, 2023. Т. 38, № 1. С. 64-74. [Koshelskaya O.A., Naryzhnaya N.N., Kologrivova I.V., Suslova T.E., Kravchenko E.S., Charitonova O.A., Andreev S.L., Margolis N.Yu., Sharipova N.G., Kravpivina A.S. Correlation of epicardial adipocytes hypertrophy with adipokines, inflammation and glucose and lipid metabolism. *Sibirskiy zhurnal klinicheskoy i eksperimentalnoy meditsiny = Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2023, Vol. 38, no. 1, pp. 64-74. (In Russ.)]
4. Романцова Т.И. Жировая ткань: цвета, депо и функции // Ожирение и метаболизм, 2021. Т. 18, № 3. С. 282-301. [Romantsova T.I. Adipose tissue: colors, depots and functions. *Ozhireniye i metabolizm = Obesity and metabolism*, 2021, Vol. 18, no. 3, pp. 282-301. (In Russ.)]
5. Haugstøyl M.E., Cornillet M., Strand K., Stiglund N., Sun D., Lawrence-Archer L., Hjellestad I.D., Busch C., Mellgren G., Björkström N.K., Fernø J. Phenotypic diversity of human adipose tissue-resident NK cells in obesity. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1130370. doi: 10.3389/fimmu.2023.1130370.
6. Hester A.K., Semwal M.K., Cepeda S., Xiao Y., Rueda M., Wimberly K., Venables T., Dileepan T., Kraig E., Griffith A.V. Redox regulation of age-associated defects in generation and maintenance of T cell self-tolerance and immunity to foreign antigens. *Cell Rep.*, 2022, Vol. 38, no. 7, 110363. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110363.
7. Iacobellis G. Epicardial adipose tissue in contemporary cardiology. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2022, Vol. 19, pp. 593-606.
8. Kiran S., Kumar V., Murphy E.A., Enos R.T., Singh U.P. High fat diet-induced CD8<sup>+</sup> T cells in adipose tissue mediate macrophages to sustain low-grade chronic inflammation. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 680944. doi: 10.3389/fimmu.2021.680944.
9. Liang Z., Dong X., Zhang Z., Zhang Q., Zhao Y. Age-related thymic involution: Mechanisms and functional impact. *Aging Cell*, 2022, Vol. 21, no. 8, e13671. doi: 10.1111/ace1.13671.
10. Magg T., Mannert J., Ellwart J.W., Schmid I., Albert M.H. Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 6, pp. 1627-1638.
11. Rietdorf K., MacQueen H. Investigating interactions between epicardial adipose tissue and cardiac myocytes: what can we learn from different approaches? *Br. J. Pharmacol.*, 2017, Vol. 174, no. 20, pp. 3542-3560.
12. Sandstedt M., Chung R.W.S., Skoglund C., Lundberg A.K., Östgren C.J., Ernerudh J., Jonasson L. Complete fatty degeneration of thymus associates with male sex, obesity and loss of circulating naïve CD8<sup>+</sup> T cells in a Swedish middle-aged population. *Immun. Ageing*, 2023, Vol. 20, no. 1, 45. doi: 10.1186/s12979-023-00371-7.
13. Wang K.Y., Zheng Y.Y., Wu T.T., Ma Y.T., Xie X. Predictive value of Gensini Score in the long-term outcomes of patients with coronary artery disease who underwent PCI. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2022, Vol. 8, 778615. doi: 10.3389/fcvm.2021.778615.



14. Winkels H., Ghosheh Y., Kobiyama K., Kiesses W.B., Orecchioni M., Ehinger E., Suryawanshi V., Herrera-de la Mata S., Marchevocchio P., Riffelmacher T., Thiault N., Kronenberg M., Wolf D., Seumois G., Vijayanand P., Ley K. Thymus-derived CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells reside in mediastinal adipose tissue and the aortic arch. *J. Immunol.*, 2021, Vol. 207, no. 11, pp. 2720-2732.
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:**

**Кологривова И.В.** — к.м.н., старший научный сотрудник отделения клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

**Дмитрюков А.А.** — аспирант, младший научный сотрудник отделения клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

**Нарыжная Н.В.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

**Кошельская О.А.** — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

**Харитонов О.А.** — младший научный сотрудник отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

**Выросткова А.И.** — лаборант-исследователь отделения клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

**Authors:**

**Kologrivova I.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

**Dmitriukov A.A.**, Postgraduate Student, Junior Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

**Naryzhnaya N.V.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Experimental Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

**Koshelskaya O.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Department of Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

**Kharitonova O.A.**, Junior Research Associate, Department of Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

**Vyrostkova A.I.**, Research Laboratory Assistant, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

**Евтушенко В.В.** — д.м.н., врач отделения сердечно-сосудистой хирургии, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

**Крапивина А.С.** — лаборант-исследователь отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

**Рябченко П.Е.** — студентка ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Суслова Т.Е.** — к.м.н., руководитель отделения клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

**Evtushenko V.V.**, PhD, MD (Medicine), Doctor of the Department of Cardiovascular Surgery, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

**Krapivina A.S.**, Research Laboratory Assistant, Department of Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

**Riabchenko P.E.**, Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Suslova T.E.**, PhD (Medicine), Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

---

Поступила 14.03.2024  
Принята к печати 17.03.2024

Received 14.03.2024  
Accepted 17.03.2024

# ПРОАТЕРОГЕННЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ЛПНП, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ: ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Киселева Д.Г.<sup>1,2</sup>, Зиганшин Р.Х.<sup>3</sup>, Фотин Д.П.<sup>4</sup>, Маркин А.М.<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>4</sup> ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>5</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

**Резюме.** Атеросклероз представляет собой заболевание сосудов, в основе которого лежит хронический воспалительный процесс, включающий в себя сложные взаимодействия компонентов крови, а также клеток, формирующих стенку сосуда, и липидного обмена в организме. Ключевую роль в патогенезе атеросклероза играют липопротеины низкой плотности (ЛПНП). При нарушении проницаемости эндотелиального слоя сосуда, ЛПНП могут проникать в интрамуральное пространство и накапливаться клетками субэндотелиального слоя интимы, приводя к началу воспалительного процесса и, в конечном итоге, к образованию пенных клеток, основному морфологическому компоненту атеросклеротической бляшки. Однако только лишь уровень ЛПНП в плазме крови пациента не является ключевым фактором развития атеросклероза. Многочисленные исследования указывают, что именно окисленные модификации ЛПНП (окЛПНП) влияют на повышенное локальное накопление холестерина клетками сосудистой стенки, однако недавние работы демонстрируют противоречивые результаты относительно роли окЛПНП в развитии атеросклероза. Мы предполагаем, что на прогрессирование атеросклероза могут влиять иные компоненты фракции ЛПНП. Общеизвестным является тот факт, что пациенты с сахарным диабетом (СД) страдают от сердечно-сосудистых заболеваний, в частности от атеросклероза, чаще, чем пациенты без диагностированного СД и других аутоиммунных заболеваний, при этом заболевание прогрессирует быстрее. Целью данного исследования являлось выявление потенциальных биомаркеров во фракции ЛПНП, свидетельствующих о взаимосвязи иммунной системы с развитием атеросклероза у таких пациентов. ЛПНП были выделены из плазмы пациентов и здоровых доноров с помощью последовательного ультрацентрифугирования с растворами разной плотности, белковый профиль образцов ЛПНП оценивали с помощью хромато-масс-спектрометрии. Нами было обнаружено 9 белков, которые имеют статистически значимую разницу

## Адрес для переписки:

Киселева Диана Геннадьевна  
ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»  
119234, Россия, Москва, ул. Колмогорова, 1.  
Тел.: 8 (903) 101-67-68.  
E-mail: trueit1292@gmail.com

## Address for correspondence:

Diana G. Kiseleva  
Lomonosov Moscow State University  
1 Kolmogorov St  
Moscow  
119234 Moscow  
Phone: +7 (903) 101-67-68.  
E-mail: trueit1292@gmail.com

## Образец цитирования:

Д.Г. Киселева, Р.Х. Зиганшин, Д.П. Фотин,  
А.М. Маркин «Проатерогенный протеомный профиль  
ЛПНП, полученных от пациентов с сахарным  
диабетом: иммунологические аспекты» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 253-258.  
doi: 10.46235/1028-7221-16674-PPP

© Киселева Д.Г. и соавт., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

D.G. Kiseleva, R.Kh. Ziganshin, D.P. Fotin, A.M. Markin  
“Proatherogenic proteomic profile of LDL isolated from plasma  
of patients with diabetes mellitus: immunological aspects”,  
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 253-258.  
doi: 10.46235/1028-7221-16674-PPP

© Kiseleva D.G. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16674-PPP

между группами (СД и контроль). В группе СД содержание антимикробного пептида кателицидина и липополисахарид-связывающего белка выше почти в 2 раза по сравнению с контролем. Эти белки могут быть вовлечены в развитие воспаления, приводящего к прогрессированию атеросклероза. В то же время снижение иммуноглобулинов и компонентов комплемента (С9 и субкомпонент С1s), связанных с ЛПНП, может влиять на развитие атеросклероза.

*Ключевые слова: сахарный диабет, липопротеины низкой плотности, атеросклероз, протеомика, хромато-масс-спектрометрия, сердечно-сосудистые заболевания*

## PROATHEROGENIC PROTEOMIC PROFILE OF LDL ISOLATED FROM PLASMA OF PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS: IMMUNOLOGICAL ASPECTS

Kiseleva D.G.<sup>a, b</sup>, Ziganshin R.Kh.<sup>c</sup>, Fotin D.P.<sup>d</sup>, Markin A.M.<sup>b, e</sup>

<sup>a</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

<sup>e</sup> P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Atherosclerosis is a vascular disease, which is based on a chronic inflammatory process, including complex interactions between blood components, as well as the cells that form the vessel wall, and lipid metabolism in general. Low-density lipoproteins (LDL) play a key role in pathogenesis of atherosclerosis. When the permeability of the endothelial layer of the vessel is impaired, LDL can penetrate into the intramural space and lead to excessive cholesterol accumulation by the cells from the intima subendothelial layer, leading to the onset of the inflammatory process and to the formation of foam cells, the main morphological component of the atherosclerotic plaque. However, the level of LDL in the patient's blood plasma alone is not a key indicator of the development of atherosclerosis. Numerous studies point out the role of oxidized modifications of LDL (oxLDL) in the increased local accumulation of cholesterol in vascular wall cells, however, recent works have shown conflicting results regarding the role of oxLDL in the development of atherosclerosis. We hypothesize that other components of LDL may also influence the progression of atherosclerosis. It is a well-known fact that patients with diabetes mellitus (DM) suffer from cardiovascular diseases, in particular atherosclerosis, more often than patients without diagnosed DM and other autoimmune diseases, and the disease progresses faster. The purpose of this study was to identify risk biomarkers in LDL groups that indicate the relationship of the immune system with the development of atherosclerosis in such patients. LDL was isolated from patients and healthy donors using continuous ultracentrifugation with solutions of different densities, and LDL protein profile samples were measured using gas chromatography-mass spectrometry. We found 9 proteins that had a statistically significant difference between the samples (DM and control). In the diabetes group, the content of the antimicrobial peptide cathelicidin and lipopolysaccharide-binding protein was almost 2 times higher compared to the control. These proteins may be involved in the development of inflammation, leading to the progression of atherosclerosis. At the same time, a decrease in immunoglobulins and complement components (C9 and Complement C1s subcomponent) associated with LDL may contribute to the development of atherosclerosis.

*Keywords: diabetes mellitus, low-density lipoproteins, atherosclerosis, proteomics, gas chromatography-mass spectrometry, cardiovascular diseases*

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (Грант № 22-65-00089).

### Введение

Атеросклероз представляет собой заболевание сосудов, в основе которого лежит хронический воспалительный процесс, затрагивающий сложное взаимодействие различных типов клеток со-

судистой стенки, компонентов крови, а также липидный обмен в организме. Несмотря на многие десятилетия исследований, так и не удалось выявить однозначных причин развития самого заболевания.

Различные теории, объясняющие процесс развития начального поражения интимы сосудов и дальнейшего формирования атеросклеротической бляшки, выделяют ключевую роль

ЛПНП в патогенезе атеросклероза, которые при повышенной проницаемости эндотелиального слоя начинают проникать в интрамуральное пространство и активно накапливаться в клетках субэндотелиального слоя интимы. Этот процесс завершается образованием пенистых клеток — одного из основных морфологических компонентов атеросклеротических бляшек.

Первоначально противоречивые данные о внутриклеточном накоплении холестерина при добавлении ЛПНП *in vitro* привели к гипотезе, что окисленные модификации (окЛПНП), а не сами ЛПНП, играют фундаментальную роль в прогрессировании атеросклероза [8]. Однако фактические значения окЛПНП составляют небольшой процент от общего количества ЛПНП в плазме, со средним значением (стандартным отклонением) 1,27 (0,69) мг/дл и медианой (межквартильным размахом) 1,10 (0,83-1,52) мг/дл или как процент ЛПНП со средним значением (стандартным отклонением) 1,06 (0,51) % и медианой (межквартильный размахом) 0,96 (0,75-1,23) %, хотя у некоторых пациентов это окЛПНП в плазме может достигать и 10% [2].

Кроме того, в том же исследовании изучалась скорость распространения пульсовой волны в аорте (аPWV), маркер наличия атеросклероза и ухудшения эластичности сосудистых стенок, и ее связь с уровнем окЛПНП. Результаты показали, что пациенты из среднего тертиля окЛПНП с одинаковой вероятностью имели высокий уровень аPWV по сравнению с пациентами из самого низкого тертиля после поправки на различные факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний. Более того, у пациентов с диабетом 2 типа, которые, как известно, чаще страдают сердечно-сосудистыми заболеваниями [1], уровень окЛПНП в атеросклеротических бляшках не предсказывал осложнение со стороны сердечно-сосудистой системы [7], подчеркивая, что наличие только лишь окЛПНП не может рассматриваться как ключевой фактор в развитии атеросклероза.

Целью данного исследования является проведение протеомного анализа немодифицированных (нативных) ЛПНП, выделенных из плазмы пациентов с диабетом и наличием сердечно-сосудистых заболеваний, и сравнение их белкового состава с ЛПНП контрольной группы. Мы предполагаем, что у пациентов с диабетом не только чаще встречается воспалительный процесс в эндотелиальном слое сосудов, но также белковый состав ЛПНП у таких больных имеет факторы, индуцирующие воспаление и опосредующие увеличение содержания липидов в клетках.

## Материалы и методы

ЛПНП были получены из крови 15 человек, из которых 3 не имели диабета в анамнезе и 12 пациентов с сахарным диабетом (СД). Все пациенты

предоставили письменное информированное согласие. Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом РНЦХ им. Б.В. Петровского (№ 5 от 11 декабря 2022 г.).

Образцы цельной крови (по 30 мл) собирали в пробирки с ЭДТА и из каждого образца получали общий объем сыворотки примерно 10 мл центрифугированием в течение 20 мин при 1600 g (3200 об/мин на BioSan LMC-4200R, Латвия). Выделение ЛПНП осуществляли в тот же день, когда собирались образцы цельной крови.

Необходимые растворы:

Раствор плотностью 1,006 г/см<sup>3</sup> в воде Milli-Q: NaCl 11,42 г/л, ЭДТА 0,1 г/л. Раствор плотностью 1,019 г/см<sup>3</sup>, приготовленный в смеси NaCl/ЭДТА 1,006 г/см<sup>3</sup>: KBr 16,5 г/л.

Раствор плотностью 1,065 г/см<sup>3</sup>, приготовленный в смеси NaCl/ЭДТА 1,006 г/см<sup>3</sup>: KBr 77,1 г/л.

К собранной плазме добавляли KBr (0,5 г на 1 мл плазмы) и осторожно вортиксировали до полного растворения солей (ELMI RM-1L, Латвия). Затем плазму с бромидом калия переносили в ультрацентрифужные пробирки в соотношении 2/3 конечного объема и наслаивали оставшуюся 1/3 объема раствором KBr плотностью 1,019 г/см<sup>3</sup> и центрифугировали в ультрацентрифуге (Beckman L8-55M, США) в течение 50 мин при 40000 об/мин и +4 °С. После ультрацентрифугирования верхняя фаза должна быть удалена на 1-2 мм выше границы фаз. Далее наслаивался раствор KBr 1,065 г/см<sup>3</sup> в зависимости от количества верхней фракции, удаленной на предыдущем этапе. Пробирки центрифугировали 2 ч 10 мин при 40000 об/мин и +4 °С. После ультрацентрифугирования кольцо ЛПНП было тщательно собрано. Собранные ЛПНП диализовали против 1 л PBS при +4 °С в течение не менее 24 ч (день-ночь-день) с 3-4 сменами буфера. После диализа ЛПНП стерилизовали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Концентрацию белка измеряли с помощью BioSpec-nano (Shimadzu, Япония).

Для подготовки образцов к хромато-масс-спектрометрии аликвоты растворов белков (20 мкг белка) высушили досуха на центрифужном вакуумном концентраторе SpeedVac (Savant, Франция) и растворили в 20 мкл буферного раствора, содержащего 100 мМ Трис pH 8,5, 1% дезоксихолата натрия, 10 мМ TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine) и 20 мМ 2-CAA (2-хлороацетамид), прогрели в течение 10 мин при 85 °С, охладили до комнатной температуры, добавили 0,4 мкг трипсина в 10 мкл 100 мМ Трис pH 8,5 и оставили инкубироваться при 37 °С на ночь. По окончании инкубации к реакционной смеси добавляли равный объем 2% ТФУ и пептиды обес-соливали на микроколонке SDB-RPS StageTip, изготовленной из наконечника для автоматической пипетки на 200 мкл и 3 кусочков мембраны SDB-RPS (3M, США), вырезанных иглой калибр 16 (1). Раствор пептидов наносили на ми-

кроколону центрифугированием при 300 g, промывали смесью растворителей 50 мкл 1% ТФУ: 50 мкл этилацетата (2 раза), 50 мкл 0,2% ТФУ и элюировали 60 мкл раствора, содержащего 5% гидроксида аммония и 60% ацетонитрила в воде. Элюат высушивали досуха и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Перед анализом пептиды растворяли в 40 мкл раствора, содержащего 0,1% ТФУ и 2% ацетонитрила в воде.

Хромато-масс-спектрометрический анализ полученных образцов проводили на хроматографе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), соединенным с масс-спектрометром Orbitrap Tribrid Lumos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, США) посредством наноэлектроспрейного источника (Thermo Fisher Scientific, США). Раствор А (99,9% воды, 0,1% муравьиной кислоты) и Б (19,9% воды, 0,1% муравьиной кислоты, 80% ацетонитрила). Линейное градиентное элюирование, скорость потока 500 нл/мин.

Полученные масс-спектрометрические данные анализировали с использованием компьютерных программ MaxQuant 2.4.2.0 [10] и Perseus 2.0.10.0 [11]. Корреляцию тандемных масс-спектров с аминокислотными последовательностями белков проводили против базы данных белковых последовательностей человека (включающей изоформы) Uniprot (версия от 06.2023).

Статистический анализ проводился на программном языке Python с использованием пакета `scipy`, `numpy`, `pandas`. Построение графиков проводилось с использованием пакетов `matplotlib`, `seaborn`. В связи с неравномерным размером выборок двух групп проводился статистический анализ с помощью критерия Манна–Уитни. Предварительно данные количественного анализа без меток (LFQ) были нормализованы по  $\log_2$ .

## Результаты и обсуждение

По итогам анализа были выявлены статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ) для 9 белков: белки, входящие в систему комплемента (Complement component C9, C9; Complement C1s subcomponent, C1s), антимикробный пептид кателицидин (cathelicidin antimicrobial peptide, CAMP), цепи иммуноглобулинов (Ig kappa chain V-IV region, Ig kappa chain C region, Ig gamma-4 chain C region, Ig mu chain C region, Ig alpha-2 chain C region), липополисахарид-связывающий белок (Lipopolysaccharide binding protein, LBP).

На рисунке 1 представлена  $\log_2$  кратная разница между контрольными образцами и ЛПНП, полученными от пациентов с сахарным диабетом, при этом значения для Ig mu chain C region более чем в 4 раза выше у пациентов из контрольной выборки. Также в выборке были обнаружены два белка (липополисахарид-связывающий белок, антимикробный пептид кателицидин), для

которых показатель LFQ почти в 2 раза ниже в контроле по сравнению с пациентами с сахарным диабетом.

Среди белков, содержание которых выше в контрольной группе, можно выделить белки системы комплемента (C9; C1s). Ранее сообщалось, что системы комплемента C4 и C9 присутствуют в ЛПОНП, ЛПНП и липопротеинах высокой плотности (ЛПВП), свидетельствуя о том, что компоненты системы, помимо иммунной защиты, процессов ремоделирования тканей и удаления иммунных комплексов, активно вовлечены в метаболизм липидов [13]. В ряде исследований было показано, что компоненты C1q, C3c, C3a, C4, C9 активируются в атеросклеротических бляшках, а также в интиме. Компоненты C5b-9 могут накапливаться в макрофагах и апоптотических клетках [5]. Однако точная взаимосвязь компонентов и развития атеросклероза не ясна, и в нашем исследовании было обнаружено, что в ЛПНП компонента комплемента C9 и субкомпонент C1s могут потенциально оказывать атеропротекторное действие, и их пониженная представленность у пациентов с СД может свидетельствовать, что именно иммунный аспект характеризует повышенный риск развития сердечно-сосудистых заболеваний у таких больных.

В другом исследовании было показано, что дефицит белков классического пути системы комплемента тесно связан с развитием системной красной волчанки, включая отсутствие C1r и C1s [14].

Другой иммунный компонент ЛПНП относится к иммуноглобулинам (Ig kappa chain V-IV region, Ig kappa chain C region, Ig gamma-4 chain C region, Ig mu chain C region, Ig alpha-2 chain C region). В ранних работах отмечалось, что при аутоиммунной гипер- или дислипидемии в циркулирующей крови обнаруживаются комплексы иммуноглобулина-липопротеина, что свидетельствует о том, что иммуноглобулины способны связываться с ЛПНП. Однако не все иммуноглобулины, связанные с ЛПНП, свидетельствуют о развитии патологии. Часть из них, наоборот, оказывает атеропротективное воздействие.

Согласно авторам, наиболее хорошо изученными модификациями окЛПНП являются: малновый диальдегид (MDA), малновый диальдегид-ацетальдегид (MAA) и 4-гидроксиноненаль (4HNE). Эти модификации наблюдаются в белке ApoB100 и других белках, входящих в состав ЛПНП. Также в ЛПНП наблюдалось окисление фосфолипидов, в частности липидных аддуктов, которые имитируют структуру фосфорилхолина и играют важную роль в раннем атерогенезе. Было показано, что иммунизация MDA-окЛПНП обеспечивает защиту у атеросклеротических мышей с высокими титрами IgM против наблюдаемых аддуктов [9]. Также в нашей работе о высоком содержании IgM может свидетельствовать наличие белка Ig mu chain C region. Окисленные фосфо-

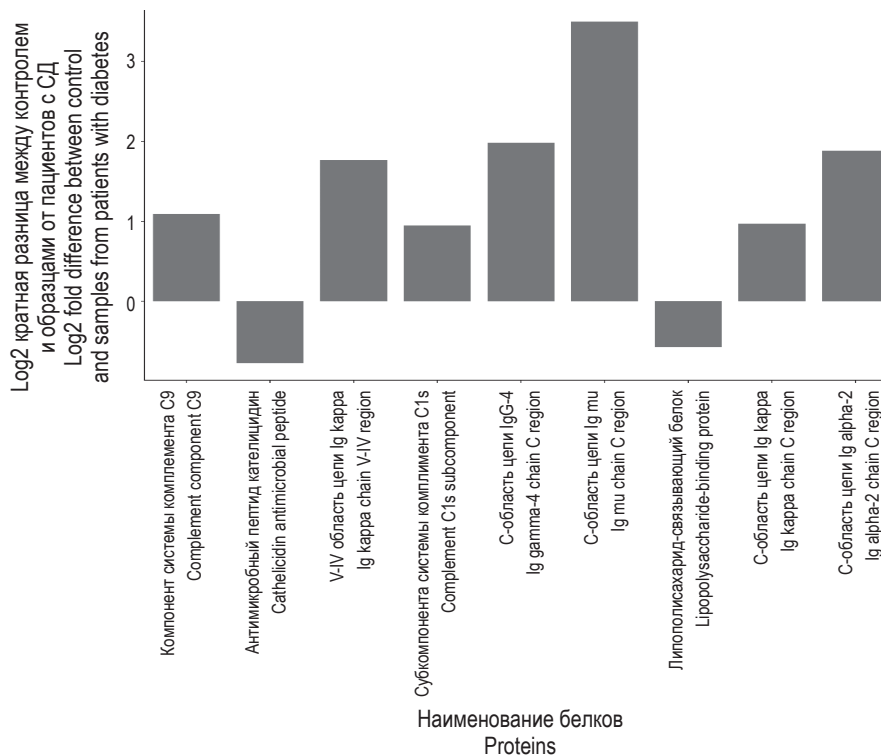


Рисунок 1. Log<sub>2</sub> кратная разница между LFC контрольных образцов и ЛПНП, полученных от пациентов с сахарным диабетом, по 9 белкам

Figure 1. Log<sub>2</sub> fold change between LFC for 9 proteins of control LDL and LDL isolated from plasma of patients with diabetes

липиды являются основным биологически активным компонентом минимально окисленных ЛПНП, и было показано, что использование IgM против таких ЛПНП оказывало нейтрализующую активность на действие окисленных фосфолипидов [3].

Среди 9 белков были обнаружены также белки, содержание которых ниже, чем в группе СД: LBP и САМР.

Еще в ранних исследованиях было показано, что связывание LBP с ЛПНП и ЛПС в плазме крови является защитным механизмом при инфекции и сепсисе [12]. Однако недавние данные указывают на связь уровней циркулирующего LBP с ожирением, диабетом и сердечно-сосудистыми заболеваниями, кроме того, уровни LBP в сыворотке связаны с жесткостью артерий независимо от ожирения и традиционных сердечно-сосудистых факторов риска, особенно у мужчин с диабетом 2-го типа, подтверждая потенциальную роль LPS/LBP-индуцированного врожденного

иммунитета в развитии и прогрессировании артериальной ригидности при диабете 2-го типа [6].

Недавно было обнаружено, что САМР экспрессируется и секретируется адипоцитами, представляя собой новый иммуномодулирующий адипокин и предположительно является новым сердечно-сосудистым биомаркером [4].

## Заключение

Таким образом, были найдены статистически значимые различия для 9 белков между группами СД и контролем, данные белки потенциально связаны с ЛПНП. Белки САМР и LBP, содержание которых выше почти в 2 раза в группе с СД, могут являться биомаркерами воспаления, а также быть вовлеченными в развитие и прогрессирование атеросклероза. В то же время снижение иммуноглобулинов и компонентов комплемента (C9 и субкомпонент C1s), связанных с ЛПНП, может влиять на развитие атеросклероза.

Публикация размещена при участии Балтийского федерального университета им. И. Канта.

## Список литературы / References

1. Кириченко Т.В., Бочкарева Л.А., Недосугова Л.В., Маркина Ю.В., Кузина И.А., Толстик Т.В., Богатырева А.И., Маркин А.М. Взаимосвязь провоспалительной активации моноцитов с факторами риска атеросклероза при сахарном диабете 2 типа // Атеросклероз и дислипидемии, 2024. Т. 1, № 54. С.45-51 [Kirichenko T.V., Bochkareva L.A., Nedosugova L.V., Markina Yu.V., Kuzina I.A., Tolstik T.V., Bogatyreva A.I., Markin A.M. The association of pro-inflammatory monocyte activation and risk factors for atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis i dislipidemii = Atherosclerosis and Dyslipidemias*, 2024, Vol. 1, no. 54, pp. 45-51. (In Russ.)]

2. Brinkley T.E., Nicklas B.J., Kanaya A.M., Satterfield S., Lakatta E.G., Simonsick E.M., Sutton-Tyrrell K., Kritchevsky S.B. Plasma oxidized low-density lipoprotein levels and arterial stiffness in older adults: the health, aging, and body composition study: The Health, aging, and Body Composition Study. *Hypertension*, 2009, Vol. 53, no. 5, pp. 846-852.
3. Cherepanova O.A., Srikakulapu P., Greene E.S., Chaklader M., Haskins R.M., McCanna M.E., Bandyopadhyay S., Ban B., Leitinger N., McNamara C.A., Owens G.K. Novel autoimmune IgM antibody attenuates atherosclerosis in IgM deficient low-fat diet-fed, but not Western diet-fed *ApoE*<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2020, Vol. 40, no. 1, pp. 206-219.
4. Höpfinger A., Karrasch T., Schäffler A., Schmid A. Circulating levels of cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) are affected by oral lipid ingestion. *Nutrients*, 2023, Vol. 15, no. 13, 3021. doi: 10.3390/nu15133021.
5. Kiss M.G., Binder C.J. The multifaceted impact of complement on atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2022, Vol. 351, pp. 29-40.
6. Sakura T., Morioka T., Shioi A., Kakutani Y., Miki Y., Yamazaki Y., Motoyama K., Mori K., Fukumoto S., Shoji T., Emoto M., Inaba M. Lipopolysaccharide-binding protein is associated with arterial stiffness in patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2017, Vol. 16, 62. doi: 10.1186/s12933-017-0545-3.
7. Singh P., Goncalves I., Tengryd C., Nitulescu M., Persson A.F., To F., Bengtsson E., Volkov P., Orholm-Melander M., Nilson J., Edsfeldt A. Reduced oxidized LDL in T2D plaques is associated with a greater statin usage but not with future cardiovascular events. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2020, Vol. 19, 214. doi: 10.1186/s12933-020-01189-z.
8. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat. Med.*, 2002, Vol. 8, no. 11, pp. 1211-1217.
9. Taylor J.A., Hutchinson M.A., Gearhart P.J., Maul R.W. Antibodies in action: the role of humoral immunity in the fight against atherosclerosis. *Immun. Ageing*, 2022, Vol. 19, no. 1, 59. doi: 10.1186/s12979-022-00316-6.
10. Tyanova S., Temu T., Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat. Protoc.*, 2016, Vol. 11, pp. 2301-2319.
11. Tyanova S., Temu T., Sinitcyn P., Carlson A., Hein M.Y., Geiger T., Mann M., Cox J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Met.*, 2016, Vol. 13, pp. 731-740.
12. Vreugdenhil A.C.E., Snoek A.M.P., van 't Veer C., Greve J.-W.M., Buurman W.A. LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhances endotoxin-LDL/VLDL interaction. *J. Clin. Investig.*, 2001, Vol. 107, no. 2, pp. 225-234.
13. Xin Y., Hertle E., van der Kallen C.J.H., Vogelzangs N., Arts I.C.W., Schalkwijk C.G., Stehouwer C.D.A., van Greevenbroek M.M.J. C3 and alternative pathway components are associated with an adverse lipoprotein subclass profile: The CODAM study. *J. Clin. Lipidol.*, 2021, Vol. 15, no. 2, pp. 311-319.
14. Ye J., Yang P., Yang Y., Xia S. Complement C1s as a diagnostic marker and therapeutic target: Progress and prospective. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1015128. doi: 10.3389/fimmu.2022.1015128.

**Авторы:**

**Киселева Д.Г.** — младший научный сотрудник кафедры биофизики биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы, Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

**Зиганшин Р.Х.** — к.х.н., старший научный сотрудник группы масс-спектрометрии ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Фотин Д.П.** — студент медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Маркин А.М.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы, Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»; старший преподаватель ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

**Authors:**

**Kiseleva D.G.**, Junior Research Associate, Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University; Junior Research Associate, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

**Ziganshin R.Kh.**, PhD (Chemistry), Senior Research Associate in the Mass Spectrometry Group, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

**Fotin D.P.**, Student, Medical and Biological Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

**Markin A.M.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Petrovsky National Research Center of Surgery; Senior Lecturer, P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Поступила 27.03.2024  
Отправлена на доработку 31.03.2024  
Принята к печати 01.04.2024

Received 27.03.2024  
Revision received 31.03.2024  
Accepted 01.04.2024



## ВЛИЯНИЕ ПРИЕМА СТАТИНОВ НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ МОНОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

Кириченко Т.В.<sup>1,2</sup>, Юдина И.Ю.<sup>3</sup>, Лукина М.В.<sup>3</sup>, Андрущишина Т.Б.<sup>3</sup>,  
Живодерников И.В.<sup>1</sup>, Маркина Ю.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова»  
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Москва,  
Россия

**Резюме.** В настоящее время статины являются основными средствами антиатеросклеротической терапии, поскольку обладают, помимо гиполипидемического действия, рядом эффектов, замедляющих прогрессирование атеросклероза, в том числе противовоспалительной эффективностью. Целью настоящего исследования явилось изучение воспалительного ответа моноцитов у больных с гемодинамически значимым атеросклерозом на фоне терапии гидрофильными и липофильными статинами, а также у пациентов с атеросклерозом, не получающих гиполипидемическую терапию. Всего в исследование включены 60 пациентов с гемодинамически значимым атеросклерозом коронарных артерий, в три группы: 1) получающие терапию атовастатином в течение не менее 12 месяцев до включения в исследование, n = 20; 2) получающие терапию розувастатином в течение не менее 12 месяцев до включения в исследование, n = 20; 3) не получавшие терапию статинами в течение года до включения в исследование, n = 20. Первичную культуру моноцитов участников исследования получали методом градиентного центрифугирования с последующей иммуномагнитной сепарацией CD14<sup>+</sup> моноцитов. Выделенные клетки культивировали в течение 7 суток без стимуляции и в условиях провоспалительной стимуляции с использованием липополисахарида (ЛПС). Методом иммуноферментного анализа определяли уровень базальной, ЛПС-стимулированной и повторно стимулированной секреции TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$ . Базальная секреция TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  у пациентов, получающих статины, была ниже, чем у пациентов, которые не получали статины в течение года, секреция обоих цитокинов была достоверно ниже в группе розувастатина. ЛПС-стимулированная секреция TNF $\alpha$  была недостоверно ниже в группах пациентов, получающих статины, секреция IL-1 $\beta$  была достоверно ниже в группах аторвастатина и розувастатина по сравнению с группой без статинов. Повторно стимулированная секреция IL-1 $\beta$  не отличалась достоверно между группами, повторно стимулированная секреция TNF $\alpha$  была

### Адрес для переписки:

Кириченко Татьяна Владимировна  
ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии  
имени академика Б.В. Петровского»  
119435, Россия, Москва, Абрикосовский пер., 2.  
Тел.: 8 (910) 461-58-45.  
E-mail: t-gorchakova@mail.ru

### Address for correspondence:

Tatiana V. Kirichenko  
Petrovsky National Research Centre of Surgery  
2 Abrikosovsky Lane  
Moscow  
119435 Russian Federation  
Phone: +7 (910) 461-58-45.  
E-mail: t-gorchakova@mail.ru

### Образец цитирования:

Т.В. Кириченко, И.Ю. Юдина, М.В. Лукина,  
Т.Б. Андрущишина, И.В. Живодерников, Ю.В. Маркина  
«Влияние приема статинов на воспалительный  
ответ моноцитов у пациентов с атеросклерозом»  
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,  
№ 2. С. 259-266.  
doi: 10.46235/1028-7221-16757-EOS

© Кириченко Т.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

T.V. Kirichenko, I.Yu. Yudina, M.V. Lukina,  
T.B. Andrushchishina, I.V. Zhivodernikov, Yu.V. Markina  
“Effect of statin administration on the inflammatory response  
of monocytes in patients with atherosclerosis”, *Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*, 2024,  
Vol. 27, no. 2, pp. 259-266.  
doi: 10.46235/1028-7221-16757-EOS

© Kirichenko T.V. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16757-EOS

достоверно ниже в группе розувастатина по сравнению с группами аторвастатина и без статинов. Таким образом, результаты исследования демонстрируют противовоспалительную эффективность розувастатина, выражающуюся в снижении секреции провоспалительных цитокинов культивируемыми моноцитами/макрофагами пациентов с выраженным коронарным атеросклерозом.

*Ключевые слова: атеросклероз, статины, моноциты, макрофаги, воспаление, цитокины*

## EFFECT OF STATIN ADMINISTRATION ON THE INFLAMMATORY RESPONSE OF MONOCYTES IN PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS

Kirichenko T.V.<sup>a,b</sup>, Yudina I.Yu.<sup>c</sup>, Lukina M.V.<sup>c</sup>, Andrushchishina T.B.<sup>c</sup>, Zhivodernikov I.V.<sup>a</sup>, Markina Yu.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Currently, statins are the main preparations of anti-atherosclerotic therapy due to a number of effects that reduce the progression of atherosclerosis, including anti-inflammatory effectiveness. The purpose of this study was to evaluate the inflammatory response of monocytes in patients with severe atherosclerosis during therapy with hydrophilic and lipophilic statins, as well as in patients with atherosclerosis not receiving lipid-lowering therapy. A total of 60 patients with severe atherosclerosis of the coronary arteries were included in the study in three groups: 1) receiving atorvastatin therapy for at least 12 months before inclusion in the study, n = 20; 2) receiving rosuvastatin therapy for at least 12 months before inclusion in the study, n = 20; and 3) those who had not received statin therapy within a year before inclusion in the study, n = 20. The primary culture of monocytes from study participants was obtained by gradient centrifugation followed by immunomagnetic separation of CD14<sup>+</sup> monocytes. The isolated cells were cultured for 7 days without stimulation and with pro-inflammatory stimulation using lipopolysaccharide (LPS). The level of basal, LPS-stimulated and re-stimulated secretion of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  was determined by enzyme immunoassay. Basal secretion of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in patients receiving statins was lower than in patients who did not receive statins for a year; the secretion of both cytokines was significantly lower in the rosuvastatin group. LPS-stimulated TNF $\alpha$  secretion was significantly lower in the groups of patients receiving statins; IL-1 $\beta$  secretion was significantly lower in the atorvastatin and rosuvastatin groups compared to the group without statins. Re-stimulated IL-1 $\beta$  secretion did not differ significantly between groups; re-stimulated TNF $\alpha$  secretion was significantly lower in the rosuvastatin group compared to the atorvastatin and non-statin groups. Thus, the results of the study demonstrate the anti-inflammatory effectiveness of rosuvastatin, expressed in a decrease in the secretion of pro-inflammatory cytokines by cultured monocytes/macrophages of patients with severe coronary atherosclerosis.

*Keywords: atherosclerosis, statins, monocytes, macrophages, inflammation, cytokines*

Исследование выполнено в рамках государственного задания ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (№ 123030700024-4).

### Введение

В настоящее время в многочисленных исследованиях доказана важная роль клеток врож-

денного иммунитета в контроле воспаления и аномального липидного обмена при атеросклерозе [11]. В ряде исследований продемонстрирована взаимосвязь поляризации макрофагов с прогрессированием атеросклероза [1]. Провоспалительная активация циркулирующих моноцитов, которые дифференцируются в макрофаги в области атеросклеротических поражений, мо-

жет быть важным механизмом развития хронического воспаления в патогенезе атеросклероза. Показано, что макрофаги, полученные из ЛПС-стимулированных моноцитов у пациентов с субклиническим атеросклерозом, демонстрируют повышенную секрецию провоспалительных цитокинов, ассоциированную с показателями атеросклероза сонных артерий [6].

Препараты группы ингибиторов 3-гидрокси-3-метил-глутарил-КоА редуктазы (статины) являются основными средствами антиатеросклеротической терапии и обладают, помимо гиполипидемического действия, рядом эффектов, замедляющих прогрессирование атеросклероза [7, 10]. В частности, в экспериментальных и клинических исследованиях были показаны антитромботические эффекты статинов, улучшение эндотелиальной функции, подавление поляризации макрофагов по воспалительному типу [8]. В животной модели у крыс с гиперхолестеринемией показано, что терапия статинами приводит к значимому снижению количества макрофагов, дифференцированных по воспалительному фенотипу [3]. Несмотря на то, что плеiotропный эффект статинов широко обсуждается в современной литературе, механизмы противовоспалительных эффектов статинов недостаточно изучены.

**Целью настоящего исследования** явилось изучение воспалительной активации и толерантности иммунного ответа моноцитов/макрофагов у больных с гемодинамически значимым атеросклерозом на фоне терапии гидрофильными и липофильными статинами, а также у пациентов с атеросклерозом, не получающих гиполипидемическую терапию.

## Материалы и методы

В исследование включали пациентов с гемодинамически значимым атеросклерозом коронарных артерий, у которых по результатам КАГ выявлен атеросклеротический стеноз в коронарных артериях более 65%, в три группы:

- 1) получающие терапию атовастатином в течение не менее 12 месяцев до включения в исследование,  $n = 20$ ;
- 2) получающие терапию розувастатином в течение не менее 12 месяцев до включения в исследование,  $n = 20$ ;
- 3) не получавшие терапию статинами в течение года до включения в исследование,  $n = 20$ .

Критерии исключения: сахарный диабет 2-го типа, онкологические заболевания, неконтролируемая артериальная гипертензия, декомпенсированные почечная или печеночная недостаточность, хроническая сердечная недостаточность.

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотренной версией 2013 г. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФГБУ НМИЦ Кардиологии им. акад. Е.И. Чазова МЗ РФ 28 февраля 2022 г., протокол № 277. Все участники предоставили письменные информированные согласия до включения в исследование.

Для характеристики участников исследования оценивали следующие факторы сердечно-сосудистого риска: артериальная гипертензия, курение, гиперлипидемия, повышение массы тела, наличие ССЗ у близких родственников в возрасте младше 60 лет. Показатели липидного профиля крови (концентрации общего холестерина, холестерина липопротеидов высокой и низкой плотности (ЛПВП, ЛПНП) и триглицеридов) определяли стандартными лабораторными методами. Для определения каротидного атеросклероза проводили ультразвуковое дуплексное сканирование сонных артерий.

Первичную культуру моноцитов участников исследования получали из цельной крови методом градиентного центрифугирования в градиенте фиколла с последующей иммуномагнитной сепарацией CD14<sup>+</sup> моноцитов и использованием колонок и парамагнитных наночастиц (Miltenyi Biotec Inc., США). Выделенные клетки культивировали в двух лунках культурального планшета в количестве 500 тыс. клеток в лунке в среде X-VIVO (Lonza Inc., Германия). В лунке 1 не проводили провоспалительную стимуляцию, оценивали базальную секрецию воспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в течение 24 ч после посадки. В лунке 2 проводили провоспалительную стимуляцию клеток с добавлением липополисахарида (ЛПС) в концентрации 1 мкг/мл в течение 24 ч после посадки для оценки ЛПС-стимулированной секреции, далее клетки культивировали в течение 5 суток без воспалительной стимуляции и повторно добавляли ЛПС в концентрации 1 мкг/мл на 24 ч для оценки воспалительного ответа макрофагов на повторную стимуляцию и характеристики толерантности иммунного ответа макрофагов. Концентрацию провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в образцах культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов (R&D Systems Inc., США).

Для статистического анализа полученных результатов использовали пакет программного обеспечения SPSS 27.0 (SPSS, США). Для оценки различий между группами был использован U-критерий Манна–Уитни. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного от-

клонения, Mean (SD). Корреляционный анализ проводили для оценки взаимосвязи воспалительного ответа моноцитов/макрофагов с факторами риска ССЗ.

## Результаты и обсуждение

Группы участников исследования с атеросклерозом коронарных артерий, принимавших аторвастатин или розувастатин более года, а также не получавших гиполипидемическую терапию в течение года до включения в исследование, не отличались достоверно по основным исследованным клиническим и лабораторным показателям. У всех участников исследования выявлен атеросклероз коронарных артерий со степенью

стеноза не менее 65% по данным КАГ. Клинико-лабораторные характеристики участников исследования представлены в таблице 1.

Для характеристики провоспалительной активности и толерантности иммунного ответа макрофагов была измерена базальная, ЛПС-стимулированная и повторно стимулированная секреция цитокинов TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , результаты представлены в таблицах 2 и 3.

Базальная секреция TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  у пациентов, получающих статины, была ниже, чем у пациентов, которые не получали гиполипидемическую терапию в течение последнего года, при этом в группе пациентов, получающих розувастатин, секреция обоих цитокинов была достоверно

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ УЧАСТНИКОВ ИССЛЕДОВАНИЯ, MEAN (SD)

TABLE 1. CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF STUDY PARTICIPANTS, MEAN (SD)

	Аторвастатин Atorvastatin n = 20	Розувастатин Rosuvastatin n = 20	Без статинов Without statins n = 20
Возраст, годы Age, years	59,9 (6,6) p = 0,155	63,7 (5,5) p = 0,798	63,1 (7,8)
Пол, м/ж Gender, m/f	9/11 p = 0,355	17/3 p = 0,001	9/11
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup> Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	28,7 (2,4) p = 0,078	26,6 (2,9) p = 0,860	26,8 (3,9)
Систолическое АД, мм рт. ст. Systolic BP, mmHg	130 (17) p = 0,569	116 (23) p = 0,248	126 (31)
Диастолическое АД, мм рт. ст. Diastolic BP, mmHg	80 (11) p = 0,950	76 (7) p = 0,144	80 (11)
Курение, % Smoking, %	25 p = 0,731	20 p = 0,478	30
Семейный анамнез ССЗ, % Family history of CHD, %	40 p = 0,753	45 p = 1,0	45
ТИМС ОСА, мм cIMT, mm	0,798 (0,197) p = 0,263	0,810 (0,156) p = 0,758	0,825 (0,157)
Общий холестерин, ммоль/л Total cholesterol, mmol/L	5,2 (0,7) p = 0,117	5,1 (0,8) p = 0,555	4,0 (1,1)
Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, mmol/L	1,1 (0,6) p = 0,291	1,4 (0,5) p = 0,884	1,3 (0,9)
ЛПНП, ммоль/л LDL, mmol/L	2,9 (0,8) p = 0,026	3,0 (0,8) p = 0,510	3,1 (0,8)
ЛПВП, ммоль/л HDL, mmol/L	1,5 (0,4) p = 0,535	1,3 (0,4) p = 0,408	1,4 (0,3)

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (Mean (SD)). АД – артериальное давление; ЛПВП – липопротеиды высокой плотности; ЛПНП – липопротеиды низкой плотности; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ТИМС ОСА – толщина интимо-медиального слоя общих сонных артерий; p – уровень значимости по отношению к контрольной группе.

Note. Data are presented as mean and standard deviation (Mean (SD)). BP, blood pressure; CHD, coronary heart disease; cIMT, carotid intima-media thickness; HDL, high density lipoproteins; LDL, low density lipoproteins; p, significance level in comparison with the control group.

ТАБЛИЦА 2. СЕКРЕЦИЯ TNF $\alpha$  В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ МОНОЦИТОВ/МАКРОФАГОВ УЧАСТНИКОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 2. TNF $\alpha$  SECRETION IN PRIMARY CULTURE OF MONOCYTES/MACROPHAGES OF STUDY PARTICIPANTS

TNF $\alpha$ , пг/мл TNF $\alpha$ , pg/mL	Аторвастатин Atorvastatin n = 20	Розувастатин Rosuvastatin n = 20	Без статинов Without statins n = 20
Базальная секреция Basal secretion	143 (142) p = 0,396	64 (32) p = 0,031	200 (257)
ЛПС-стимулированная секреция LPS-stimulated secretion	3939 (1717) p = 0,460	3680 (2391) p = 0,345	4611 (3625)
Повторно стимулированная секреция Re-stimulated secretion	113 (52) p = 0,845	82 (42) p = 0,031	117 (56)

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (Mean (SD)). ЛПС – липополисахарид, p – уровень значимости по отношению к группе без статинов.

Note. Data are presented as mean and standard deviation (Mean (SD)). LPS, lipopolysaccharide; p, significance level in comparison with the group without statins.

ТАБЛИЦА 3. СЕКРЕЦИЯ IL-1 $\beta$  В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ МОНОЦИТОВ/МАКРОФАГОВ УЧАСТНИКОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 3. IL-1 $\beta$  SECRETION IN PRIMARY CULTURE OF MONOCYTES/MACROPHAGES OF STUDY PARTICIPANTS

IL-1 $\beta$ , пг/мл IL-1 $\beta$ , pg/mL	Аторвастатин Atorvastatin n = 20	Розувастатин Rosuvastatin n = 20	Без статинов Without statins n = 20
Базальная секреция Basal secretion	107 (55) p = 0,302	72 (37) p = 0,020*	136 (108)
ЛПС-стимулированная секреция LPS-stimulated secretion	1061 (736) p = 0,002*	1004 (743) p = 0,001*	1841 (720)
Повторно стимулированная секреция Re-stimulated secretion	113 (58) p = 0,468	81 (21) p = 0,416	96 (77)

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ниже. ЛПС-стимулированная секреция TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  после 24 инкубации культивируемых клеток с ЛПС также была ниже в группах пациентов, получающих статины, но только секреция IL-1 $\beta$  была достоверно ниже в группах аторвастатина и розувастатина по сравнению с группой без статинов. Повторно стимулированная секреция IL-1 $\beta$  не отличалась достоверно между группами, повторно стимулированная секреция TNF $\alpha$  была достоверно ниже в группе розувастатина по сравнению с группами аторвастатина и без статинов.

Для оценки взаимосвязи воспалительного ответа моноцитов и традиционных факторов риска ССЗ на фоне терапии статинами был проведен корреляционный анализ. В группе аторвастатина выявлена корреляция базальной секреции TNF $\alpha$  с уровнем общего холестерина и ЛПНП, R = 0,589, p = 0,006 и R = 0,489, p = 0,034 соответственно. В группе розувастатина выявлена отри-

цательная корреляция секреции IL-1 $\beta$  с уровнем ЛПВП в сыворотке крови, R = 0,464, p = 0,039.

Результаты настоящего исследования демонстрируют противовоспалительную эффективность статинов, которая выражается в подавлении секреции противовоспалительных цитокинов, культивируемыми макрофагами пациентов с атеросклерозом, причем в группе розувастатина показано статистически значимое снижение секреции в отличие от группы аторвастатина, в которой результаты не достигли статистической достоверности. В другом исследовании, направленном на сравнение эффективности липофильных и гидрофильных статинов, также показано значимое снижение секреции провоспалительных цитокинов в модели *in vitro*, при этом аторвастатин был достоверно более эффективен [9]. Однако исследование проводилось на первичной культуре моноцитов-макрофагов, полученных от здоровых доноров. Секреция цитокинов, инду-

цированная ЛПС, определялась после инкубации клеток со статинами, т. е. данный метод не учитывает особенностей воспалительной активации моноцитов у пациентов с атеросклерозом.

Ранее было показано, что статины вызывают различные провоспалительные реакции на клеточных и животных моделях. Липофильные статины, в частности аторвастатин, влияют на регуляторные пути в моноцитах, которые контролируют продукцию воспалительных цитокинов [2, 5]. Одним из механизмов противовоспалительного действия аторвастатина является ингибирование функции инфламмасом NLRP3, которые являются источником медиаторов воспаления, в частности провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  [4]. В других исследованиях показано, что в моноцитах пациентов с атеросклерозом на фоне терапии розувастатином значимо повышена экспрессия маркеров поляризации макрофагов по M2-фенотипу, в частности противовоспалительных медиаторов CCL18 и IL-10 [12].

## Заключение

Результаты настоящего исследования демонстрируют противовоспалительную эффективность статинов, выражающуюся в снижении секреции провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  культивируемыми моноцитами/макрофагами пациентов с выраженным коронарным атеросклерозом, получающих терапию аторвастатином и розувастатином, по сравнению с пациентами с атеросклерозом, не получавшими терапию статинами. При этом наиболее выраженное и статистически достоверное снижение секреции TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  наблюдалось в группе пациентов, получающих розувастатин. Таким образом, розувастатин можно рассматривать как препарат выбора для патогенетической терапии и профилактики атеросклероза и ассоциированных сердечно-сосудистых заболеваний, однако требуются дополнительные исследования с большим количеством участников, более длительным сроком терапии и более широким спектром исследуемых цитокинов.

## Список литературы / References

1. Hutton M., Frazer M., Lin A., Patel S., Misra A. New targets in atherosclerosis: vascular smooth muscle cell plasticity and macrophage polarity. *Clin. Ther.* 2023, Vol. 45, no. 11, pp. 1047-1054.
2. Jinnouchi H., Guo L., Sakamoto A., Torii S., Sato Y., Cornelissen A., Kuntz S., Paek K.H., Fernandez R., Fuller D., Gadhoke N., Surve D., Romero M., Kolodgie F.D., Virmani R., Finn A.V. Diversity of macrophage phenotypes and responses in atherosclerosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2020, Vol. 77, no. 10, pp. 1919-1932.
3. Kauerova S., Bartuskova H., Muffova B., Janousek L., Froncek J., Petras M., Poledne R., Kralova Lesna I. Statins directly influence the polarization of adipose tissue macrophages: a role in chronic inflammation. *Biomedicines*. 2021, Vol. 9, no. 2, 211. doi: 10.33
4. Koushki K., Shahbaz S.K., Mashayekhi K., Sadeghi M., Zayeri Z.D., Taba M.Y., Banach M., Al-Rasadi K., Johnston T.P., Sahebkar A. Anti-inflammatory action of statins in cardiovascular disease: the role of inflammasome and toll-like receptor pathways. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2021, Vol. 60, no. 2, pp. 175-199.
5. Lin P., Ji H.H., Li Y.J., Guo S.D. Macrophage plasticity and atherosclerosis therapy. *Front. Mol. Biosci.*, 2021, Vol. 8, 679797. doi: 10.3389/fmolb.2021.679797.
6. Nikiforov N.G., Kirichenko T.V., Kubekina M.V., Chegodaev Y.S., Zhuravlev A.D., Ilchuk L.A., Nikolaeva M.A., Arefieva A.S., Popov M.A., Verkhova S.S., Bagheri Ekta M., Orekhov A.N. Macrophages derived from LPS-stimulated monocytes from individuals with subclinical atherosclerosis were characterized by increased pro-inflammatory activity. *Cytokine*, 2023, Vol. 172, 156411. doi: 10.1016/j.cyto.2023.156411.
7. Oesterle A., Laufs U., Liao J.K. Pleiotropic effects of statins on the cardiovascular system. *Circ. Res.*, 2017, Vol. 120, no. 1, pp. 229-243.
8. Pedersen T.R. Pleiotropic effects of statins: evidence against benefits beyond LDL-cholesterol lowering. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 2010, Vol. 10, no. 1, pp. 10-17.
9. Ruleva N.Y., Radyukhina N.V., Zubkova E.S., Filatova A.Y., Aref'eva T.I. Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase (statins) suppress differentiation and reduce LPS/IFN $\gamma$ -induced cytokine production in human monocyte/macrophage culture. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2020, Vol. 170, no. 2, p. 236-240.
10. Singh M., McEvoy J.W., Khan S.U., Wood D.A., Graham I.M., Blumenthal R.S., Mishra A.K., Michos E.D. Comparison of transatlantic approaches to lipid management: The AHA/ACC/multisociety guidelines vs the ESC/EAS Guidelines. *Mayo Clin. Proc.*, 2020, Vol. 95, no. 5, pp. 998-1014.

11. Zhang T., Pang C., Xu M., Zhao Q., Hu Z., Jiang X., Guo M. The role of immune system in atherosclerosis: Molecular mechanisms, controversies, and future possibilities. *Hum. Immunol.*, 2024, Vol. 85, no. 2, 110765. doi: 10.1016/j.humimm.2024.110765.
12. Zhang X., Qin Y., Wan X., Liu H., Lv C., Ruan W., He L., Lu L., Guo X. Rosuvastatin exerts anti-atherosclerotic effects by improving macrophage-related foam cell formation and polarization conversion via mediating autophagic activities. *J. Transl. Med.*, 2021, Vol. 19, no. 1, 62. doi: 10.1186/s12967-021-02727-3.

---

**Авторы:**

**Кириченко Т.В.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»; научный сотрудник лаборатории медицинской генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Юдина И.Ю.** — к.м.н., доцент кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Москва, Россия

**Лукина М.В.** — к.м.н., доцент кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского, врач — клинический фармаколог Университетской клинической больницы № 1 ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Москва, Россия

---

**Authors:**

**Kirichenko T.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Petrovsky National Research Centre of Surgery; Research Associate, Laboratory of Medical Genetics, Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation

**Yudina I.Yu.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

**Lukina M.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, clinical pharmacologist of the University Clinical Hospital No. 1, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

**Андрущишина Т.Б.** — к.м.н., доцент кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского, врач — клинический фармаколог Университетской клинической больницы № 1 ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Москва, Россия

**Живодерников И.В.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

**Маркина Ю.В.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

**Andrushchishina T.B.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, clinical pharmacologist of the University Clinical Hospital No. 1, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

**Zhivodernikov I.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

**Markina Yu.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 29.03.2024  
Принята к печати 01.04.2024

Received 29.03.2024  
Accepted 01.04.2024



# ДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ В-ЛИМФОЦИТОВ С ФЕНОТИПОМ CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>, БОЛЕВШИХ И НЕ БОЛЕВШИХ COVID-19

Сафронова Э.А.

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

Медико-биологический университет инноваций и непрерывного образования ФГБУ «Государственный научный  
центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна»  
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

**Резюме.** Целью работы явилось изучение динамических особенностей гуморального звена иммунитета у пациентов с острым коронарным синдромом в зависимости от содержания В-лимфоцитов с фенотипом CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>, болевших и не болевших COVID-19. Проанализированы данные показателей гуморального иммунитета у мужчин в возрасте от 40 до 65 лет с острым коронарным синдромом, болевших и не болевших COVID-19, в зависимости от содержания В-лимфоцитов с фенотипом CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>. Всем пациентам проводилась коронароангиография с дальнейшим стентированием коронарных артерий. Учитывали значения лимфоцитов с фенотипом CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> и наличие или отсутствие COVID-19 ранее.

Методом проточной цитометрии гейтировали по панлейкоцитарному маркеру CD45<sup>+</sup> 2 группы: подгруппа В-лимфоцитов CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> и подгруппа В-лимфоцитов CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>, В-лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>). Уровни общих IgA, IgG, IgM, С1-ингибитора, С3а и С5а компонентов комплемента методом иммуноферментного анализа.

После стентирования коронарных артерий В-лимфоциты (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) значительно повысились в группе лиц, болевших COVID-19, с исходно низкими этими клетками ( $p < 0,01$ ) и нормальными клетками ( $p < 0,05$ ). У лиц, перенесших COVID-19 и не болевших этим заболеванием, с исходно пониженными CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> клетками значительно ( $p < 0,001$  и  $p < 0,05$  соответственно) выросли в

---

## Адрес для переписки:

Сафронова Элеонора Аркадьевна  
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
454141, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.  
Тел.: 8 (982) 316-34-71.  
E-mail: safronovaeleonora68@gmail.com

## Address for correspondence:

Eleonora A. Safronova  
South Ural State Medical University  
64 Vorovsky St  
Chelyabinsk  
454141 Russian Federation  
Phone: + 7 (982) 316-34-71.  
E-mail: safronovaeleonora68@gmail.com

---

## Образец цитирования:

Э.А. Сафронова «Динамические особенности  
гуморального звена иммунитета у пациентов с острым  
коронарным синдромом в зависимости от содержания  
В-лимфоцитов с фенотипом CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>,  
болевших и не болевших COVID-19» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 267-272.  
doi: 10.46235/1028-7221-16829-DFO

© Сафронова Э.А., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

E.A. Safronova “Dynamic features of the humoral immunity  
in patients with acute coronary syndrome depending on  
the content of B lymphocytes with the CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>  
phenotype, who have and have not COVID-19”, Russian  
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 267-272.  
doi: 10.46235/1028-7221-16829-DFO

© Safronova E.A., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16829-DFO

динамике ( $p < 0,05$ ) В-лимфоциты ( $CD45^+CD3^-CD19^+$ ), В-лимфоциты ( $CD3^-CD19^+CD5^-$ ). В группе больных, переболевших COVID-19, с нормальными  $CD3^-CD19^+CD5^+$  клетками в динамике снизилось ( $p < 0,01$ ) относительное число В-лимфоцитов ( $CD45^+CD3^-CD19^+$ ) и  $CD3^-CD19^+CD5^-$  клеток. У лиц, болевших ранее COVID-19, с повышенными  $CD3^-CD19^+CD5^+$  клетками в динамике значительно ( $p < 0,05$ ) понизилось число В-лимфоцитов ( $CD45^+CD3^-CD19^+$ ), у не болевших COVID-19 с высокими вышеупомянутыми клетками достоверно ( $p < 0,05$ ) увеличился иммуноглобулин А. Наиболее тяжелой в клиническом плане была группа лиц с пониженными  $CD3^-CD19^+CD5^+$ В-клетками и COVID-19 в анамнезе.

*Ключевые слова:*  $CD3^-CD19^+CD5^+$  лимфоциты, Т-лимфоциты, COVID-19, острый коронарный синдром, стентирование коронарных артерий, иммунная система

## DYNAMIC FEATURES OF THE HUMORAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME DEPENDING ON THE CONTENT OF B LYMPHOCYTES WITH THE $CD3^-CD19^+CD5^+$ PHENOTYPE, WHO HAVE AND HAVE NOT COVID-19

Safronova E.A.

*South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation*

*University of Innovation and Continuing Education of the State Research Center – Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** The purpose of the work was to study the dynamic features of the humoral immunity in patients with acute coronary syndrome depending on the content of B lymphocytes with the  $CD3^-CD19^+CD5^+$  phenotype, who had and did not have COVID-19. We analyzed data on humoral immunity in men aged 40 to 65 years with acute coronary syndrome, who had and did not have COVID-19, depending on the content of B lymphocytes with the  $CD3^-CD19^+CD5^+$  phenotype. All patients underwent coronary angiography with further stenting of the coronary arteries. The values of lymphocytes with the  $CD45^+CD3^-CD19^+$  phenotype and the presence or absence of COVID-19 previously were taken into account. Using the flow cytometry method, 2 groups were gated using the pan-leukocyte marker  $CD45^+$ : the subgroup of B lymphocytes  $CD3^-CD19^+CD5^+$  and the subgroup of B lymphocytes  $CD3^-CD19^+CD5^-$ , B lymphocytes ( $CD45^+CD3^-CD19^+$ ). Levels of total IgA, IgG, IgM, C1-inhibitor, C3a and C5a complement components by enzyme immunoassay.

After coronary artery stenting, B lymphocytes ( $CD3^-CD19^+CD5^+$ ) significantly increased in the group of people with COVID-19, with initially low levels of these cells ( $p < 0.01$ ) and normal cells ( $p < 0.05$ ). In individuals who had COVID-19 and did not have this disease, with initially decreased  $CD3^-CD19^+CD5^+$  cells, B lymphocytes ( $CD45$ ) increased significantly ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , respectively) over time ( $p < 0.05^+CD3^-CD19^+$ ), B lymphocytes ( $CD3^-CD19^+CD5^-$ ). In the group of patients who recovered from COVID-19 with normal  $CD3^-CD19^+CD5^+$  cells, the relative number of B-lymphocytes decreased over time ( $p < 0.01$ ) ( $CD45^+CD3^-CD19^+$ ) and  $CD3^-CD19^+CD5^-$  cells. In persons who had previously suffered from COVID-19, with increased  $CD3^-CD19^+CD5^+$  cells, the number of B-lymphocytes ( $CD45^+$ ) significantly ( $p < 0.05$ ) decreased over time  $CD3^-CD19^+$ , in those who did not have COVID-19 with high above-mentioned cells, immunoglobulin A significantly ( $p < 0.05$ ) increased. The most severe clinically was the group of people with low  $CD3^-CD19^+CD5^+$ В cells and COVID-19 in the anamnesis.

*Keywords:*  $CD3^-CD19^+CD5^+$  lymphocytes, T lymphocytes, COVID-19, acute coronary syndrome, coronary artery stenting, immune system

## Введение

COVID-19 повышает риск сердечно-сосудистых событий, в том числе острого коронарного синдрома (ОКС) – острого инфаркта миокарда (ОИМ) и нестабильной стенокардии. ОКС часто наблюдаются у пациентов с COVID-19 и могут влиять на клиническое течение и смертность пациентов. Хотя основной патогенез остается неясным, было высказано предположение о нескольких потенциальных механизмах, включая дисбаланс снабжения/потребления кислорода, прямое вирусное повреждение клеток, системную воспалительную реакцию с цитокин-опосредованным повреждением, микрососудистый тромбоз и эндотелиальную дисфункцию. COVID-19 способствует нестабильности атеросклеротических бляшек и образованию тромбов и может спровоцировать ОИМ 1-го типа [6]. Во время национальной вспышки 2020 года в Италии сопутствующий диагноз COVID-19 при ИМбпST был связан со значительно более высоким уровнем смертности [5].

Ретроспективное когортное исследование 335 взрослых с ОКС было проведено в Великобритании. За время пандемии увеличилась доля инфарктов миокарда с подъемом сегмента ST. Время ишемии росло с увеличением времени от появления симптомов до первого медицинского контакта со 191 минуты в контрольном периоде до 292 минут в первой волне ( $p = 0,06$ ) и 271 минуты во второй волне ( $p = 0,06$ ). Коронарография с последующей реваскуляризацией достоверно увеличилась с 55% в контрольном периоде реваскуляризации до 69% в первой волне ( $p < 0,001$ ) и 74% во второй волне ( $p < 0,001$ ) [8].

После заражения вирусным антигеном адаптивные иммунные реакции активируются главным образом за счет встреч вирусных частиц с антигенпрезентирующими клетками или В-клеточными рецепторами, которые индуцируют дальнейшие биологические взаимодействия для защиты хозяина от вируса. После того, как инфекция предотвращена, развивается иммунологическая память. Было показано, что клеточный иммунитет к SARS-CoV сохраняется даже через несколько лет после заражения, несмотря на необнаружимый гуморальный компонент [7]. Добрынина М.А. и др. изучали проблемы иммунопатологии у постковидных пациентов [1].

Согласно данным проанализированной литературы, недостаточно изучен гуморальный иммунитет у пациентов с острым коронарным синдромом, в том числе болевших COVID-19, что определяет актуальность проведенного исследования.

**Целью работы** явилось изучение динамических особенностей гуморального звена иммуни-

тета у пациентов с острым коронарным синдромом в зависимости от содержания В-лимфоцитов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>, болевших и не болевших COVID-19.

## Материалы и методы

Проанализированы данные показателей гуморального иммунитета у мужчин с ОКС, болевших и не болевших COVID-19, в зависимости от содержания В-лимфоцитов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>. Возраст больных был от 40 до 65 лет. Всем пациентам в зависимости от клинической ситуации в экстренном или отсроченном порядке проводилась коронароангиография с дальнейшим стентированием коронарных артерий на аппарате Innova JE и имплантация стентов с лекарственным покрытием Xience Alpine. Перед имплантацией стентов проводилась баллонная ангиопластика катетером Sapphire. Все больные подписывали информированное согласие (протокол Этического комитета ЮУГМУ Минздрава России № 9 от 11.09.2006 и протокол этического комитета ГАУЗ ОТКЗ ГКБ № 1 г. Челябинска № 12 от 10.10.2022). Иммунологические параметры были определены с помощью метода проточной цитометрии [2]. Учитывали значения лимфоцитов с фенотипом CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> и наличие или отсутствие COVID-19 ранее, пациентов поделили на группы. В группе перенесших в анамнезе COVID-19: группа со сниженным количеством В-клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> (22 человека), средний возраст 55,91±1,41 года, группа с нормальным числом В-клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> (22 человека), средний возраст 55,86±1,44; группа с повышенным изучаемым показателем (3 больных), средний возраст 55,33±2,13. Не болевшие COVID-19, но вакцинированные: группа (11 человек) – с пониженными, группа (7 пациентов), средний возраст 52,28±2,17 года – в пределах нормы и группа (4 человека), средний возраст 54,25±2,3 года – с повышенными В-лимфоцитами CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>.

Методом проточной цитометрии гейтировали по панлейкоцитарному маркеру CD45<sup>+</sup> 2 группы: подгруппа В-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> и подгруппа В-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>, В-лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), с помощью моноклональных антител компаний Beckman Coulter и BioLegend (США). Оценку иммунного статуса осуществляли методом проточной цитометрии на цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter, США) по стандартизованной технологии оценки лимфоцитарного звена иммунитета [2, 3]. Уровни общих IgA, IgG, IgM, С1-ингибитора, С3а и С5а компонентов комплемента (АО «Вектор-Бест», ООО «Цитокин», Россия) методом иммуноферментного анализа на иммуно-

ферментном анализаторе Multiscan FC Thermo Scientific (Китай). Исследование проводилось общепринятыми стандартизованными методами иммуоферментного анализа согласно протоколам производителей тест-систем.

## Результаты и обсуждение

Из числа лиц с пониженными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>В-клетками с COVID-19 в анамнезе ОИМ с подъемом сегмента ST (ОИМспST) отмечался у 9 (40,91%) пациентов, ОИМ без подъема ST (ОИМбпST) – у 2 (9,09%), нестабильная стенокардия (НС) – у 11 (50%). Среднее число установленных стентов в настоящую госпитализацию  $1,77 \pm 0,17$ . Кардиогенный шок отмечался у 2 (9,09%) больных, тромбозы стентов отмечались только в этой группе пациентов – у 2 (9,09%), и был один умерший. У больных с нормальными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>В-клетками с COVID-19 в анамнезе ОИМспST отмечался у 6 (27,27%) пациентов, ОИМбпST – у 8 (36,36%), НС – у 8 (36,36%), количество стентов –  $1,68 \pm 0,16$ , кардиогенный шок у 1 (4,55%). У пациентов с повышенными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>В-клетками с COVID-19 в анамнезе ОИМспST наблюдался у 2 (66,67%) пациентов, НС – у 1 (33,33%), всем установлено по 1 стенту. У лиц с низкими CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>В-клетками без COVID-19 в анамнезе ОИМспST был у 1 (25%) пациентов, НС – у 3 (75%), среднее количество стентов  $1,75 \pm 0,22$ . У больных с нормальными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> В-клетками без COVID-19 в анамнезе ОИМбпST наблюдался у 2 (28,57%), НС у 5 (71,43%), число стентов  $1,57 \pm 0,18$ . У всех пациентов с повышенными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> В-клетками без COVID-19 ранее была НС, всем имплантировано по 1 стенту в настоящую госпитализацию.

Наименьшее число В-лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) в относительном плане ( $8,90 \pm 1,16\%$ ) было меньше у лиц, болевших COVID-19 и имеющих пониженные В-клетки с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>, что достоверно ( $p < 0,0001$ ) отличалось от групп с нормальными ( $14,51 \pm 0,88\%$ ) и повышенными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> клетками ( $15,13 \pm 2,09\%$ ), перенесшими COVID-19, и от лиц с нормальными ( $16,66 \pm 2,07\%$ ) и повышенными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> клетками ( $22,4 \pm 3,95$ ), не болевшими COVID-19. Достоверно ( $p < 0,05$ ) в динамике в относительном плане повысились В-лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) у больных с исходно низкими В-клетками с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>, не болевшими COVID-19 (с  $10,18 \pm 3,81\%$  до  $19,1 \pm 7,56\%$ ), и снизились относительно ( $p < 0,01$ ) у пациентов с нормальными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> клетками, перенесшими COVID-19. В абсолютных цифрах произошло в динамике

возрастание этого показателя у больных с пониженными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> клетками, перенесшими COVID-19: с  $128,05 \pm 13,99$  до  $194,82 \pm 18,77$ ,  $10^6$  кл/л ( $p < 0,001$ ) и не болевшими COVID-19: с  $124 \pm 54,48$  до  $283,5 \pm 54,47$ ,  $10^6$  кл/л ( $p < 0,05$ ).

Иммуноглобулин А достоверно повысился ( $p < 0,05$ ) у пациентов, не болевших COVID-19 и имевших высокие CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>клетки: с  $1,24 \pm 0,52$  г/л до  $1,55 \pm 0,57$  г/л. Наибольшие показатели общего иммуноглобулина М отмечались у больных, не болевших COVID-19, с нормальными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> клетками ( $1,87 \pm 0,77$  г/л) и значимо ( $p < 0,01$ ) отличались от лиц без COVID-19 в анамнезе с исходно низкими ( $0,53 \pm 0,15$  г/л) и нормальными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> лимфоцитами ( $0,61 \pm 0,12$  г/л). Иммуноглобулин G был минимальным у пациентов с повышенными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> клетками, переболевших COVID-19 ( $5,51 \pm 3,08$  г/л), значимо отличался от лиц, болевших COVID-19, с низкими ( $p < 0,01$ ):  $13,23 \pm 0,92$  г/л и нормальными ( $p < 0,05$ ) CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> лимфоцитами ( $11,43 \pm 1,43$  г/л), и не болевших COVID-19, с нормальным уровнем CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> клеток:  $11,52 \pm 1,28$  г/л ( $p < 0,05$ ).

С1-ингибитор был наименьшим ( $176,93 \pm 21,59$  нг/мл) у лиц, не болевших COVID-19 с низкими CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> клетками и достоверно ( $p < 0,05$ ) отличался от таковых с нормальным вышеупомянутым фенотипом клеток ( $227,38 \pm 18,71$  нг/мл), а также статистически значимо вырос в динамике –  $237,47 \pm 32,37$  нг/мл ( $p < 0,05$ ). Также этот параметр был достоверно ниже у пациентов с нормальными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> клетками, переболевшими COVID-19 ( $199,49 \pm 19,38$  нг/мл), в сопоставлении с больными с вышеупомянутыми высокими клетками, не болевшими COVID-19:  $307,65 \pm 135,37$  г/мл ( $p < 0,05$ ).

Максимальное количество С3а-фрагмента комплемента ( $167,66 \pm 14,52$  нг/мл) наблюдалось у лиц с нормальными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> лимфоцитами по сравнению с пациентами с повышенными данными клетками, не болевшими COVID-19:  $142,28 \pm 9,40$  нг/мл ( $p < 0,05$ ).

Минимальное содержание С5а фрагмента комплемента исходно отмечалось у пациентов с повышенными CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> лимфоцитами, не болевшими COVID-19 ( $29,33 \pm 7,02$  нг/мл), и достоверно ( $p < 0,05$ ) отличалось от пациентов с низкими CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> клетками, болевшими ( $51,93 \pm 3,87$  нг/мл) и не болевшими COVID-19 ( $43,82 \pm 3,65$  нг/мл).

Значимое повышение CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> лимфоцитов в динамике, как в абсолютном, так и относительном плане, произошло при исходно низких этих показателях у лиц, болевших COVID-19: с  $12,77 \pm 1,17$ ,  $10^6$  кл/л до  $42,91 \pm 9,07$ ,

$10^6$  кл/л ( $p < 0,01$ ). Также значимо увеличился этот параметр в динамике у больных с исходно нормальными  $CD3^+CD19^+CD5^+$  клетками, перенесших ранее COVID-19: с  $47,05 \pm 4,75$ ,  $10^6$  кл/л до  $66,27 \pm 12,11$ ,  $10^6$  кл/л ( $p < 0,05$ ).

$CD3^+CD19^+CD5^-$  значимо ( $p < 0,05$ ) выросли в динамике у пациентов, болевших и не болевших COVID-19, с низкими  $CD3^+CD19^+CD5^+$  клетками: с  $115,32 \pm 13,41$  до  $152,32 \pm 18,14$ ,  $10^6$  кл/л и с  $109,5 \pm 52,14$  до  $237,25 \pm 38,35$ ,  $10^6$  кл/л соответственно. У пациентов с низкими  $CD3^+CD19^+CD5^+$  клетками, болевшие COVID-19, лимфоциты  $CD3^+CD19^+CD5^-$  как в абсолютном, так и относительном плане значимо ( $p < 0,0001 - 0,05$ ) отличались от других групп, кроме группы с низкими  $CD3^+CD19^+CD5^+$  клетками, не имевших в анамнезе COVID-19. Статистически достоверные различия  $CD3^+CD19^+CD5^-$  наблюдались у лиц, не болевших COVID-19, с низкими  $CD3^+CD19^+CD5^+$  клетками ( $109,5 \pm 52,14$ ,  $10^6$  кл/л) в сопоставлении с таковыми с нормальными вышеупомянутыми лимфоцитами, имевших ( $238,36 \pm 28,44$ ,  $10^6$  кл/л) —  $p < 0,05$  и не имевших —  $p < 0,01$  ( $301,0 \pm 38,35$ ,  $10^6$  кл/л) в анамнезе COVID-19, а также с повышенными  $CD3^+CD19^+CD5^+$  лимфоцитами, не болевшими COVID-19. Кроме того, регистрировались достоверные различия  $CD3^+CD19^+CD5^-$  у больных с нормальными  $CD3^+CD19^+CD5^+$  клетками, перенесшими COVID-19, в сопоставлении с лицами с повышенными вышеупомянутыми клетками ( $436,25 \pm 157,47$ ,  $10^6$  кл/л), не болевшими COVID-19 ( $p < 0,05$ ).

Наиболее клинически тяжелой группой в нашем исследовании были пациенты, переболевшие COVID-19 и имеющие низкие В-лимфоциты с фенотипом  $CD3^+CD19^+CD5^+$ , которые необходимы для выработки иммуноглобулинов, играющих роль в иммунологической защите, в том числе и при ОКС. Несмотря на раннюю реперфузию, у больных с ОИМспST может быть обширный некроз миокарда и значимое снижение функции желудочков. Работа Casarotti A.C.A. и соавт. [4] была посвящена значению подтипов В-лимфоцитов в обширности ОИМ и сократительной функции левого желудочка. Проводилась магнитно-резонансная томография (МРТ) сердца через 30 дней ОИМспST. В исследовании участвовали 120 лиц с ОИМпST.  $CD3^+CD19^+CD5^+$  клетки определялись в 1-й и 30-й дни от момента возникновения ОИМспST. Количество  $CD3^+$

$CD19^+CD5^+$  лимфоцитов (клеток/мл) в 1-й день было связано с обширностью некроза миокарда, определенной с помощью МРТ сердца на 30-й день.  $CD3^+CD19^+CD5^+$  клетки были связаны с  $CD4^+$  Т-лимфоцитами на 1-й и 30-й дни, тогда как классические лимфоциты  $CD3^+CD19^+CD5^-$  на 30-й день были предикторами фракции выброса левого желудочка. У больных с ОИМспST, несмотря на раннюю реперфузию, количество некроза миокарда и сердечный выброс были связаны с воспалительными реакциями, запускаемыми циркулирующими В-лимфоцитами. Таким образом, наши исследования и данные литературы вывели большую значимость определения различных субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с острым коронарным синдромом, перенесшим COVID-19, являющимся по сути проявлением постковидного синдрома с нарушением иммунной системы.

## Выводы

1. После стентирования коронарных артерий В-лимфоциты ( $CD3^+CD19^+CD5^+$ ) значимо повысились в группе лиц, болевших COVID-19, с исходно низкими этими клетками ( $p < 0,01$ ) и нормальными клетками ( $p < 0,05$ ).

2. У лиц, перенесших COVID-19 и не болевших этим заболеванием, с исходно пониженными  $CD3^+CD19^+CD5^+$  клетками значимо ( $p < 0,001$  и  $p < 0,05$  соответственно) выросли в динамике ( $p < 0,05$ ) В-лимфоциты ( $CD45^+CD3^+CD19^+$ ), В-лимфоциты ( $CD3^+CD19^+CD5^-$ ). В группе лиц, не болевших COVID-19, с низкими  $CD3^+CD19^+CD5^+$  лимфоцитами дополнительно в динамике увеличился С1-ингибитор ( $p < 0,05$ ).

3. В группе больных, переболевших COVID-19, с нормальными  $CD3^+CD19^+CD5^+$  клетками в динамике снизилось ( $p < 0,01$ ) относительное число В-лимфоцитов ( $CD45^+CD3^+CD19^+$ ) и  $CD3^+CD19^+CD5^-$  клеток.

4. У лиц, болевших ранее COVID-19, с повышенными  $CD3^+CD19^+CD5^+$  клетками в динамике значимо ( $p < 0,05$ ) понизилось число В-лимфоцитов ( $CD45^+CD3^+CD19^+$ ), у не болевших COVID-19 с высокими вышеупомянутыми клетками достоверно ( $p < 0,05$ ) увеличился иммуноглобулин А.

5. Наиболее тяжелой в клиническом плане была группа лиц с пониженными  $CD3^+CD19^+CD5^+$  клетками и COVID-19 в анамнезе.

## Список литературы / References

1. Добрынина М.А., Ибрагимов Р.В., Крицкий И.С., Верховская М.Д., Мосунов А.А., Сарапульцев Г.П., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Сарапульцев А.П., Комелькова М.В., Рябова Л.В., Праскурничий Е.А. Постковидный синдром иммунопатологии. Характеристика фенотипических изменений иммунной системы у постковидных пациентов // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 4. С. 791-796. [Dobrynina M.A., Ibragimov R.V., Kritsky I.S., Verkhovskaya M.D., Mosunov A.A., Sarapultsev G.P., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Sarapultsev A.P.,

Komelkova M.V., Ryabova L.V., Praskurnichiy E.A. Post-COVID immunopatology syndrome: characteristics of phenotypical changes in the immune system in post-COVID patients. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 791-796]. doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2707.

2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. 2-е изд., доп. и расш. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014. 576 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in medicine and biology. 2<sup>nd</sup> ed., supplemented and expanded. Yekaterinburg: RIO Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. 576 p.

3. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 974-992. [Khaidukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. Standardized technology “Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytofluorimeter analyzers. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 974-992. (In Russ.)]

4. Casarotti A.C.A., Teixeira D., Longo-Maugeri I.M., Ishimura M.E., Coste M.E.R., Bianco H.T., Moreira F.T., Vacchin A.F., Izar M.C., Gonçalves I., Caixeta A., Szarf G., Pinto I.M., Fonseca F.A. Role of B lymphocytes in the infarcted mass in patients with acute myocardial infarction. *Biosci. Rep.*, 2021, Vol. 41, no. 2, BSR20203413. doi: 10.1042/BSR20203413.

5. de Luca L., Rosato S., D’Errigo P., Giordani B., Mureddu G.F., Badoni G., Seccareccia F., Baglio G. Covid-19 diagnosis and mortality in patients with non-ST-elevation myocardial infarction admitted in Italy during the national outbreak. *Int. J. Cardiol.*, 2023, Vol. 1, no. 370, pp. 447-453.

6. Esposito L., Cancro F.P., Silverio A., di Maio M., Iannece P., Damato A., Alfano C., de Luca G., Vecchione C., Galasso G. COVID-19 and acute coronary syndromes: from pathophysiology to clinical perspectives. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2021, Vol. 2021, 4936571. doi: 10.1155/2021/4936571.

7. Primorac D., Vrdoljak K., Brlek P., Pavelić E., Molnar V., Matišić V., Erceg Ivkošić I., Parčina M. Adaptive immune responses and immunity to SARS-CoV-2. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 848582. doi: 10.3389/fimmu.2022.848582.

8. Sutherland N., Dayawansa N.H., Filipopoulos B., Vasanthakumar S., Narayan O., Ponnuthurai F.A., van Gaal W. Acute coronary syndrome in the COVID-19 pandemic: reduced cases and increased ischaemic time. *Heart Lung Circ.*, 2022, Vol. 31, no. 1, pp. 69-76.

---

**Автор:**

**Сафронова Э.А.** — к.м.н., доцент кафедры поликлинической терапии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск; ассистент кафедры терапии Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

**Author:**

**Safronova E.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Polyclinic Therapy and Clinical Pharmacology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk; Assistant Professor, Department of Therapy of the University of Innovation and Continuing Education of the State Research Center — Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 31.03.2024

Отправлена на доработку 03.04.2024

Принята к печати 06.04.2024

Received 31.03.2024

Revision received 03.04.2024

Accepted 06.04.2024

## **ВЛИЯНИЕ ИНТЕРВАЛЬНОЙ ГИПОКСИТЕРАПИИ НА ИММУННЫЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ**

**Борукаева И.Х.<sup>1</sup>, Абазова З.Х.<sup>1</sup>, Иванов А.Б.<sup>1</sup>, Шхагумов К.Ю.<sup>1</sup>,  
Шаваева Ф.В.<sup>1</sup>, Молов А.А.<sup>1</sup>, Тхабисимова И.К.<sup>1</sup>, Кипкеева Т.Б.<sup>1</sup>,  
Шокуева А.Г.<sup>1</sup>, Ашагре С.М.<sup>1</sup>, Лигидова Д.Р.<sup>1</sup>, Куготов А.М.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», г. Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Резюме.** В последние годы доказана роль вялотекущего неспецифического воспаления в патогенезе гипертонической болезни. Оксидативный стресс, развивающийся при гипертонической болезни, приводит к повреждению эндотелиального гликокаликса с нарушением барьерной и адаптерной функций эндотелия. Активация транскрипционного фактора NF-κB приводит к усилению синтеза свободных радикалов кислорода, молекул адгезии (VCAM-1, ICAM-1, P-selectin, E-selectin) и провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-1, IL-6), запуская воспалительный процесс в эндотелии. Современные антигипертензивные препараты, влияя на различные патогенетические механизмы развития артериальной гипертензии, не в полной мере воздействуют на иммунный компонент артериальной гипертензии. Поэтому поиск различных методов, влияющих на иммунологическую реактивность больных гипертонической болезнью, остается актуальным в наше время.

Целью исследования стало выявление влияния интервальной гипокситерапии на состояние иммунологической реактивности больных гипертонической болезнью I стадии.

Было обследовано 170 пациентов мужского пола 30-45 лет (средний возраст 38,36±1,64 года) с гипертонической болезнью I стадии (n = 170), которая прошла комбинированное лечение, включающее медикаментозную терапию и нормобарическую интервальную гипокситерапию в режиме гипоксия-нормоксия (содержание кислорода в гипоксической газовой смеси составляло 20,9%). Изучены показатели редокс-статуса и иммунологической реактивности до и после интервальной гипокситерапии.

Обладая существенным антиоксидантным действием, интервальная гипокситерапия привела к стиханию оксидантного стресса, на что указывало повышение активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в эритроцитах крови и снижение содержания малонового диальдегида в крови в результате уменьшения генерации свободных радикалов кислорода и подавления процессов

### **Адрес для переписки:**

Борукаева Ирина Хасанбиевна  
ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный  
университет имени Х.М. Бербекова»  
360017, Россия, Кабардино-Балкарская Республика,  
г. Нальчик, ул. Шортанова, 3, кв. 100.  
Тел.: 8 (928) 717-84-85.  
E-mail: zalina.abazova@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Irina Kh. Borukaeva  
Kh. Berbekov Kabardino-Balkarian State University  
3 Shortanov St, Apt 100  
Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic  
360017 Russian Federation  
Phone: +7 (928) 717-84-85.  
E-mail: zalina.abazova@mail.ru

### **Образец цитирования:**

И.Х. Борукаева, З.Х. Абазова, А.Б. Иванов,  
К.Ю. Шхагумов, Ф.В. Шаваева, А.А. Молов,  
И.К. Тхабисимова, Т.Б. Кипкеева, А.Г. Шокуева,  
С.М. Ашагре, Д.Р. Лигидова, А.М. Куготов «Влияние  
интервальной гипокситерапии на иммунный статус  
больных гипертонической болезнью» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 273-280.  
doi: 10.46235/1028-7221-16833-EOI

© Борукаева И.Х. и соавт., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

I.Kh. Borukaeva, Z.Kh. Abazova, A.B. Ivanov,  
K.Yu. Shkhagumov, F.V. Shavaeva, A.A. Molov,  
I.K. Tkhabisimova, T.B. Kipkeeva, A.G. Shokueva,  
S.M. Ashagre, D.R. Ligidova, A.M. Kugotov "Effect of interval  
hypoxitherapy on the immune status of hypertensive patients",  
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 273-280.  
doi: 10.46235/1028-7221-16833-EOI

© Borukaeva I.Kh. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16833-EOI

перекисного окисления липидов. Интервальная гипокситерапия привела к статистически значимому увеличению изначально сниженного содержания Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup> (p < 0,05), Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (p < 0,02), Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (p < 0,02). Изначально повышенное количество В-лимфоцитов CD19<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> лимфоцитов, CD95<sup>+</sup> лимфоцитов достоверно снизилось. Важным результатом интервальной гипокситерапии стало выраженное противовоспалительное действие: статистически значимое снижение содержания провоспалительных интерлейкинов IL-1β (p < 0,02), IL-6 (p < 0,01) и повышение содержания противовоспалительных цитокинов IL-4 (p < 0,005) и IL-10 (p < 0,005), что привело к стиханию вялотекущего неспецифического воспаления.

Подавление оксидантного стресса и нормализация иммунологической реактивности больных гипертонической болезнью после интервальной гипокситерапии привела к стиханию вялотекущего неспецифического воспаления, уменьшению эндотелиальной дисфункции и восстановлению структуры и тонуса сосудистой стенки со снижением артериального давления и улучшением клинического течения гипертонической болезни.

*Ключевые слова:* гипертоническая болезнь, интервальная гипокситерапия, иммунный статус, эндотелиальная дисфункция, иммунопатологическое неспецифическое воспаление, медиаторы воспаления

## EFFECT OF INTERVAL HYPOXYTHERAPY ON THE IMMUNE STATUS OF HYPERTENSIVE PATIENTS

Borukaeva I.Kh.<sup>a</sup>, Abazova Z.Kh.<sup>a</sup>, Ivanov A.B.<sup>a</sup>, Shkhagumov K.Yu.<sup>a</sup>, Shavaeva F.V.<sup>a</sup>, Molov A.A.<sup>a</sup>, Tkhabisimova I.K.<sup>a</sup>, Kipkeeva T.B.<sup>a</sup>, Shokueva A.G.<sup>a</sup>, Ashagre S.M.<sup>a</sup>, Ligidova D.R.<sup>a</sup>, Kugotov A.M.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Kh. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, Russian Federation

<sup>b</sup> I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

**Abstract.** In recent years, the role of sluggish nonspecific inflammation in the pathogenesis of hypertension has been proven. Oxidative stress that develops in hypertension leads to damage of endothelial glycocalyx with impaired barrier and adaptive functions of endothelium. Activation of transcription factor NF-κB leads to increased synthesis of free oxygen radicals, adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1, P-selectin, E-selectin) and proinflammatory cytokines (TNFα, IL-1, IL-6), triggering the inflammatory process in the endothelium. Modern antihypertensive drugs, affecting various pathogenetic mechanisms of arterial hypertension development, do not fully affect the immune component of arterial hypertension. Therefore, the search for various methods affecting the immunologic reactivity of hypertensive patients remains relevant in our time.

The aim of the study was to reveal the effect of interval hypoxotherapy on the state of immunologic reactivity of patients with hypertension stage I.

One hundred seventy male patients of 30-45 years old (mean age 38.36±1.64 years) with hypertension stage I (n = 170) who underwent combined treatment including drug therapy and normobaric interval hypoxic therapy in hypoxia-normoxia mode (oxygen content in hypoxic gas mixture was 20.9%) were examined. Indices of redox status and immunologic reactivity before and after interval hypoxotherapy were studied.

Having a significant antioxidant effect, interval hypoxotherapy led to the subsidence of oxidative stress, which was indicated by an increase in the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in blood erythrocytes and a decrease in the content of malonic dialdehyde in blood as a result of a decrease in the generation of free oxygen radicals and suppression of lipid peroxidation processes. Interval hypoxotherapy resulted in a statistically significant increase in the initially decreased content of CD3<sup>+</sup>T lymphocytes (p < 0.05), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T lymphocytes (p < 0.02), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T lymphocytes (p < 0.02). Initially increased number of B-lymphocytes CD19<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> lymphocytes, CD95<sup>+</sup> lymphocytes significantly decreased. An important result of interval hypoxotherapy was a pronounced anti-inflammatory effect: statistically significant decrease in the content of pro-inflammatory interleukins IL-1β (p < 0.02), IL-6 (p < 0.01) and increase in the content of anti-inflammatory cytokines IL-4 (p < 0.005) and IL-10 (p < 0.005), which led to the subsidence of sluggish nonspecific inflammation.

Suppression of oxidative stress and normalization of immunological reactivity of hypertensive patients after interval hypoxotherapy led to the subsidence of sluggish nonspecific inflammation, reduction of endothelial dysfunction and restoration of the structure and tone of the vascular wall with a decrease in blood pressure and improvement of the clinical course of hypertension.

*Keywords:* hypertension, interval hypoxic therapy, immune status, endothelial dysfunction, immunopathologic nonspecific inflammation, inflammatory



## Введение

Гипертоническая болезнь (ГБ) является наиболее частой причиной возникновения артериальной гипертонии с развитием сердечно-сосудистых, церебральных и почечных осложнений. Основные патогенетические механизмы развития артериальной гипертензии уже известны и не вызывают сомнения. О роли иммунопатологического процесса в патогенезе гипертонической болезни многие годы велись дискуссии, однако в настоящее время роль вялотекущего неспецифического воспаления считается доказанной [3, 8, 15]. В основе развития эндотелиальной дисфункции при гипертонической болезни лежит неспецифическое воспаление эндотелия, приводящее к развитию и прогрессированию артериальной гипертензии. В последние годы в литературе появляется все больше данных о взаимосвязи выявляемых в крови маркеров воспаления и рядом сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе гипертонической болезни [6]. Например, повышенный уровень С-реактивного белка определяется у больных с острой коронарной недостаточностью, острым нарушением мозгового кровообращения, в связи с чем С-реактивный белок стал одним из маркеров риска развития сердечно-сосудистых осложнений при гипертонической болезни. Повышенный уровень С-реактивного белка подавляет продукцию NO эндотелиоцитами, усиливает продукцию эндотелина-1, в результате чего отмечается вазоконстрикция и развитие артериальной гипертензии [2, 12].

Одним из факторов, способствующих развитию артериальной гипертензии, является оксидативный стресс, вызванный дисбалансом редокс-системы, приводящий к повышению содержания в крови свободных радикалов кислорода и снижению активности антиоксидантной системы. Это приводит к перекисному окислению липидов и повреждению белковых структур эндотелиоцитов с нарушением целостности эндотелиального гликокаликса. Установлено, что неспецифическое вялотекущее воспаление эндотелия является одним из ранних патогенетических механизмов повреждения сосудистой стенки [13].

Уменьшение толщины эндотелиального гликокаликса нарушает его адаптерную функцию и блокирует выделение NO эндотелиоцитами, тем самым способствуя повышению АД. Также повреждение эндотелиального гликокаликса приводит к нарушению его барьерной функции, снижению отрицательного заряда, в результате чего увеличивается сосудистая проницаемость для белков, ЛПНП, что способствует развитию атеросклероза, как одного из факторов возникновения и прогрессирования АГ. Механорецеп-

торы эндотелиального гликокаликса, воспринимающий пульсирующий артериальный ток крови при гипертонической болезни, запускают ряд биохимических реакций, приводящих к активации транскрипционного фактора NF-κB, усилению синтеза свободных радикалов кислорода и провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-1, IL-6), которые запускают воспалительный процесс в эндотелии [8, 9].

TNFα, IL-1 и IL-6 вызывают экспрессию молекул адгезии (VCAM-1, ICAM-1, P-selectin, E-selectin) на поверхности эндотелиоцитов, в результате чего начинается адгезия нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов, усиливается их эмиграция в эндотелиоциты с развитием воспалительной инфильтрации сосудистой стенки. Одним из механизмов, повышающих тромбогенную и вазоконстрикторную активность эндотелия, является снижение синтеза оксида азота (NO) под действием TNFα. IL-1 стимулирует выделение трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF-β1) и активирует протеинкиназу C, под действием которых усиливается пролиферация гладкомышечных клеток сосудов, приводя к ремоделированию сосудистой стенки, в результате чего повышается чувствительность сосудов к вазоконстрикторам с развитием стойкой гипертензии [10].

Уменьшение эластичности аорты и крупных артерий при длительной эндотелиальной дисфункции способствует развитию и прогрессированию гипертонической болезни [11]. Между уровнем АД и воспалительным процессом существует тесная взаимосвязь: повышение АД стимулирует воспалительную реакцию, а эндотелиальное неспецифическое воспаление запускает изменения в сосудистой стенке, приводящие к развитию АГ [7].

Современные антигипертензивные препараты, воздействуя на различные патогенетические механизмы развития гипертонической болезни, не в полной мере влияют на иммунный компонент артериальной гипертонии. Поэтому поиск различных методов, влияющих на иммунологическую реактивность больных гипертонической болезнью, остается актуальным в наше время.

Нормобарическая интервальная гипокситерапия многие годы применяется в лечении и реабилитации хронических заболеваний. Возникающие при адаптации к гипоксии компенсаторные реакции, развивающиеся при интервальной гипокситерапии, оказывают положительное влияние на дыхательную, сердечно-сосудистую, кровяную, эндокринную, иммунную системы, приводя к повышению эффективности их функционирования. Преимуществами интервальной гипокситерапии является отсутствие побочных эффектов и системное воздействие на организм

в результате активации резервных возможностей организма. Выраженное иммуномодулирующее действие интервальной гипокситерапии при аутоиммунном гипотиреозе, бронхиальной астме, хронической обструктивной болезни легких, постковидной реабилитации [1, 4, 5] послужило основанием для использования данного метода в комплексном лечении гипертонической болезни I стадии.

**Цель исследования** – выявить влияние интервальной гипокситерапии на состояние иммунного статуса больных гипертонической болезнью I стадии.

## Материалы и методы

Обследование проводилось на базе Университетской клиники Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х.М. Бербекова. Критериями включения в исследование было наличие диагностированной гипертонической болезни I стадии у лиц мужского пола в возрастной группе 30–45 лет. При наличии острых соматических и инфекционных, хронических заболеваний в стадии декомпенсации, врожденных аномалий сердца и крупных сосудов, нарушений ритма сердца, требующих приема антиаритмических препаратов, перенесенного менее чем за 1 год до обследования инфаркт миокарда.

Исследуемая группа была разделена следующим образом: основная группа – пациенты мужского пола 30–45 лет (средний возраст  $38,36 \pm 1,64$  года) с гипертонической болезнью I стадии ( $n = 170$ ), прошла комбинированное лечение, включающее медикаментозную терапию и нормобарическую интервальную гипокситерапию в режиме гипоксия-нормоксия (т. е. 5 минутные интервалы гипоксии сменялись 5-минутными интервалами нормоксии с  $20,9\% O_2$ ). Контрольная группа была представлена сопоставимыми по возрасту и полу 40 практически здоровыми лицами 30–45 лет (средний возраст  $37,63 \pm 1,48$  года). Группа сравнения состояла из 55 больных 30–45 лет (средний возраст  $39,36 \pm 1,55$  года) с гипертонической болезнью I стадии, которая принимала только гипотензивную терапию без гипокситерапии. Больные получали постоянную гипотензивную терапию с применением антагонистов кальция, ингибиторов АПФ и блокаторов рецепторов к ангиотензину II, диуретиков, центральных адреноблокаторов.

Определение уровня малонового диальдегида в сыворотке крови, активности глутатионпероксидазы (ГП) и супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах крови осуществлялось спектрофотометрическим методом на спектрофотометре UNICO 2802S (United Products & Instruments,

Inc., США). Анализу подвергались эритроциты образца венозной крови.

Для определения антиоксидантной активности крови использовался набор реагентов «Общий антиоксидантный статус» АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия); для определения малонового диальдегида в крови набор реагентов SPA597Ge21 фирмы Cloud-Clone (Китай). Определение уровня малонового диальдегида в сыворотке крови, активности глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы в эритроцитах крови осуществлялось спектрофотометрическим методом на спектрофотометре UNICO 2802S (United Products & Instruments, Inc., США). Для выявления количества лимфоцитов применялся метод проточной цитофлуориметрии на аппарате XN-9000 фирмы Sysmex (Япония). Интервальная гипокситерапия проводилась на установке для гипокситерапии «Гипо-Окси» фирмы Oxyterra (Россия) (сертификат соответствия № ESTD1. B013.K01059 № 0002865), которая подавала гипоксическую смесь с нужным содержанием кислорода.

Всем больным для определения индивидуальной чувствительности к гипоксии и переносимости гипоксических смесей проводился гипоксический тест, по результатам которого подбирались оптимальное содержание кислорода в гипоксической смеси. По результатам гипоксического теста интервальная гипокситерапия состояла из 15 гипоксических сеансов, в которых в первые 5 сеансов больные получали 14% кислорода, вторые 5 сеансов – 13%, в последние 5 сеансов – 12%. Таким образом, происходила ступенчатая адаптация к гипоксии.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программ Microsoft Office Excel и STATISTICA BASE 20 для Windows. Анализ распределения значений основной, контрольной группы и группы сравнения показал, что анализируемые выборки происходили из генеральных совокупностей, имеющих нормальное распределение. При сравнении связанных выборок (до и после лечения) использовался парный *t*-критерий Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

У больных гипертонической болезнью I стадии были выявлены изменения, свидетельствующие о развитии оксидантного стресса: повышение содержания малонового диальдегида на фоне снижения активности антиоксидантной системы (глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы эритроцитов крови). Интервальная гипокситерапия оказала выраженное антиокси-

**ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ РЕДОКС-СТАТУСА ОСНОВНОЙ ГРУППЫ ДО И ПОСЛЕ ИНТЕРВАЛЬНОЙ ГИПОКСИТЕРАПИИ, ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ**

TABLE 1. INDICES OF REDOX STATUS OF THE MAIN GROUP BEFORE AND AFTER INTERVAL HYPOXIC THERAPY, COMPARISON GROUP AND CONTROL GROUP

Показатели Indicators	Основная группа Main group (n = 170)		Группа сравнения Comparison group (n = 55)	Контрольная группа Control group (n = 40)
	До ИГТ Before IGT	После ИГТ After IGT		
Малоновый диальдегид, нмоль/мл Malonic dialdehyde, nmol/mL	2,73±0,53	1,32±0,27* #	2,66±0,46	0,51±0,42
Глутатионпероксидаза, Ед/л Glutathione peroxidase, U/L	3941,17±217,31	4712,43±314,77* #	3883,43±273,33	5732,56±352,42
Супероксид дисмутаза, Ед/ мл Superoxide dismutase, U/mL	126,28±7,36	151,36±10,02* #	121,31±6,09	186,43±16,32

Примечание. \*  $p < 0,05$  – достоверность различий между показателями основной группы до и после гипокситерапии; #  $p < 0,05$  – достоверность различий между показателями основной группы после гипокситерапии и группы сравнения

Note. \*  $p < 0.05$ , reliability of differences between the indices of the main group before and after hypoxotherapy; #  $p < 0.05$ , reliability of differences between the indices of the main group after hypoxotherapy and the comparison group.

дантное действие и привела к стиханию оксидантного стресса, на что указывало повышение активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в эритроцитах крови и снижение содержания малонового диальдегида в крови в результате уменьшения генерации свободных радикалов кислорода и подавления процессов перекисного окисления липидов (табл. 1).

Антиоксидантный эффект интервальной гипокситерапии можно объяснить подавлением экспрессии гена НАДФ-оксидазы на цитоплазматических мембранах фагоцитов, вызванного уменьшением содержания провоспалительных IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ . Также активация транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B при адаптации к гипоксии в курсе интервальной гипокситерапии, привела к повышению синтеза антиоксидантных ферментов и стиханию оксидантного стресса [14].

У больных гипертензивной болезнью I стадии выявлялось нарушение иммунологической реактивности, проявившееся снижением общего количества Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>, Т-хелперов CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и повышением CD16<sup>+</sup>NK-клеток, CD19<sup>+</sup>В-лимфоцитов, CD95<sup>+</sup> клеток-индукторов апоптоза. При исследовании концентрации в сыворотке крови цитокинов выявлено, что при гипертензивной болезни наблюдалось повышение концентрации провоспалительных цитокинов: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ . При этом содержание противовоспалительных IL-4 и IL-10 было также повышено, что, по-видимому, было связано с ак-

тивацией саногенетических механизмов, направленных на подавление хронического воспаления.

Интервальная гипокситерапия, обладая выраженным иммуномодулирующим эффектом, привела к статистически значимому увеличению изначально сниженного содержания Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup> до 68,53±3,42% ( $p < 0,05$ ), Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> до 39,73±2,06% ( $p < 0,05$ ), Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> до 20,53±1,25% ( $p < 0,05$ ), CD16<sup>+</sup> лимфоцитов до 17,73±1,65% ( $p < 0,05$ ), CD95<sup>+</sup> до 13,33±1,46%. Количество В-лимфоцитов CD19<sup>+</sup> повысилось до 10,67±1,02% ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Важным результатом интервальной гипокситерапии стало выраженное противовоспалительное действие: статистически значимое снижение содержания провоспалительных интерлейкинов: IL-1 $\beta$  от 7,32±0,19 до 6,57±0,26 пг/мл ( $p < 0,05$ ), IL-6 от 9,35±0,56 до 7,77±0,41 пг/мл ( $p < 0,05$ ), TNF $\alpha$  от 6,35±0,31 до 5,23±0,24 пг/мл ( $p < 0,05$ ). Содержание противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 сохранялось на повышенном уровне, что на фоне уменьшения содержания провоспалительных интерлейкинов привело к стиханию вялотекущего неспецифического воспаления. В группе сравнения статистически значимых изменений показателей иммунологической реактивности выявлено не было.

Транскрипционный фактор HIF-1 $\alpha$ , воздействуя на экспрессию генов иммунных клеток, обеспечивает иммуномодулирующее действие

**ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ ДО И ПОСЛЕ ИНТЕРВАЛЬНОЙ ГИПОКСИТЕРАПИИ, ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ**

TABLE 2. IMMUNOLOGIC REACTIVITY INDICES OF THE MAIN GROUP BEFORE AND AFTER INTERVAL HYPOXIC THERAPY, COMPARISON GROUP AND CONTROL GROUP

Показатели Indicators	Основная группа Main group (n = 170)		Группа сравнения Comparison group (n = 55)	Контрольная группа Control group (n = 40)
	До ИГТ Before IGT	После ИГТ After IGT		
<b>Т-лимфоциты CD3<sup>+</sup>, %</b> T lymphocytes CD3 <sup>+</sup> , %	58,37±2,63	68,53±3,42* #	60,61±2,36	69,21±2,37
<b>Т-лимфоциты CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, %</b> T lymphocytes CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %	31,63±2,48	39,73±2,06* #	30,24±2,16	40,33±2,16
<b>Т-лимфоциты CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, %</b> T lymphocytes CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	12,73±1,24	20,53±1,26* #	13,36±1,12	21,73±1,97
<b>Т-лимфоциты CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, %</b> T lymphocytes CD3 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> , %	19,63±2,53	13,33±1,46* #	18,73±1,25	10,72±0,56
<b>Т-лимфоциты CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, %</b> T lymphocytes CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> , %	23,55±1,66	17,73±1,65* #	23,32±1,18	15,64±1,17
<b>В-лимфоциты CD19<sup>+</sup>, %</b> B lymphocytes CD19 <sup>+</sup> , %	7,95±0,54	10,67±1,02* #	8,52±0,34	11,43±1,06

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

интервальной гипокситерапии. HIF-1 $\alpha$  приводит к увеличению продолжительности жизни нейтрофилов, усилению механизмов фагоцитоза, ускорению эмиграция лейкоцитов и активации апоптоза в инфицированных клетках. При гипоксическом воздействии HIF-1 $\alpha$  усиливает пролиферацию В-лимфоцитов и повышает синтез высокоаффинных антител [14]. Интервальная гипокситерапия уменьшает поражение сосудистой стенки за счет подавления оксидантного стресса, синтеза провоспалительных интерлейкинов и молекул адгезии, которые запускают механизмы эмиграции лейкоцитов и избыточную активность металлопротеиназ макрофагов.

## Выводы

Таким образом, нормобарическая интервальная гипокситерапия, обладая выраженным иммуномодулирующим и антиоксидантным действием, привела к подавлению оксидантного стресса и нормализации иммунологической реактивности больных гипертонической болезнью, что позволяет рекомендовать применение данного метода в комплексном лечении гипертонической болезни. Уменьшение эндотелиальной дисфункции и восстановление сосудистой стенки приводит к снижению артериального давления и улучшению клинического течения артериальной гипертонии.

## Список литературы / References

1. Абазова З.Х., Шибзухова Л.А., Борукаева И.Х., Шибзухов Т.А., Борукаева Л.А. Гипокситерапия в коррекции неврологических нарушений у детей и подростков с аутоиммунным тиреоидитом // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2020. Т. 65, № 4. С. 321. [Abazova Z.Kh., Shibzukhova L.A., Borukaeva I.Kh., Shibzukhov T.A., Borukaeva L.A. Hypoxytherapy in correction of neurological disorders in children and adolescents with autoimmune thyroiditis. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2020, Vol. 65, no. 4, p. 321. (In Russ.)]
2. Амирова А.Р., Искандарова Л.Р., Мингазетдинова Л.Н. Иммунная система как предиктор эндотелиальной дисфункции при артериальной гипертонии с метаболическими нарушениями // Фундаментальные исследования, 2006. № 5. С. 92-93. [Amirova A.R., Iskandarova L.R., Mingazetdinova L.N. Immune system as a predictor of endothelial dysfunction in arterial hypertension with metabolic disorders. *Fundamentalnyye issledovaniya = Fundamental Research*, 2006, no. 5, pp. 92-93. (In Russ.)]
3. Барсуков А.В., Сеидова А.Ю., Гордиенко А.В., Сергеев А.И., Лейчинский С.В. Гипертоническая болезнь и хроническая сердечная недостаточность с сохраненной сократительной способностью левого же-

лудочка: фокус на гендер-специфические особенности провоспалительного статуса // Артериальная гипертония, 2017. Т. 23, № 5. С. 457-467. [Barsukov A.V., Seidova A.Yu., Gordienko A.V., Sergeev A.I., Leychinsky S.V. Hypertension and chronic heart failure with preserved left ventricular ejection fraction: focus on gender-specific features of the proinflammatory status. *Arterialnaya gipertenziya = Arterial Hypertension*, 2017, Vol. 23, no. 5, pp. 457-467. (In Russ.)]

4. Борукаева И.Х., Абазова З.Х., Иванов А.Б., Мисирова И.А., Шхагумов К.Ю., Шаваева Ф.В., Молов А.А., Кипкеева Т.Б., Шокуева А.Г. Сохранение иммуномодулирующего действия интервальной гипокситерапии после коронавирусной инфекции в отдаленном периоде // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 4. С. 809-814. [Borukaeva I.Kh., Abazova Z.Kh., Ivanov A.B., Misirova I.A., Shkhagumov K.Yu., Shavaeva F.V., Molov A.A., Kipkeeva T.B., Shokueva A.G. Preservation of the immunomodulatory effect of interval hypoxotherapy after coronavirus infection in the long-term period. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 809-814. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-POT-2767.

5. Борукаева И.Х., Абазова З.Х., Иванов А.Б., Шхагумов К.Ю. Интервальная гипокситерапия и энтеральная оксигенотерапия в реабилитации пациентов с хронической обструктивной болезнью легких // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры, 2019. Т. 96, № 2. С. 27-32. [Borukaeva I.Kh., Abazova Z.Kh., Ivanov A.B., Shkhagumov K.Yu. The role of interval hypoxotherapy and enteral oxygen therapy in the rehabilitation of the patients presenting with chronic obstructive pulmonary disease. *Voprosy kurortologii, fizioterapii, i lechebnoi fizicheskoi kultury = Issues of Balneology, Physiotherapy and Therapeutic Physical Culture*, 2019, Vol. 96, no. 2, pp. 27-32. (In Russ.)]

6. Василец Л.М., Григориади Н.Е., Гордийчук Р.Н., Карпунина Н. С., Кривая А.А., Щербенев В.М. Особенности показателей системного воспаления у пациентов с артериальной гипертонией // Современные проблемы науки и образования, 2012. № 6. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=7539> (дата обращения: 15.03.2024). [Vasilets L.M., Grigoriadi N.E., Gordiychuk R.N., Karpunina N.S., Krivaya A.A., Scherbenev V.M. Features of systemic inflammation indicators in patients with arterial hypertension. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2012, no. 6. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=7539> (accessed on 15.03.2024). (In Russ.)]

7. Ваулин Н.А. Дисфункция эндотелия при артериальной гипертонии: фокус на небиволол // Системные гипертонии, 2009. № 1. С. 11-14. [Vaulin N.A. Endothelial dysfunction in arterial hypertension: focus on nebivolol. *Sistemnyye gipertenzii = Systemic Hypertension*, 2009, no. 1, pp. 11-14. (In Russ.)]

8. Гаврилюк Е.В., Конопля А.И., Караулов А.В. Роль иммунных нарушений в патогенезе артериальной гипертонии // Иммунология, 2016. Т. 37, № 1. С. 29-36. [Gavrilyuk E.V., Konoplya A.I., Karaulov A.V. Role of immune disturbances in the pathogenesis of the arterial hypertonia. *Obzor. Immunologiya = Immunologiya*, 2016, Vol. 37, no. 1, pp. 29-36. (In Russ.)]

9. Зиганшина М.М., Зиганшин А.Р., Халтурина Е.О., Баранов И.И. Артериальная гипертония как следствие дисфункции эндотелиального гликокаликса: современный взгляд на проблему сердечно-сосудистых заболеваний // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2022. Т. 21, № 9. 3316. [Ziganshina M.M., Ziganshin A.R., Khalturina E.O., Baranov I.I. Arterial hypertension as a consequence of endothelial glycocalyx dysfunction: a modern view of the problem of cardiovascular diseases. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2022, Vol. 21, no. 9, 3316. (In Russ.)] doi: 10.15829/1728-8800-2022-3316.

10. Пехова К.А., Михин В.П., Гаврилюк Е.В., Конопля А.И. Иммунометаболические нарушения при гипертонической болезни различной степени тяжести // Вестник новых медицинских технологий, 2012. Т.19, № 1. С. 172-173. [Pekhova K.A., Mikhin V.P., Gavrilyuk E.V., Konoplya A.I. Immune and metabolic disturbances at the idiopathic hypertension of various severity level. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*, 2012, Vol. 19, no. 1, pp. 172-173. (In Russ.)]

11. Свидовская С.В., Михалевская Н.А., Галченкова О.С., Князева Л.А. Провоспалительная цитокинемия и жесткость артериального русла при нефрогенной гипертонии // Вестник новых медицинских технологий, 2012. Т. 19, № 4. С. 126-127. [Svidovskaya S.V., Mikhalevskaya N.A., Galchenkova O.S., Knyazeva L.A. Proinflammatory cytokinemia and stiffness of the arterial channel in nephrogenic hypertension. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*, 2012, Vol. 19, no. 4, pp. 126-127. (In Russ.)]

12. Хусаинова Л.Н., Исламгалева З.М., Беляева И.Г., Мингазетдинова Л.Н., Муталова Э.Г. Экспрессия цитокиновой сети у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями // Успехи современного естествознания, 2013. № 3. С. 2-30. [Khusainova L.N., Islamgaleeva Z.M., Belyaeva I.G., Mingazetdinova L.N., Mutalova E.G. Expression of cytokine network in patients with cardiovascular diseases. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya = Advances of Modern Natural Science*, 2013, no. 3, pp. 2-30. (In Russ.)]

13. Bernardo R.I., Hector P., Jonson R.J. Role of the immune system in hypertension. *Physiol. Rev.*, 2017, no. 97, pp. 1127-1164.

14. Jaquet V., Leidal K., Perozzo R., Plastre O., Fioraso-Cartier L., Diebold B., Scapozza L., Nauseef W.M., Krause K.H., Bedard K. NADPH oxidase (NOX) isoforms are inhibited by celastrol with a dual mode of action. *Br. J. Pharmacol.*, 2011, no. 164, pp. 507-520.

15. Norlander A.E., Madhur M.S., Harrison D.G. The immunology of hypertension. *J. Exp. Med.*, 2018, Vol. 215, no. 1, pp. 21-33.

**Авторы:**

**Борукаева И.Х.** — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии человека медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», г. Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, Россия

**Абазова З.Х.** — к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии человека медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», г. Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, Россия

**Иванов А.Б.** — д.б.н., профессор кафедры нормальной и патологической физиологии человека медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», г. Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, Россия

**Шхагумов К.Ю.** — к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии человека медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», г. Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, Россия

**Шаваева Ф.В.** — к.б.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии человека медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», г. Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, Россия

**Молов А.А.** — к.б.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии человека медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», г. Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, Россия

**Тхабисимова И.К.** — к.м.н., доцент, заведующая кафедрой общей врачебной подготовки и медицинской реабилитации медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», г. Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, Россия

**Кипкеева Т.Б.** — старший преподаватель кафедры нормальной и патологической физиологии человека медицинского факультета ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», г. Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, Россия

**Шокуева А.Г.** — старший преподаватель кафедры нормальной и патологической физиологии человека медицинского факультета ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», г. Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, Россия

**Ашагре С.М.** — ассистент кафедры нормальной и патологической физиологии человека медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», г. Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, Россия

**Лигидова Д.Р.** — студентка 4-го курса Института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», г. Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, Россия

**Куготов А.М.** — студент 6-го курса ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Authors:**

**Borukaeva I.Kh.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Normal and Pathological Human Physiology of the Medical Academy, Kh. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, Russian Federation

**Abazova Z.Kh.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Normal and Pathological Human Physiology of the Medical Academy, Kh. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, Russian Federation

**Ivanov A.B.**, PhD, MD (Biology), Professor, Department of Normal and Pathological Human Physiology of the Medical Academy, Kh. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, Russian Federation

**Shkhagumov K.Yu.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Normal and Pathological Human Physiology of the Medical Academy, Kh. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, Russian Federation

**Shavaeva F.V.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Normal and Pathological Human Physiology of the Medical Academy, Kh. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, Russian Federation

**Molov A.A.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Normal and Pathological Human Physiology of the Medical Academy, Kh. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, Russian Federation

**Tkhabisimova I.K.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of General Medical Training and Medical Rehabilitation of the Medical Academy, Kh. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, Russian Federation

**Kipkeeva T.B.**, Senior Lecturer, Department of Normal and Pathological Human Physiology of the Medical Academy, Kh. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, Russian Federation

**Shokueva A.G.**, Senior Lecture, Department of Normal and Pathological Human Physiology of the Medical Academy, Kh. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, Russian Federation

**Ashagre S.M.**, Assistant Professor, Department of Normal and Pathological Human Physiology of the Medical Academy, Kh. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, Russian Federation

**Ligidova D.R.**, 4<sup>th</sup> year Student, Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Kh. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, Russian Federation

**Kugotov A.M.**, 6<sup>th</sup> year Student, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

## **ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ ЖЕЛЕЗА И ИММУННЫМИ ДИСФУНКЦИЯМИ У ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ РЕГИОНА ПРИАРАЛЬЯ**

**Жиемуратова Г.К.<sup>1</sup>, Арипова Т.У.<sup>2</sup>, Камалов З.С.<sup>2</sup>,  
Мамбеткаримов Г.А.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Нукусский филиал Института иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан,  
г. Нукус, Республика Узбекистан

<sup>2</sup> Институт иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент,  
Республика Узбекистан

<sup>3</sup> Каракалтакский филиал Республиканского научного центра экстренной медицинской помощи, г. Нукус,  
Республика Узбекистан

**Резюме.** Широкое распространение иммунозависимых заболеваний и нарушения метаболизма железа, а также их совместные случаи и влияние дефицита железа на иммунную систему подчеркивают актуальность данного исследования. Современные данные также указывают на участие железа в регуляции цитокиновой продукции и синтезе белка лимфоцитами. Помимо возрастных особенностей иммунной системы ребенка, существенное значение в развитии неадекватного течения инфекционного процесса имеет срыв адаптации иммунной системы, причинами которого могут быть как частые инфекции, так и другие соматические заболевания, такие как анемия, а также экологические факторы.

Целью настоящего исследования является оценка взаимосвязи между содержанием железа и иммунными дисфункциями при частых острых респираторных заболеваниях у детей, проживающих в Приаралье.

Всего было обследовано 127 детей, которые являются коренными жителями и проживают в эпицентре экологического кризиса. Возраст детей составил от 1 до 5 лет. Под наблюдением находились 105 часто болеющих детей (6 и более эпизодов ОРЗ в год) с железодефицитной анемией (ЖДА) и 22 здоровых детей такого же возраста. Был проведен клинический осмотр всех детей и общепринятые лабораторные анализы: общий анализ крови, относительное содержание и соотношение Т- и В-лимфоцитов, а также содержание про- и противовоспалительных цитокинов (IL-2 и 4) и ферритина в сыворотке крови.

### **Адрес для переписки:**

Жиемуратова Гулпаршын Кошкинбаевна  
Нукусский филиал Института иммунологии  
и геномики человека Академии наук  
Республики Узбекистан  
100060, Республика Узбекистан, г. Ташкент,  
ул. Я. Гулямова, 74.  
Тел.: +998 91 3017244.  
E-mail: gulparshin\_76@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Gulparshin K. Jiemuratova  
Nukus Branch of the Institute of Immunology and Human  
Genomics, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan  
74 Ya. Gulyamova St  
Tashkent  
100060 Republic of Uzbekistan  
Phone: +998 91 3017244.  
E-mail: gulparshin\_76@mail.ru

### **Образец цитирования:**

Г.К. Жиемуратова, Т.У. Арипова, З.С. Камалов,  
Г.А. Мамбеткаримов «Взаимосвязи между  
содержанием железа и иммунными дисфункциями  
у часто болеющих детей региона Приаралья»  
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,  
№ 2. С. 281–286.  
doi: 10.46235/1028-7221-16661-IBI

© Жиемуратова Г.К. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

G.K. Jiemuratova, T.U. Aripova, Z.S. Kamalov,  
G.A. Mambetkarimov "Interrelations between iron content  
and immune dysfunctions in frequently ill children of the Aral  
Sea Region", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 281–286.  
doi: 10.46235/1028-7221-16661-IBI

© Jiemuratova G.K. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16661-IBI

По результатам проведенных исследований выявлено, что у часто болеющих детей с железодефицитной анемией (ЖДА) отмечается умеренная положительная корреляция между относительным количеством Т-лимфоцитов и уровнем гемоглобина ( $r = +0,62$ ), а также сильная положительная корреляция с уровнем сывороточного железа ( $r = +0,78$ ). Это указывает на значительное влияние дефицита железа на уровень клеточного иммунитета. Клинические данные также свидетельствуют о более высоком риске развития инфекций дыхательных путей у детей с ЖДА по сравнению с контрольной группой. Ферритин, гемоглобин, лимфоциты, и цитокины являются при ЖДА позитивными регуляторами гемопоэза и в условиях восполнения дефицита железа приводят к компенсации анемии.

*Ключевые слова: железодефицитная анемия, часто болеющие дети, острые респираторные заболевания, содержание железа, иммунные показатели*

## INTERRELATIONS BETWEEN IRON CONTENT AND IMMUNE DYSFUNCTIONS IN FREQUENTLY ILL CHILDREN OF THE ARAL SEA REGION

Jiemuratova G.K.<sup>a</sup>, Aripova T.U.<sup>b</sup>, Kamalov Z.S.<sup>b</sup>,  
Mambetkarimov G.A.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Nukus Branch of the Institute of Immunology and Human Genomics, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Nukus, Republic of Uzbekistan

<sup>b</sup> Institute of Human Immunology and Genomics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan

<sup>c</sup> Karakalpak Branch of the Republican Scientific Center of Emergency Medical Care, Nukus, Republic of Uzbekistan

**Abstract.** The widespread occurrence of immune-dependent diseases and disturbances in iron metabolism, as well as their co-occurrence and the impact of iron deficiency on the immune system, underscore the relevance of this study. Modern data also indicate the involvement of iron in regulating cytokine production and protein synthesis by lymphocytes. In addition to the age-related characteristics of the child's immune system, a significant factor in the development of inadequate course of the infectious process is the disruption of immune system adaptation, which can be caused by frequent infections, other somatic diseases such as anemia, and environmental factors. The aim of this study is to assess the relationship between iron levels and immune dysfunction in children with frequent acute respiratory diseases living in the Aral Sea region. A total of 127 children, who are native residents living at the epicenter of the ecological crisis, were examined. The children's ages ranged from 1 to 5 years old. Among them, there were 105 frequently ill children (with 6 or more episodes of acute respiratory infections per year) with iron-deficiency anemia (IDA), and 22 healthy children of the same age. All children underwent clinical examination and standard laboratory tests, including complete blood count, relative content and ratio of T and B lymphocytes, as well as the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-2 and 4) and ferritin in the serum.

According to the results of the conducted research, it was found that among frequently ill children with iron-deficiency anemia (IDA), there is a moderate positive correlation between the relative quantity of T lymphocytes and the hemoglobin level ( $r = +0.62$ ), as well as a strong positive correlation with the serum iron level ( $r = +0.78$ ). This indicates a significant influence of iron deficiency on the level of cellular immunity. Clinical data also indicate a higher risk of respiratory infections development in children with IDA compared to the control group. Ferritin, hemoglobin, lymphocytes, and cytokines act as positive regulators of hematopoiesis in IDA conditions and contribute to the compensation of anemia during iron deficiency replenishment.

*Keywords: iron-deficiency anemia, frequently ill children, acute respiratory infections, iron content, immune parameters*



## Введение

Широкое распространение иммунозависимых заболеваний и нарушения метаболизма железа, а также их совместные случаи и влияние дефицита железа на иммунную систему подчеркивают актуальность данного исследования [2, 10].

Железо играет важную роль в нормальном функционировании иммунной системы, является ключевым компонентом ферментов, участвующих в процессе деления и роста иммунных клеток [8]. С этой точки зрения изучение негативного влияния дефицита железа на иммунную систему детей является также одной из актуальных проблем [3, 9]. У детей младшего возраста иммунофенотипы лейкоцитов и лимфоцитов в целом остаются стабильными. Однако происходят изменения в их чувствительности к цитокинам. В частности, усиливается активация функций Т-хелперов (CD4) в связи с созреванием рецепторов распознавания CD40L. Это позволяет Т-лимфоцитам вступать в прямой контакт с В-лимфоцитами и активировать их функции. Наблюдается увеличение пролиферации Т-хелперов Th2, что связано с возможным развитием аллергических реакций, особенно при воздействии респираторно-синцитиальной и аденовирусной инфекций [4, 7].

На последних месяцах первого года и на втором году жизни происходит переориентация иммунного ответа на инфекционные антигены: от Th2-ответа, характерного для новорожденных и детей первого полугодия, к Th1-ответу, присущему взрослым в инфекционных процессах. Эти особенности иммунной перестройки обуславливают повышенную чувствительность детского организма к возбудителям инфекций и менее дифференцированный иммунный ответ по сравнению со взрослыми [5]. Помимо уже обсуждавшихся возрастных особенностей иммунной системы ребенка, существенное значение в развитии неадекватного течения инфекционного процесса имеет срыв адаптации иммунной системы, причинами которого могут быть как частые инфекции, так и другие соматические заболевания, такие как анемия, а также экологические факторы, в частности — загрязнение окружающей среды [5, 10].

Ранее проведенные скрининговые исследования выявили различные уровни иммунодефицитных состояний у жителей Аральского региона, поэтому углубленное изучение иммунологической реактивности в процессе воздействия комплекса неблагоприятных факторов является важной задачей [1, 6].

**Цель исследования** — оценка взаимосвязи между содержанием железа и иммунными дисфункциями при частых острых респираторных

заболеваниях у детей, проживающих в Приарале.

## Материалы и методы

В исследование были включены данные детей (от 1 до 5 лет), проживающих в регионе Приарала. Всего было обследовано 127 детей, которые являются коренными жителями и проживают в эпицентре экологического кризиса. Дети были разделены на 2 группы. I основную группу составили часто болеющие дети. Под наблюдением находились 105 часто болеющих детей (6 и более эпизодов ОРЗ в год) с железодефицитной анемией (ЖДА). Возраст детей составил от 1 до 5 лет. Из этой группы у 62 детей была диагностирована легкая степень железодефицитной анемии, 32 детей имели среднюю степень ЖДА, а у 11 детей наблюдалась тяжелая степень ЖДА. Во вторую группу вошли 22 здоровых детей сопоставимых по возрасту и полу с детьми основной группы. Комплекс клинического обследования включал сбор жалоб, изучение анамнестических данных с помощью анализа медицинской документации («История развития ребенка» — форма № 112/у и анкетного метода, объективный осмотр ребенка.

Был проведен клинический осмотр всех детей и общепринятые лабораторные анализы. В качестве критериев анемии использовали референсные значения уровня гемоглобина для детей от 6 месяцев до 5 лет, предложенные экспертами Всемирной организации здравоохранения. Проводилось исследование субпопуляций лимфоцитов плазмы иммунофлюоресцентным методом. Для определения концентрации про- и противовоспалительных цитокинов (IL-2 и 4) и ферритина в сыворотке крови использовался «сэндвич» — вариант твердофазного иммуноферментного анализа (набор реагентов компании АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия).

Для определения статистической достоверности полученных результатов были использованы t-критерий Стьюдента и непараметрический критерий Манна–Уитни.

## Результаты и обсуждение

В рамках нашего исследования установлено значительное уменьшение общего относительно содержания (%) Т-лимфоцитов в группе часто болеющих детей с железодефицитной анемией (ЖДА) по сравнению с контрольной группой. Это свидетельствует о недостаточной эффективности защитных механизмов Т-клеток, ответственных за иммунологический контроль антигенного гомеостаза в организме. Из рисунка 1 видно, что уровни Т-лимфоцитов в группах с легкой, средней и тяжелой степенью ЖДА составили соответственно  $35,3 \pm 2,61\%$ ,  $31,4 \pm 3,27\%$  и  $29,2 \pm 2,16\%$ , в

то время как в контрольной группе они достигали  $42,6 \pm 4,52\%$ . Анализ статистической значимости различий между всеми группами детей с ЖДА и контрольной группой показал значимые отличия на уровне  $p < 0,05$ .

В ходе нашего исследования был проведен анализ величины коэффициента корреляции между относительным количеством Т-лимфоцитов и гематологическими параметрами крови, такими как уровень гемоглобина и сывороточный ферритин. В целом у часто болеющих детей с железодефицитной анемией отмечается умеренная положительная корреляция между относительным количеством Т-лимфоцитов и уровнем гемоглобина ( $r = +0,62$ ), а также сильная положительная корреляция с уровнем сывороточного железа ( $r = +0,78$ ).

В-лимфоциты представляют собой важный компонент гуморального иммунитета. Наблюдается увеличение процентного соотношения В-лимфоцитов у часто болеющих детей с легкой и средней степенью ЖДА –  $21,4 \pm 2,62\%$  и  $19,7 \pm 2,53\%$  соответственно, по сравнению с контрольной группой –  $18,5 \pm 3,17\%$ . Это увеличение рассматривается как компенсаторная реакция организма. В группе с тяжелой степенью ЖДА отмечается снижение относительного процентного содержания В-лимфоцитов до  $16,2 \pm 1,4\%$  по сравнению с контрольной группой. Статистически значимые различия с уровнем  $p < 0,05$  выяв-

лены между контрольной группой и группами часто болеющих детей с легкой и тяжелой степенью ЖДА. Клинические данные также свидетельствуют о более высоком риске развития инфекций дыхательных путей у детей с ЖДА по сравнению с контрольной группой.

Результаты могут быть оценены как нарушение иммунного баланса, связанного с дефицитом клеточного иммунитета у детей с ЖДА.

Обнаруженная высокая положительная корреляция между уровнем сывороточного ферритина и относительным количеством Т-лимфоцитов у часто болеющих детей с ЖДА ( $r = 0,68$ ) указывает на значительное влияние дефицита железа на уровень клеточного иммунитета.

Современные данные также указывают на участие железа в регуляции цитокиновой продукции и синтезе белка лимфоцитами.

Известно, что ферритин сыворотки увеличивается при инфекционных заболеваниях, так же как и острофазовый белок. В этой связи, оценивали в сыворотке крови концентрацию С-реактивного белка, когда его содержание в сыворотке крови было выше  $5 \text{ мг/л}$ , то показатели содержания ферритина не использовались для анализа статуса железа.

В связи с этим изучено содержание гемоглобина и сывороточного ферритина при острых респираторных заболеваниях и железодефицитной анемии. Нами было установлено, что наиболь-



Рисунок 1. Оценка субпопуляций лимфоцитов периферической крови детей в зависимости от степеней тяжести ЖДА

Figure 1. Assessment of peripheral blood lymphocyte subpopulations in children depending on the severity of iron-deficiency anemia (IDA)

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ФЕРРИТИНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПАТОЛОГИИ**

TABLE 1. FERRITIN CONTENT DEPENDING ON PATHOLOGY

Частые острые респираторные заболевания Frequent acute respiratory illnesses			Железодефицитная анемия (ЖДА) Iron-deficiency anemia (IDA)			p
Нб г/л Hb g/L	ферритин мкг/л Ferritin (µg/L)	СРБ CRP	Нб г/л Hb g/L	ферритин мкг/л Ferritin (µg/L)	СРБ CRP	
102*	71,3±30,2**	9 мг/л***	82*	4,77±0,84**	2 мг/л***	< 0,001

Примечание. Значения достоверны по отношению к данным группы с ЖДА, p < 0,001 (\* Нб г/л, \*\* ферритин, \*\*\* СРБ).

Note. The values are valid in relation to the data of the IDA group, p < 0.001 (\* Hb g/L, \*\* ferritin, \*\*\* CRP).

**ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ДЕТЕЙ (M±m)**

TABLE 2. LEVELS OF INTERLEUKINS IN EXAMINED CHILDREN (M±m)

Интерлейкины, пг/мл Interleukins, pg/mL	Основная группа Main group n = 37	Контрольная группа Control group n = 18	p
	M±m	M±m	
IL-2	4,07±0,23	0,10±0,04	< 0,001
IL-4	6,53±0,72	1,81±0,21	< 0,001

шее снижение сывороточного ферритина выявлено при ЖДА (табл. 1).

Корреляционный анализ показывает, что более высокому содержанию уровня ферритина соответствуют повышенные показатели IL-2 (r = 0,62; p < 0,001) и С-реактивного белка (СРБ).

Железодефицитная анемия характеризуется низким содержанием гемоглобина с гипохромной анемией в сочетании со снижением сывороточного ферритина и сопровождается активацией иммунной системы – увеличением уровня цитокинов IL-4 и IL-2, т. е. высокий уровень цитокинов у детей с анемией можно считать иммунологическим маркером недостаточности железа в организме. Ферритин, гемоглобин, цитокины IL-4 и IL-2 являются при ЖДА позитивными регуляторами гемопоэза и в условиях восполнения дефицита железа приводят к компенсации анемии (табл. 2).

Особое значение в развитие дефицита железа имеют многие патологические состояния. В условиях анемии хронического заболевания ферритин, гемоглобин, IL-4 и IL-2, а также С-реактивный белок (СРБ) выступают в качестве белков острой фазы воспаления. Они активно участвуют в блокировании поставки железа в эритроциты, что в конечном итоге приводит к компенсации основного заболевания и последующей коррекции анемии.

Полученные нами данные согласуются с результатами исследований различных авторов и подтверждают взаимосвязь между уровнем фер-

ритина, концентрацией провоспалительных цитокинов, и снижением уровня гемоглобина и эритроцитов что может привести к развитию анемии хронических заболеваний. Различные инфекционные заболевания, в основном хронические и рецидивирующие, могут ухудшать усвоение железа.

## Заключение

Таким образом, существует множество механизмов, посредством которых железо может влиять на иммунный ответ. Так, на фоне железодефицитной анемии у часто болеющих детей, находящихся в состоянии клинического благополучия и без признаков респираторных инфекций, были замечены изменения в межклеточном взаимодействии компонентов иммунной системы. Обнаружено повышение уровня интерлейкинов IL-2 и IL-4. Различные иммунопатологические состояния, в свою очередь, могут изменять метаболизм железа и способствовать развитию анемии.

Дальнейшие исследования будут направлены на определение оптимальных уровней железа в биологических жидкостях, которые поддерживают функциональную активность иммунной системы. Основной задачей иммунокоррекции у часто болеющих детей с различными хроническими соматическими заболеваниями является поддержание баланса Th1/Th2-клеток.

## Список литературы / References

1. Газалиева М.А., Ахметова Н.Ш., Жумабекова Б.К., Казимирова О.В., Абдикаликова Д.Р., Абдил А., Ташенов М. Состояние иммунологического здоровья населения экологически неблагополучных регионов Казахстана // Медицинские науки, 2016. № 5. С. 32-39. [Gazaliev M.A., Ahmetova N.Sh., Jumabekova B.K., Kazimirova O.V., Abdikalikova D.R., Abdil A., Tashenov M. Status of population health ecologically disadvantaged regions of Kazakhstan. *Meditsinskie nauki = Medical Sciences*, 2016, no. 5, pp. 32-39. (In Russ.)]
2. Зенина О.М., Кушнарева М.В., Кешишян Е.С. Фагоцитарная активность нейтрофилов крови у детей раннего возраста при проведении профилактики респираторной инфекции в закрытом коллективе // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2014. Т. 59, № 5. С. 56-57. [Zenina O.M., Kushnareva M.V., Keshishyan E. S. The phagocytic activity of blood neutrophils in children of early age for prevention of respiratory infection in the closed group. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2014, Vol. 59, no. 5, pp. 56-58. (In Russ.)]
3. Казюкова Т.В. Профилактика дефицита железа у детей раннего возраста // Педиатрия, 2011. Т. 90, № 4. С. 112-119. [Kazyukova T.V. Iron deficiency prophylaxis in young children. *Pediatriya = Pediatrics, Russia*, 2011, Vol. 90, no. 4, pp. 112-119. (In Russ.)]
4. Мазанкова Л.Н., Чеботарева Т.А., Майкова И.Д., Горбунов С.Г. Цитокиновый статус и эффективность цитокинотерапии ротавирусной инфекции у детей // Фарматека, 2015. № 4. С. 73-74. [Mazankova L.N., Chebotareva T.A., Maikova I.D., Gorbunov S.G. Cytokine status and efficiency of cytokine therapy of rotavirus infection in children. *Farmateka = Pharmateka*, 2015, no. 4, pp. 73-74. (In Russ.)]
- Тренева М.С., Мунблит Д.Б., Иванников Н.Ю., Пампура А.Н. Референтные значения (нормативы) уровней цитокинов молозива и грудного молока в женской популяции // Педиатрия, 2014. Т. 93, № 3. С. 41-45. [Treneva M.S., Munblit D.B., Ivannikov N.Y., Pampura A.N. The reference values of cytokine levels of colostrum and breast milk in the female population. *Pediatriya = Pediatrics, Russia*, 2014, Vol. 93, no. 3, pp. 41-45. (In Russ.)]
5. Хантурина Г.Р., Сейткасымова Г.Ж., Федорова И.А. Эколого-гигиеническая оценка окружающей среды территорий, прилегающих к зонам антропогенного воздействия в регионе Приаралья // Гигиена и санитария, 2017. Т. 96, № 3. С. 222-226. [Khanturina G.R., Seytkasymova G.Zh., Fedorova I.A. Ecological hygienic assessment of the environment of adjacent territories of zones of anthropogenic impact. *Gigiiena i Sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2017, Vol. 96, no. 3, pp. 222-226. (In Russ.)]
6. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Пащенко М.В. Эпителиальные клетки дыхательных путей как равноправные участники врожденного иммунитета и потенциальные мишени для иммуотропных средств // Иммунология, 2020. Т. 41, № 2. С. 107-113. [Khaitov R.M., Pinegin B.V., Pashenkov M.V. Epithelial cells of the respiratory tract as equal participants of innate immunity and potential targets for immunotropic drugs. *Immunologiya = Immunologiya*, 2020, Vol. 41, no. 2, pp. 107-113. (In Russ.)]
7. Cronin S.J.F., Woolf C.J., Weiss G., Penninger J.M. The Role of Iron Regulation in Immunometabolism and Immune-Related Disease. *Front. Mol. Biosci.*, 2019, Vol. 6, 116. doi: 10.3389/fmolb.2019.00116.
8. Hassan T.H., Badr M.A., Karam N.A., Zkaria M., El Saadany H.F., Rahman D.M.A., Shahbah D.A., Al Morshedy S.M., Fathy M., Esh A.M.H., Selim A.M. Impact of iron deficiency anemia on the function of the immune system in children. *Medicine (Baltimore)*, 2016, Vol. 95, no. 47, e5395. doi: 10.1097/MD.0000000000005395.
9. Vimercati L., Gatti M.F., Baldassarre A., Nettis E., Favia N., Palma M., Martina G.L., Di Leo E., Musti M. Occupational exposure to urban air pollution and allergic diseases. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2015. Vol. 12, no. 10, pp. 12977-12987.

---

### Авторы:

**Жиемуратова Г.К.** — к.м.н., старший научный сотрудник Нукусского филиала Института иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан, г. Нукус, Республика Узбекистан

**Арипова Т.У.** — д.м.н., академик, директор Института иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент, Республика Узбекистан

**Камалов З.С.** — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунорегуляции Института иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент, Республика Узбекистан

**Мамбеткаримов Г.А.** — д.м.н., заместитель директора по научной работе Каракалпакского филиала Республиканского научного центра экстренной медицинской помощи, г. Нукус, Республика Узбекистан

### Authors:

**Jiemuratova G.K.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Nukus Branch of the Institute of Immunology and Human Genomics, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Nukus, Republic of Uzbekistan

**Aripova T.U.**, PhD, MD (Medicine), Academician, Director, Institute of Human Immunology and Genomics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan

**Kamalov Z.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Human Immunology and Genomics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan

**Mambetkarimov G.A.**, PhD, MD (Medicine), Deputy Director for Scientific Work, Karakalpak Branch of the Republican Scientific Center of Emergency Medical Care, Nukus, Republic of Uzbekistan

---

Поступила 29.03.2024

Отправлена на доработку 31.03.2024

Принята к печати 12.04.2024

---

Received 29.03.2024

Revision received 31.03.2024

Accepted 12.04.2024

## СООТНОШЕНИЕ ИММУННЫХ ИНДЕКСОВ У ЖЕНЩИН СЕМИАРИДНОГО РЕГИОНА

Каббани М.С., Щёголева Л.С., Шашкова Е.Ю.

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова Уральского отделения Российской академии наук», г. Архангельск, Россия

**Резюме.** Экологические и климатические факторы оказывают существенное влияние на иммунную систему, формируя ее состав и функции. Семиаридный регион г. Алеппо, характеризующийся жарким сухим летом и умеренной, влажной и холодной зимой, также отличается загрязнением окружающей среды, например, загрязнителями воздуха и промышленными химикатами. Взаимодействие этих экологических и климатических факторов может нарушать иммунную функцию, вызывая воспалительные реакции, нарушая целостность иммунных клеток и ослабляя способность организма обеспечивать эффективный иммунный ответ. До настоящего времени недостаточно исследованы физиологические особенности параметров системы крови человека и развития физиологических реакций адаптивного иммунного гомеостаза в зависимости от территории проживания. В настоящей работе изучено состояние иммунных индексов у женщин, проживающих в семиаридном регионе. Обследовано 30 женщин в возрасте от 20 до 60 лет без хронических и острых заболеваний. Иммуннокомпетентность оценивали с помощью количества лейкоцитов, анализа субпопуляции лимфоцитов и расчета иммунных показателей, включая соотношение нейтрофилов к лимфоцитам (NLR), соотношение лимфоцитов к моноцитам (LMR), индекс системного воспалительного ответа (SIRI), индекс иммунорегуляции ( $CD4^+/CD8^+$ ) и соотношение лимфопротиферации и апоптоза ( $CD10^+/CD95^+$  и  $CD71^+/CD95^+$ ). Результаты анализа показали, что медиана NLR составляет 2,18 (1,50-2,90), LMR 6,66 (5,47-8,87), SIRI 0,64 (0,45-0,98), иммунорегуляторного индекса 0,99 (0,84-1,27) и соотношения процессов лимфопротиферации к апоптозу ( $CD10^+/CD95^+$  и  $CD71^+/CD95^+$ ) 0,95 (0,65-1,29) и 0,94 (0,78-1,11) соответственно, что указывает на стрессовое состояние иммунного гомеостаза и признаки преждевременного старения иммунной системы. Определено, что соотношение нейтрофилов и лимфоцитов (NLR), соотношение лимфоцитов и моноцитов (LMR), индекс системного воспалительного ответа (SIRI), иммунорегуляторный индекс ( $CD4^+/CD8^+$ ) и соотношение лимфопротиферации и апоптоза ( $CD10^+/CD95^+$  и  $CD71^+/CD95^+$ ) у обследуемых женщин семиаридной климатической зоны проживания, подчеркивает стрессовый уровень иммунного гомеостаза. Полученные результаты под-

### Адрес для переписки:

Каббани Мохаммад Сохиб  
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр  
комплексного изучения Арктики имени академика  
Н.П. Лаверова Уральского отделения Российской  
академии наук»  
163000, Россия, г. Архангельск, пр. Ломоносова, 249, 11.  
Тел./факс: 8 (8182) 28-64-19.  
E-mail: Sohimbmsk@hotmail.com

### Address for correspondence:

Mohammad Sohib Kabbani  
N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research,  
Ural Branch, Russian Academy of Sciences  
249 Lomonosov Ave 249, 11  
Arkhangelsk  
163000 Russian Federation  
Phone/fax: +7 (8182) 28-64-19.  
E-mail: Sohimbmsk@hotmail.com

### Образец цитирования:

М.С. Каббани, Л.С. Щёголева, Е.Ю. Шашкова  
«Соотношение иммунных индексов у женщин  
семиаридного региона» // Российский иммунологический  
журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 287-292.  
doi: 10.46235/1028-7221-16809-ROI

© Каббани М.С. и соавт., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

M.S. Kabbani, L.S. Shchegoleva, E.Yu. Shashkova "Ratio  
of immune indices in women of the semi-arid region", Russian  
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 287-292.  
doi: 10.46235/1028-7221-16809-ROI

© Kabbani M.S. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16809-ROI

черкуют необходимость систематического индивидуального медико-биологического мониторинга для поддержания иммунного гомеостаза в популяциях, населяющих схожие условия окружающей среды.

*Ключевые слова:* иммунные индексы, соотношение нейтрофилов к лимфоцитам, соотношение лимфоцитов к моноцитам, индекс системного воспалительного ответа, иммунорегуляторный индекс  $CD4^+/CD8^+$ , соотношение лимфопролиферации и апоптоза, семиаридный регион

## RATIO OF IMMUNE INDICES IN WOMEN OF THE SEMI-ARID REGION

Kabbani M.S., Shchegoleva L.S., Shashkova E.Yu.

*N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russian Federation*

**Abstract.** Environmental and climatic factors have a significant impact on the immune system, shaping its composition and functions. The semiarid region of Aleppo, characterized by hot, dry summers and moderate, wet and cold winters, is also characterized by environmental pollution such as air pollutants and industrial chemicals. The interaction of these environmental and climatic factors can impair immune function by causing inflammatory responses, compromising the integrity of immune cells, and impairing the body's ability to mount an effective immune response. To date, the physiological characteristics of the parameters of the human blood system and the development of physiological reactions of adaptive immune homeostasis depending on the territory of residence have not been sufficiently studied. In this work, we studied the state of immune indices in women living in the semi-arid region. Thirty women aged from 20 to 60 years without chronic and acute diseases were examined. Immunocompetence was assessed using white blood cell count, lymphocyte subset analysis and calculation of immune indices including neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), lymphocyte to monocyte ratio (LMR), systemic inflammatory response index (SIRI), immunoregulatory index ( $CD4^+/CD8^+$ ) and lymphoproliferation ratio and apoptosis ( $CD10^+/CD95^+$  and  $CD71^+/CD95^+$ ). The results of the analysis showed that the median NLR was 2.18 (1.50-2.90), LMR 6.66 (5.47-8.87), SIRI 0.64 (0.45-0.98), immunoregulatory index 0.99 (0.84-1.27) and the ratio of lymphoproliferation processes to apoptosis ( $CD10^+/CD95^+$  and  $CD71^+/CD95^+$ ) 0.95 (0.65-1.29) and 0.94 (0.78-1.11), respectively, which indicates a stressful state of immune homeostasis and signs of premature aging of the immune system. Neutrophil-lymphocyte ratio (NLR), lymphocyte-monocyte ratio (LMR), systemic inflammatory response index (SIRI), immunoregulatory index ( $CD4^+/CD8^+$ ) and lymphoproliferation-apoptosis ratio were determined. ( $CD10^+/CD95^+$  and  $CD71^+/CD95^+$ ) in the examined women of the semiarid climate zone of residence, emphasizes the stressful level of immune homeostasis. The results obtained highlight the need for systematic individual biomedical monitoring to maintain immune homeostasis in populations inhabiting similar environmental conditions.

*Keywords:* immune indices, neutrophil to lymphocyte ratio, lymphocyte to monocyte ratio, systemic inflammatory response index, immunoregulatory index  $CD4^+/CD8^+$ , ratio of lymphoproliferation and apoptosis, semi-arid region

### Введение

Экологические и климатические факторы оказывают влияние на долю и функцию иммунокомпетентных клеток. Известно, что факторы окружающей среды, такие как химические вещества, нарушают работу эндокринной системы, состояние микробиоты и могут моделировать иммунный гомеостаз [7, 8].

Одним из наиболее надежных методов для оценки состояния иммунного гомеостаза явля-

ется мониторинг иммунокомпетентности путем определения количества лейкоцитов и их субпопуляций как в абсолютных, так и в относительных значениях и определение их соотношения (иммунные индексы) [1, 3, 14].

В последние десятилетия получила распространение практика количественной оценки иммунологических параметров в исследованиях, связанных с окружающей средой. Объединение различных иммунологических маркеров в виде

индексов оказывается полезным при оценке различных аспектов иммунной системы и проведения тщательного анализа иммунной функциональности [6].

Иммунные индексы, такие как соотношение нейтрофилов к лимфоцитам (NLR), соотношение лимфоцитов к моноцитам (LMR) и иммунорегуляторный индекс ( $CD4^+/CD8^+$ ), часто используются для контроля и прогноза результатов лечения разных заболеваний, причем они более чувствительные, чем единичные параметры [5, 11, 13]. Индекс системного воспалительного ответа (SIRI) представляет собой недавно разработанный прогностический параметр, полученный на основе относительных пропорций числа периферических нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов (полученный по формуле количество нейтрофилов  $\times$  количество моноцитов/количество лимфоцитов). Предыдущие исследования показали, что SIRI служит отдельным прогностическим маркером при различных аутоиммунных и сердечно-сосудистых заболеваниях [2].

Пролиферация и гибель клеток являются важными механизмами, которые контролируют состояние иммунного гомеостаза организма. Эта адаптационная связь между регуляцией клеточной пролиферации и запрограммированной гибелью клеток, которая широко распространена среди различных типов клеток, включая те, которые участвуют в иммунных реакциях, гарантирует эффективный рост иммунокомпетентных клеток и общее состояние здоровья организма. Последствия несбалансированной пролиферации и апоптоза клеток приведут к неконтролируемой скорости роста и дисфункции многих физиологических процессов [9].

Все вышеперечисленные параметры изучены в связи с разными заболеваниями, но их значения мало изучены у здоровых людей в связи с местом проживания.

**Целью нашей работы** является выявление значения разных иммунных индексов у практически здоровых женщин, проживающих в семиаридном регионе.

## Материалы и методы

В рамках государственного задания № 122011700267-5, обследовано 30 женщин, 20-60 лет (в среднем  $38,5 \pm 2,4$  года), жителей г. Алеппо, Сирия (Семиаридный климатический регион). У всех обследованных лиц в анамнезе не имелись хронические или острые заболевания. Обследование проводили с письменного согласия респондентов с соблюдением основных норм

биомедицинской этики в соответствии с документом «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» (Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации 1964). Этический протокол № 4, 10.02.2022.

Первый этап исследования выполнен на базе лаборатории биохимии, институт естественных наук, Алеппо университет, первый этап включал взятие крови, определение общего количества лейкоцитов стандартным методом в камере Горяева, подготовку мазков крови стандартным методом по Романовскому-Гимзе, мазков лимфоцитов с помощью фиколла (1,077) с их фиксацией для дальнейшей обработки и подсчета.

Второй этап выполнен на базе лаборатории физиологии иммунокомпетентных клеток, институт физиологии природных адаптации, ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН. Второй этап включал подсчет лейкоцитарной формулы, определение процентного содержания субпопуляции лимфоцитов (лимфоциты с маркером к лимфолиферации  $CD10^+$ , лимфоциты с рецептором к трансферрину  $CD71^+$  и лимфоциты с маркером к апоптозу  $CD95^+$ ) методом непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител на препаратах лимфоцитов типа «высушенная капля» с применением пероксидазного конъюгата и окрашиванием раствором хромогена.

Иммунологическое обследование включало определение соотношения нейтрофилов к лимфоцитам (NLR), соотношение лимфоцитов к моноцитам (LMR), Индекс системного воспалительного ответа (SIRI), иммунорегуляторный индекс ( $CD4^+/CD8^+$ ) и соотношение лимфолиферации к апоптозу ( $CD10^+/CD95^+$  и  $CD71^+/CD95^+$ ).

Статистический анализ осуществляли с помощью Microsoft Excel 2019 и SPSS 25. Отсутствие нормального распределения определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Медиану (Me), процентильные интервалы ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ) и 95%-ный доверительный интервал (нижняя граница–верхняя граница) использовали для представления полученных результатов.

## Результаты и обсуждение

Анализ показал, что медиана соотношения нейтрофилов к лимфоцитам составляет 2,18 (1,50–2,90) с 95%-ным доверительным интервалом (1,91–2,80) (табл. 1), что, согласно работе Zahorec R. [15], находится в пределах низкого

**ТАБЛИЦА 1. МЕДИАНА И 95% ДОВЕРИТЕЛЬНЫЙ ИНТЕРВАЛ ИММУННЫХ ИНДЕКСОВ У ЖЕНЩИН ЖИТЕЛЕЙ СЕМИАРИДНОГО РЕГИОНА**

TABLE 1. MEDIAN AND 95% CONFIDENCE INTERVAL IMMUNE INDICES IN WOMEN RESIDENTS OF THE SEMI-ARID REGION

Показатель Parameter	Медиана ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) Median ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )	95% доверительный Интервал 95% confidence Interval
NLR	2,18 (1,50-2,90)	(1,91-2,80)
LMR	6,66 (5,47-8,87)	(6,33-8,40)
SIRI	0,64 (0,45-0,98)	(0,60-0,95)
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	0,99 (0,84-1,27)	(0,95-1,40)
CD10 <sup>+</sup> /CD95 <sup>+</sup>	0,95 (0,65-1,29)	(0,80-1,24)
CD71 <sup>+</sup> /CD95 <sup>+</sup>	0,94 (0,78-1,11)	(0,83-1,10)

воспалительного стресса (2-3) и служит ранним показателем напряжения иммунных реакций.

Медиана соотношения лимфоцитов к моноцитам составляет 6,66 (5,47-8,87) с 95%-ным доверительным интервалом (6,33-8,40), что является положительным показателем (выше 3) в прогнозе возможности выздоровления от разных типов заболеваний, а также снижении возможности развития заболевания сердечно-сосудистой системы [12].

Медиана индекса системного воспалительного ответа (SIRI) составляет 0,64 (0,45-0,98) с 95%-ным доверительным интервалом (0,60-0,95). Хотя медиана SIRI находится ниже 0,75, что считается положительным прогнозом, связанным с низкой возможностью развития нарушения физиологических функций сердечно-сосудистой системы и метаболических процессов [4], но доверительный интервал и уровень SIRI у 33,3% обследуемых указывает на то, что у женщин семиаридного региона есть умеренная предрасположенность к развитию заболеваний сердечно-сосудистой системы и нарушения метаболических процессов.

Медиана иммунорегуляторного индекса (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) составляет 0,99 (0,84-1,27) с 95%-ным доверительным интервалом (0,95-1,40), что находится на нижней границе пределов оптимальных физиологических значений (1,0-3,5) с регистрацией 50% перевернутых значений у обследуемых женщин за счет относительного снижения содержания Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>) и относительного повышения содержания цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>), что считается фактором риска старения иммунной системы и нарушения иммунного гомеостаза [10].

Медиана соотношения процессов лимфо-пролиферации к апоптозу (CD10<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup>) и (CD71<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup>) составляет 0,95 (0,65-1,29) и 0,94 (0,78-1,11) соответственно. С 95%-ным доверительными интервалами (0,80-1,24) и (0,83-1,10) соответственно, что указывает на состояние равновесия между процессами лимфо-пролиферации и апоптоза с признаками стремления к преодолению процесса апоптоза над лимфо-пролиферацией, что в свою очередь служит признаком преждевременного старения иммунной системы [10].

## Заключение

Исследование дает представление об иммунных показателях и потенциальные последствия для здоровья женщин 20-60 лет, проживающих в семиаридном регионе. Результаты показывают тонкую картину иммунного гомеостаза в этой популяции, на которую влияют факторы окружающей среды и климата семиаридной зоны проживания. Анализ различных иммунных маркеров, таких как соотношение нейтрофилов и лимфоцитов (NLR), соотношение лимфоцитов и моноцитов (LMR), индекс системного воспалительного ответа (SIRI), иммунорегуляторный индекс (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) и соотношение лимфо-пролиферации и апоптоза. (CD10<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup> и CD71<sup>+</sup>/CD95<sup>+</sup>) подчеркивают стрессовый уровень иммунного гомеостаза.

В то время как некоторые индексы, такие как соотношение лимфоцитов и моноцитов, предполагают положительный прогноз, другие предполагают потенциальные риски для здоровья, такие как индекс системной воспалительной реакции



и индекс иммунорегуляции. Более того, равновесие между процессами лимфопрлиферации и апоптоза, хотя и склоняющееся к апоптозу, предполагает состояние старения иммунной системы.

Полученные результаты способствуют пониманию динамики иммунитета у здоровых людей в конкретных условиях окружающей среды и требуют дальнейших исследований для установления референтных значений изученных показателей, выяснения долгосрочных последствий для здоровья и потенциальных вмешательств для поддержания иммунного гомеостаза в популяци-

ях, проживающих в аналогичных климатических регионах. Такие идеи имеют решающее значение для разработки целевых стратегий здравоохранения, адаптированных к уникальным иммунным профилям различных групп населения.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность заведующему лаборатории биохимии Университета Алеппо, Сирия, профессору Нидаль Раджеху за помощь в организации регионального фрагмента исследования.

## Список литературы / References

1. Biard C., Monceau K., Motreuil S., Moreau J. Interpreting immunological indices: The importance of taking parasite community into account. An example in blackbirds *Turdus merula*. *Met. Ecol. Evol.*, 2015, Vol. 6, no. 8, pp. 960-972.
2. Dang H., Mao W., Wang S., Sha J., Lu M., Cong L., Meng X., Li H. Systemic inflammation response index as a prognostic predictor in patients with acute ischemic stroke: A propensity score matching analysis. *Front. Neurol.*, 2023, Vol. 13, 1049241. doi: 10.3389/fneur.2022.1049241.
3. Demas G.E., Zysling D.A., Beechler B.R., Muehlenbein M.P., French S.S. Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *J. Anim. Ecol.*, 2011, Vol. 80, no. 4, pp. 710-730.
4. Elfeky S.E.F., Ali A., Moazen E.M., Alhassoon M.H., Elzanaty N.A., Alazmi N.M., Wu L., Saleh M.M. Systemic inflammatory response index as an independent predictor of severity in patients with obstructive sleep apnea. *Egypt. J. Bronchol.*, 2024, Vol. 18, no. 1, 1. doi: 10.1186/s43168-023-00253-y.
5. Ferrucci P.F., Gandini S., Battaglia A., Alfieri S., Di Giacomo A.M., Giannarelli D., Cappellini G.C.A., de Galitiis F., Marchetti P., Amato G., Lazzeri A., Pala L., Cocorocchio E., Martinoli C. Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with outcome of ipilimumab treated metastatic melanoma patients. *Br. J. Cancer*, 2015, Vol. 112, pp. 1904-1910.
6. Hegemann A., Pardal S., Matson, K.D. Indices of immune function used by ecologists are mostly unaffected by repeated freeze-thaw cycles and methodological deviations. *Front.Zool.*, 2017, Vol. 14, 43. doi:10.1186/s12983-017-0226-9.
7. Isidori A.M., Hasenmajer V., Sciarra F., Venneri M.A. Environmental Impact on Immune System. In: *Environmental Endocrinology and Endocrine Disruptors*. 1<sup>st</sup> ed. Eds. Pivonello R., Diamanti-Kandarakis E., Springer Cham, 2023, pp. 363-395.
8. Kondo Y., Abe S., Toko H., Hirota T., Takahashi H., Shimizu M., Noma H., Tsuboi H., Matsumoto I., Inaba T., Sumida T. Effect of climatic environment on immunological features of rheumatoid arthritis. *Sci. Rep.*, 2023, Vol. 13, no. 1, 1304. doi: 10.1038/s41598-022-27153-3.
9. Loftus L.V., Amend S.R., Pienta K.J. Interplay between cell death and cell proliferation reveals new strategies for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 9, 4723. doi: 10.3390/ijms23094723.
10. Luz Correa B., Ornaghi A.P., Cerutti Muller G., Engroff P., Pestana Lopes R., Gomes da Silva Filho I., Bosch J.A., Bonorino C., Bauer M.E. The inverted CD4:CD8 ratio is associated with cytomegalovirus, poor cognitive and functional states in older adults. *Neuroimmunomodulation*, 2014, Vol. 21, no. 4, pp. 206-212.
11. Martens A., Wistuba-Hamprecht K., Yuan J., Postow M.A., Wong P., Capone M., Madonna G., Khammari A., Schilling B., Sucker A., Schadendorf D., Martus P., Dreno B., Ascierto P.A., Wolchok J.D., Pawelec G., Garbe C., Weide B. Increases in absolute lymphocytes and circulating CD4 and CD8 T cells are associated with positive clinical outcome of melanoma patients treated with Ipilimumab. *Clin. Cancer Res.*, 2016, Vol. 22, pp. 4848-4858.
12. Ren H., Liu X., Wang L., Gao Y. Lymphocyte-to-monocyte ratio: a novel predictor of the prognosis of acute ischemic stroke. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, 2017, Vol. 26, no. 11, pp. 2595-2602.
13. Selvaraj R.K., Shanmugasundaram R., Rengasamy R. The use and abuse of immune indices in nutritional immunology studies. *J. Appl. Poultry Res.*, 2016, Vol. 25, no. 2, pp. 284-291.

14. Vinkler M., Albrecht T. Handling 'immunocompetence' in ecological studies: do we operate with confused terms? *J. Avian Biol.*, 2011, Vol. 42, no. 6, pp. 490-493.
15. Zahorec R. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, past, present and future perspectives. *Bratisl. Lek. Listy*, 2021, Vol. 122, no. 7, pp. 474-488.

---

**Авторы:**

**Каббани М.С.** — научный сотрудник ФГБУН «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова Уральского отделения Российской академии наук», г. Архангельск, Россия

**Щёголева Л.С.** — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией физиологии иммунокомпетентных клеток ФГБУН «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова Уральского отделения Российской академии наук», г. Архангельск, Россия

**Шашкова Е.Ю.** — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова Уральского отделения Российской академии наук», г. Архангельск, Россия

**Authors:**

**Kabbani M.S.**, Research Associate, N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russian Federation

**Shchegoleva L.S.**, PhD, MD (Biology), Professor, Chief Research Associate, Head, Laboratory of Physiology of Immunocompetent Cells, N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russian Federation

**Shashkova E.Yu.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russian Federation

---

Поступила 31.03.2024  
Отправлена на доработку 01.04.2024  
Принята к печати 10.04.2024

---

Received 31.03.2024  
Revision received 01.04.2024  
Accepted 10.04.2024

# ИММУНОТЕРАПИЯ – НОВАЯ ВОЗМОЖНОСТЬ ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОК С «ТОНКИМ» ЭНДОМЕТРИЕМ В ЦИКЛАХ ПЕРЕНОСА РАЗМОРОЖЕННЫХ ЭМБРИОНОВ

Лысенко О.В.<sup>1,2</sup>, Бресский А.Г.<sup>1</sup>, Огризко И.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> Центр семейного здоровья «БИНА», г. Витебск, Республика Беларусь

**Резюме.** Тенденция последних десятилетий – поиск терапевтического воздействия на так называемый «тонкий» эндометрий. Тем не менее до настоящего времени не существует оптимальной схемы ведения пациенток с «тонким» эндометрием в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

Цель – оценить эффективность применения рекомбинантного ИЛ-2 перед проведением криотрансфера у женщин старшего репродуктивного возраста с «тонким» эндометрием и многократными неудачными попытками переноса эмбрионов хорошего качества.

В исследование включено 63 пациентки позднего репродуктивного возраста с «тонким» эндометрием.

Первую группу составили 25 пациенток позднего репродуктивного возраста с неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения в анамнезе при переносе эмбрионов хорошего качества. Криоперенос пациенткам первой группы был проведен в модифицированном естественном цикле.

Вторая группа – 38 женщин позднего репродуктивного возраста с неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения в анамнезе при переносе эмбрионов хорошего качества. Криоперенос женщинам второй группы был проведен в цикле с заместительной гормональной терапией.

Всем женщинам в цикле перед криопереносом был назначен рекомбинантный ИЛ-2.

В обеих группах оценены частота имплантации, клинической беременности и живорождения после назначения рекомбинантного ИЛ-2.

Статистическая обработка данных осуществлялась с применением прикладного программного пакета Statistica 6.0 (StatSoft, Ink. 1994-2001), адаптированного для медико-биологических исследований. При использовании описательной статистики определялись параметры: выборочное среднее (M); среднее квадратическое отклонение (SD); медиана (Me), 25-й квартиль (Q<sub>0,25</sub>), 75-й квартиль

---

## Адрес для переписки:

Лысенко Ольга Викторовна  
УО «Витебский государственный медицинский университет»  
210032, Республика Беларусь, г. Витебск,  
пр. Строителей, 12, кв. 41.  
Тел.: +375 297100223.  
E-mail: lysenko\_o\_v@mail.ru

## Address for correspondence:

Olga V. Lysenko  
Vitebsk State Medical University  
12 Stroiteley Ave, Apt 41  
Vitebsk  
210032 Republic of Belarus  
Phone: +375 297100223.  
E-mail: lysenko\_o\_v@mail.ru

---

## Образец цитирования:

О.В. Лысенко, А.Г. Бресский, И.Н. Огризко  
«Иммунотерапия – новая возможность ведения пациенток с «тонким» эндометрием в циклах переноса размороженных эмбрионов» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 293-298.  
doi: 10.46235/1028-7221-16646-IIA

© Лысенко О.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

O.V. Lysenko, A.G. Bresski, I.N. Ogryzko “Immunotherapy is a new opportunity for managing patients with “thin” endometrium in cycles of transfer of thawed embryos”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 293-298.  
doi: 10.46235/1028-7221-16646-IIA

© Lysenko O.V. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16646-IIA

( $Q_{0.75}$ ). Интерпретация полученных результатов проводилась путем определения их статистической значимости. Во всех случаях критическое значение уровня значимости принималось  $p < 0,05$  (5%).

После лечения рекомбинантным IL-2 пациенток с бесплодием и тонким эндометрием, толщина эндометрия статистически значимо увеличивается в первых двух менструальных циклах после лечения, поэтому перенос размороженных эмбрионов следует планировать в первые два менструальных цикла после иммунотерапии.

С целью увеличения толщины эндометрия при проведении криопереноса в модифицированном естественном цикле, а также в цикле с заместительной гормональной терапией можно использовать рекомбинантный IL-2 у женщин с «тонким» эндометрием с многократными неудачными попытками имплантации при переносе эмбрионов хорошего качества.

Криоперенос следует производить в первые два менструальных цикла после проведенной иммунотерапии.

*Ключевые слова: тонкий эндометрий, иммунотерапия, неудачи имплантации, перенос размороженных эмбрионов, вспомогательные репродуктивные технологии, хронический эндометрит, модифицированный естественный цикл, цикл с заместительной гормональной терапией*

## IMMUNOTHERAPY IS A NEW OPPORTUNITY FOR MANAGING PATIENTS WITH “THIN” ENDOMETRIUM IN CYCLES OF TRANSFER OF THAWED EMBRYOS

Lysenko O.V.<sup>a,b</sup>, Bresski A.G.<sup>a</sup>, Ogryzko I.N.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

<sup>b</sup> Family Health Center “BINA”, Vitebsk, Republic of Belarus

**Abstract.** The trend of recent decades has been the search for therapeutic effects on the so-called “thin” endometrium. However, to date there is no optimal management scheme for patients with “thin” endometrium in assisted reproductive technology programs. Aim: to evaluate the effectiveness of using recombinant IL-2 before cryotransfer in women of late reproductive age with “thin” endometrium and repeated implantation failure after transfer of good quality embryos.

The study included 63 patients of late reproductive age with “thin” endometrium. The first group consisted of 25 patients of late reproductive age with a history of unsuccessful *in vitro* fertilization programs with good quality embryos. Cryotransfer to the patients of the first group was carried out in a modified natural cycle. The second group included 38 women of late reproductive age with a history of unsuccessful *in vitro* fertilization programs with good quality embryos. Cryotransfer for women of the second group was carried out in a cycle with hormone replacement therapy. Recombinant IL-2 in the cycle before cryotransfer were prescribed to all women. In both groups, implantation, clinical pregnancy, and live birth rates following administration of recombinant IL-2 were valuable. In both groups, the implantation rate, clinical pregnancy rate and live birth rate were assessed after administration of recombinant IL-2. Statistical data processing was performed using application software package Statistica 6.0 (StatSoft, Ink. 1994-2001), adapted for biomedical research.  $p < 0.05$  was considered significant.

After recombinant IL-2 treatment of patients with infertility and thin endometrium, endometrial thickness increases statistically significantly in the first two menstrual cycles after treatment, so transfer of thawed embryos should be planned in the first two menstrual cycles after immunotherapy.

In order to increase the thickness of the endometrium during cryotransfer in a modified natural cycle, as well as in a cycle with replacement hormone therapy, recombinant IL-2 can be used in women with “thin” endometrium with repeated unsuccessful implantation attempts when transferring good quality embryos.

Cryotransfer should be performed in the first two menstrual cycles after immunotherapy.

*Keywords: thin endometrium, immunotherapy, implantation failures, transfer of thawed embryos, assisted reproductive technologies, chronic endometritis, modified natural cycle, cycle with hormone replacement therapy*

## Введение

Главным показателем результативности программ экстракорпорального оплодотворения является частота живорождений. Общеизвестно, что невозможно достичь 100% эффективности при применении вспомогательных репродуктивных технологий [2, 3, 4, 5].

Результат программ в первую очередь зависит от двух основных факторов – компетентных эмбриона [6] и эндометрия [7].

С одной стороны, мы не можем повлиять на генетический потенциал родителей, из биологического материала которых получают эмбрионы. С целью идентификации эмбрионов, непригодных для переноса, можно провести преимплантационную генетическую диагностику. Это позволяет отменить перенос генетически некомпетентных эмбрионов [8]. Для проведения преимплантационной генетической диагностики необходима сегментация программы экстракорпорального оплодотворения с последующим переносом эмбрионов, пригодных к переносу по результатам генетической диагностики.

С другой стороны, можно попытаться улучшить качество эндометрия, особенно у женщин с «тонким» эндометрием. Так называемый синдром «тонкого» эндометрия большинство исследователей связывают с наличием хронического эндометрита [9, 10].

Тенденция последних десятилетий – поиск терапевтического воздействия на так называемый «тонкий» эндометрий. Тем не менее до настоящего времени не существует оптимальной схемы ведения пациенток с «тонким» эндометрием в программах вспомогательных репродуктивных технологий [11].

Раннее нами было установлено, что у женщин с хроническим эндометритом на мукозальном (эндометрий) уровне наблюдается дисбаланс секреции цитокинов, в частности достоверное снижение IL-2 [1], что позволяет провести попытку его применения при ведении пациенток с «тонким» эндометрием в циклах переноса размороженных эмбрионов.

**Цель исследования** – оценить эффективность применения рекомбинантного IL-2 перед проведением криотрансфера у женщин старшего репродуктивного возраста с «тонким» эндометрием и многократными неудачными попытками переноса эмбрионов хорошего качества.

## Материалы и методы

В исследование включено 63 пациентки позднего репродуктивного возраста, проходивших

лечение в Центре семейного здоровья «БИНА» (г. Витебск, Республика Беларусь) за период 2017–2023 гг.

Первую группу составили 25 пациенток позднего репродуктивного возраста. В анамнезе пациенток первой группы было от 2 до 5 программ экстракорпорального оплодотворения и от 2 до 9 переносов эмбрионов хорошего качества. Все попытки были отрицательными. Криоперенос пациенткам первой группы был проведен в модифицированном естественном цикле.

Вторая группа – 38 женщин позднего репродуктивного возраста, у которых в анамнезе было от 3 до 5 программ экстракорпорального оплодотворения и от 3 до 9 переносов эмбрионов хорошего качества без эффекта, все попытки переноса эмбрионов были отрицательными. Криоперенос женщинам второй группы был проведен в цикле с заместительной гормональной терапией.

Пациенткам первой и второй групп в цикле перед криопереносом был назначен рекомбинантный IL-2.

Всем женщинам первой и второй групп проводилось трансвагинальное ультразвуковое исследование органов малого таза в 2D-режиме на 9–10-й день менструального цикла, когда был назначен рекомбинантный IL-2, в следующем менструальном цикле, цикле криопереноса.

Пациенткам первой группы в цикле криопереноса трансвагинальное ультразвуковое исследование органов малого таза в 2D-режиме было проведено на 10–12-й день менструального цикла, а женщинам второй группы в цикле криопереноса трансвагинальное ультразвуковое исследование органов малого таза в 2D-режиме было проведено на 9–10-й день от начала заместительной гормональной терапии.

В обеих группах оценены частота имплантации, клинической беременности и живорождения после назначения рекомбинантного IL-2.

Статистическая обработка данных осуществлялась с применением прикладного программного пакета Statistica 6.0 (StatSoft, Ink. 1994–2001), адаптированного для медико-биологических исследований. При использовании описательной статистики определялись параметры: выборочное среднее (M); среднее квадратическое отклонение (SD); медиана (Me), 25-й квартиль ( $Q_{0,25}$ ), 75-й квартиль ( $Q_{0,75}$ ). Интерпретация полученных результатов проводилась путем определения их статистической значимости. Во всех случаях критическое значение уровня значимости принималось  $p < 0,05$  (5%).

## Результаты и обсуждение

Средний возраст пациенток первой группы составил 39,0 (34,0–41,0) лет, второй группы – 38 (34,0–41,0) лет. Таким образом, группы сопоставимы по возрасту ( $p > 0,05$ ).

При переносе эмбрионов (как в свежем, так и в криоцикле), очень важна толщина эндометрия в конце первой фазы менструального цикла (криоперенос в естественном цикле или модифицированном естественном цикле), а также перед назначением прогестерона (в цикле с заместительной гормональной терапией).

Так, толщина эндометрия пациенток первой группы составила в первую фазу менструального цикла (10–12-й день) 5,2 (4,3–5,8) мм. Женщинам этой группы был назначен рекомбинантный ИЛ-2 производства ООО «НПК»Биотех». Препарат назначался в дозе 500 000 МЕ внутривенно капельно на 400 мл физиологического раствора 1 раз в 3 суток, всего 5 инфузий.

В следующем менструальном цикле толщина эндометрия в этой группе составила в первую фазу – 7,1 (6,2–8,3) мм (статистически значимо больше, чем до лечения,  $p < 0,05$ ). Статистически значимое увеличение толщины эндометрия позволило провести перенос размороженных эмбрионов пациенткам первой группы. Во всех случаях были перенесены эмбрионы хорошего качества. Таким образом, толщина эндометрия статистически значимо увеличивается после лечения рекомбинантным ИЛ-2. Частота биохимической беременности составила 48% (12 женщин), клинической – 40,0% (10 женщин), родов – 28,0% (7 женщин). Что является хорошим результатом, учитывая многократные неудачи имплантации после переноса эмбрионов хорошего качества в анамнезе пациенток этой группы.

Кроме того, мы измеряли толщину эндометрия в конце первой фазы менструального цикла пациенткам, у которых попытка криопереноса эмбрионов после назначения рекомбинантного ИЛ-2 была отрицательная в течение следующих двух менструальных циклах. Так, через месяц после лечения толщина эндометрия в этой группе составила в первую фазу – 7,5 (6,4–8,6) мм (статистически значимо больше, чем до лечения,  $p < 0,05$ ). Но через 2 месяца толщина эндометрия в конце первой фазы менструального цикла статистически значимо не отличалась от толщины эндометрия до лечения (5,4 (4,2–5,8) мм,  $p > 0,05$ ).

Так, толщина эндометрия пациенток второй группы составила в первую фазу менструального цикла (10–12-й день) 5,1 (4,4–5,9) мм, что статистически не отличается от толщины эндометрия пациенток первой группы. Женщинам второй группы также был назначен рекомбинантный ИЛ-2 в дозе 500 000 МЕ внутривенно капельно на 400 мл физиологического раствора 1 раз в 3 суток, всего 5 инфузий.

В следующем менструальном цикле толщина эндометрия женщин второй группы составила в первую фазу – 7,0 (6,1–8,4) мм (статистически значимо больше, чем до лечения,  $p < 0,05$ ). Увеличение толщины эндометрия на фоне проведенной иммунотерапии позволило провести перенос размороженных эмбрионов этой группы. Во всех случаях были перенесены эмбрионы хорошего качества.

Частота биохимической беременности во второй группе составила 44,7% (17 женщин), клинической – 36,8% (14 женщин), родов – 26% (10 пациенток). Частота наступления биохимической, клинической беременностей и родов статистически не отличается между первой и второй группами ( $p > 0,05$ ).

Во второй группе мы также измеряли толщину эндометрия пациенткам, у которых попытка криопереноса эмбрионов после проведения иммунотерапии была отрицательная в течение следующих двух менструальных циклах на 10–12-й день цикла и получили такую же закономерность – статистически значимое увеличение толщины эндометрия через месяц после лечения – 7,3 (6,5–8,9) мм (статистически значимо больше, чем до лечения,  $p < 0,05$ ). Но через 2 месяца, как и в первой группе, толщина эндометрия на 10–12-й день менструального цикла статистически значимо не отличалась от толщины эндометрия до лечения (5,2 (4,1–5,7) мм,  $p > 0,05$ ).

В последние годы, несмотря на огромный прорыв во вспомогательных репродуктивных технологиях, невозможно получить 100%-ную эффективность программ. Это побуждает искать новые подходы, улучшающие результативность проведенного лечения. Особый контингент женщин – это пациентки с «тонким» эндометрием.

Иммунотерапия рекомбинантным ИЛ-2 показала хорошие результаты при криопереносе, как в модифицированном естественном цикле, так и в цикле с заместительной гормональной терапией, что позволило получить беременности и роды у

пациенток с «тонким» эндометрием и многократными неудачами имплантации при переносе эмбрионов хорошего качества в анамнезе.

Но необходимо помнить о том, что клинические изменения в виде увеличения толщины эндометрия происходят в первые два менструальных цикла после проведения лечения, поэтому перенос размороженных эмбрионов следует планировать в цикле после проведения иммунотерапии, а не откладывать более чем на 2 менструальных цикла после проведения иммунотерапии.

## Выводы

С целью увеличения толщины эндометрия при проведении криопереноса в модифицированном естественном цикле, а также в цикле с заместительной гормональной терапией можно использовать рекомбинантный ИЛ-2 у женщин с «тонким» эндометрием с многократными неудачными попытками имплантации при переносе эмбрионов хорошего качества.

Криоперенос следует производить в первые два менструальных цикла после проведенной иммунотерапии.

## Список литературы / References

1. Лысенко О.В., Рождественская Т.А. Проблема «тонкого» эндометрия в репродуктивной медицине: опыт применения рекомбинантного интерлейкина-2 человека для подготовки пациенток к программам вспомогательных репродуктивных технологий // Журнал акушерства и женских болезней, 2017, Т. 66, № 4. С. 46-50. [Lysenko O.V., Rozhdestvenskaya T.A. The problem of “thin” endometrium in reproductive medicine: experience of using recombinant human interleukin-2 to prepare patients for assisted reproductive technology programs. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women’s Diseases*, 2017, Vol. 66, no. 4, pp. 46-50. (In Russ.)]
2. Capalbo A., Romanelli V., Cimadomo D., Girardi L., Stoppa M., Dovere L., Dell’Edera D., Ubaldi F.M., Rienzi L.J. Implementing PGD/PGD-A in IVF clinics: considerations for the best laboratory approach and management. *Assist. Reprod. Genet.*, 2016, Vol. 33, no. 10, pp. 1279-1286.
3. De la Torre Perez E., Carratalá-Munuera M.C., Castillo-Farfán J.C., Lledó-Bosch B., Moliner-Renau B., Bernabeu-García A., Bernabeu-Pérez R. Impact of endometrial compaction on reproductive outcomes after cryotransfer of euploid embryos in a modified natural cycle: protocol for a prospective cohort study. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2023, no. 14, 1285040. doi: 10.3389/fendo.2023.1285040.
4. Kushnir V.A., Solouki S., Sarig-Meth T., Vega M.G., Albertini D.F., Darmon S.K., Deligdisch L., Barad D.H., Gleicher N. Systemic inflammation and autoimmunity in women with chronic endometritis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 75, no. 6, pp. 672-327.
5. Lebovitz O., Orvieto R. Treating patients with “thin” endometrium – an ongoing challenge. *Gynecol. Endocrinol.*, 2014, Vol. 30, no. 6, pp. 409-414.
6. Ma J., Gao W., Li D. Recurrent implantation failure: A comprehensive summary from etiology to treatment. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2023, no. 13, 1061766. doi: 10.3389/fendo.2022.1061766.
7. McLernon D.J., Harrild K., Bergh C., Davies M.J., de Neubourg D., Dumoulin J.C., Gerris J., Kremer J.A., Martikainen H., Mol B.W., Norman R.J., Thurin-Kjellberg A., Tiitinen A., van Montfoort A.P., van Peperstraten A.M., van Royen E., Bhattacharya S. Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *BMJ*, 2010, no. 341, 6945. doi: 10.1136/bmj.c6945.
8. McQueen D.B., Bernardi L.A., Stephenson M.D. Chronic endometritis in women with recurrent early pregnancy loss and/or fetal demise. *Fertil. Steril.*, 2014, Vol. 101, no. 4, pp. 1026-1030.
9. Singh B., Reschke L., Segars J., Baker V.L. Frozen-thawed embryo transfer: the potential importance of the corpus luteum in preventing obstetrical complications. *Fertil. Steril.*, 2020, Vol. 113, no. 2, pp. 252-257.
10. Viotti M., Victor A.R., Barnes F.L., Zouves C.G., Besser A.G., Grifo J.A., Cheng E.H., Lee M.S., Horcajadas J.A., Corti L., Fiorentino F., Spinella F., Minasi M.G., Greco E., Munné S. Using outcome data from one thousand

mosaic embryo transfers to formulate an embryo ranking system for clinical use. *Fertil Steril.*, 2021, Vol. 115, no. 5, pp. 1212-1224.

11. Vitagliano A., Paffoni A., Viganò P. Does maternal age affect assisted reproduction technology success rates after euploid embryo transfer? A systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.*, 2023, Vol. 120, no. 2, pp. 251-265.

---

**Авторы:**

**Лысенко О.В.** — д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии УО «Витебский государственный медицинский университет»; врач — акушер-гинеколог, репродуктолог, Центр семейного здоровья «БИНА», г. Витебск, Республика Беларусь

**Бресский А.Г.** — к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

**Огризко И.Н.** — к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

---

**Authors:**

**Lysenko O.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Vitebsk State Medical University; Obstetrician-Gynecologist, Reproductologist, Family Health Center “BINA”, Vitebsk, Republic of Belarus

**Bresski A.G.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology of the Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

**Ogryzko I.N.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology of the Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

---

Поступила 26.03.2024  
Отправлена на доработку 06.04.2024  
Принята к печати 09.04.2024

---

Received 26.03.2024  
Revision received 06.04.2024  
Accepted 09.04.2024



# ТРАНСФУЗИЯ АЛЛОГЕННОЙ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТАМ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ: АНАЛИЗ БЕЗОПАСНОСТИ И ВЛИЯНИЕ НА ИММУНОФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В РАННИЙ ПЕРИОД

Тюмина О.В.<sup>1,2</sup>, Давыдкин И.Л.<sup>2</sup>, Гриценко Т.А.<sup>2</sup>, Трусова Л.М.<sup>1</sup>,  
Тюмин И.В.<sup>1,3</sup>, Богуш В.В.<sup>2</sup>, Соколова В.В.<sup>2</sup>, Гусарова Е.А.<sup>2</sup>,  
Чибашова А.В.<sup>2</sup>, Лимарева Л.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия», г. Самара, Россия

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

<sup>3</sup> Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

**Резюме.** Тяжелые иммунные дисфункции имеют место у большинства онкологических пациентов. Одним из методов преодоления иммунных нарушений является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток периферической крови как аутологичных, так и аллогенных, трансфузии аллогенных натуральных киллерных клеток (НК-клеток). Пуповинная кровь является известным источником не только гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), но также и НК-клеток, характеризуется быстрой доступностью образцов крови из публичных банков пуповинной крови. Цель исследования – проанализировать безопасность одновременной трансфузии трех концентратов ГСК аллогенной пуповинной крови пациентам с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой в ранний период – 7 дней после введения, а также изучить реакцию субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов на данное вмешательство.

В пилотное исследование включено 10 пациентов (7 мужчин и 3 женщин) с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой, ранее получивших более 3 линий терапии. Возраст пациентов – 59,4±3,4 года, всем проводилась однократная трансфузия трех аллогенных образцов концентрата ГСК пуповинной крови со средней дозой лейкоцитов 60,50±8,2 × 10<sup>8</sup> (НК-клетки – 4,36±1,2 × 10<sup>8</sup>)

## Адрес для переписки:

Тюмина Ольга Владимировна  
ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр  
«Династия»  
443095, Россия, г. Самара, ул. Ташкентская, 159.  
Тел.: 8 (902) 291-27-88.  
E-mail: centr123@bk.ru

## Address for correspondence:

Olga V. Tyumina  
Samara Regional Medical Center “Dynasty”  
159 Tashkentskaya St  
Samara  
443095 Russian Federation  
Phone: +7 (902) 291-27-88.  
E-mail: centr123@bk.ru

## Образец цитирования:

О.В. Тюмина, И.Л. Давыдкин, Т.А. Гриценко,  
Л.М. Трусова, И.В. Тюмин, В.В. Богуш, В.В. Соколова,  
Е.А. Гусарова, А.В. Чибашова, Л.В. Лимарева  
«Трансфузия аллогенной пуповинной крови пациентам  
с множественной миеломой: Анализ безопасности и  
влияние на иммунофенотип лимфоцитов крови в ранний  
период» // Российский иммунологический журнал, 2024.  
Т. 27, № 2. С. 299-306.  
doi: 10.46235/1028-7221-16866-TOA

© Тюмина О.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

O.V. Tyumina, T.A. Gritsenko, I.L. Davydkin, L.M. Trusova,  
I.V. Tyumin, V.V. Bogush, V.V. Sokolova, E.A. Gusarova,  
A.V. Chibashova, L.V. Limareva “Transfusion of allogenic cord  
blood to patients with multiple myeloma: safety analysis and  
influence on the immunophenotype of blood lymphocytes in  
the early period”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 299-306.  
doi: 10.46235/1028-7221-16866-TOA

© Tyumina O.V. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16866-TOA

на одного пациента. Всего проведена трансфузия 30 образцов концентрата ГСК пуповинной крови, аллореактивных по KIR-рецепторам по типу рецептор-лиганд. Подбор концентратов ГСК осуществлялся в банке пуповинной крови ГБУЗ «МЦ «Династия». Перед трансфузией концентрата ГСК пуповинной крови пациенты получали циклофосфамид 5 мг/кг. После трансфузии пациенты получали пять подкожных инъекций ИЛ-2 (ронколейкина) в количестве 1 млн ЕД в сутки. Наблюдение на момент оценки предварительных результатов – 7 дней после трансфузии. Анализ иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови пациентов исследовался дважды: в день трансфузии до начала протокола и через 7 дней после трансфузии концентрата ГСК пуповинной крови.

Ранних нежелательных реакций на трансфузии не наблюдалось.

Одновременная трансфузия трех концентратов ГСК аллогенной пуповинной крови пациентам с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой является безопасной процедурой, отсутствуют побочные реакции и серьезные нежелательные явления, а также значимые реакции и изменения иммунофенотипа лимфоцитов пациентов в ранний период наблюдения в течение 7 дней после вмешательства.

*Ключевые слова:* пуповинная кровь, натуральные киллеры, NK-лимфоциты, множественная миелома, безопасность, иммунофенотип

## TRANSFUSION OF ALLOGENIC CORD BLOOD TO PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA: SAFETY ANALYSIS AND INFLUENCE ON THE IMMUNOPHENOTYPE OF BLOOD LYMPHOCYTES IN THE EARLY PERIOD

Tyumina O.V.<sup>a,b</sup>, Gritsenko T.A.<sup>b</sup>, Davydkin I.L.<sup>b</sup>, Trusova L.M.<sup>a</sup>, Tyumin I.V.<sup>c</sup>, Bogush V.V.<sup>b</sup>, Sokolova V.V.<sup>b</sup>, Gusarova E.A.<sup>b</sup>, Chibashova A.V.<sup>b</sup>, Limareva L.V.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Samara Regional Medical Center “Dynasty”, Samara, Russian Federation

<sup>b</sup> Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

<sup>c</sup> A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of the National Medical Research Center for Radiology, Obninsk, Russian Federation

**Abstract.** Severe immune dysfunction occurs in the majority of cancer patients. One of the methods for overcoming immune disorders is transplantation of peripheral blood hematopoietic stem cells, both autologous and allogeneic, and transfusion of allogeneic natural killer cells (NK cells). Umbilical cord blood is a known source of not only hematopoietic stem cells (HSCs) but also NK cells, characterized by the rapid availability of blood samples from public cord blood banks. Purpose of the study: to analyze the safety of simultaneous transfusion of three allogeneic cord blood to patients with relapsed/refractory multiple myeloma in the early period (7 days after administration), and also to study the response of subpopulations of peripheral blood lymphocytes of patients to this intervention.

The pilot study included 10 patients (7 men and 3 women) with relapsed/refractory multiple myeloma who had previously received more than 3 lines of therapy. The age of the patients was  $59.4 \pm 3.4$  years; all of them received a single transfusion of three allogeneic samples of umbilical cord blood with an average dose of leukocytes of  $60.50 \pm 8.2 \times 10^8$  (NK cells –  $4.36 \pm 1.2 \times 10^8$ ) per one patient. A total of 30 samples of umbilical cord blood, alloreactive for KIR receptors of the receptor-ligand type, were transfused. The selection of HSCs concentrates was carried out in the umbilical cord blood bank of the Dynasty Medical Center. Before transfusion of umbilical cord blood, patients received cyclophosphamide 5 mg/kg. After transfusion, patients received five subcutaneous injections of IL-2 (roncoleukin) in the amount of 1 million units per day. Observation at the time of assessment of preliminary results: 7 days after transfusion. Analysis of the immunophenotype of patient lymphocytes was studied twice: on the day of transfusion before the start of the protocol and 7 days after transfusion of umbilical cord blood.

No early adverse reactions to transfusions were observed.

Simultaneous transfusion of three allogeneic cord blood to patients with relapsed/refractory multiple myeloma is a safe procedure. There are no adverse reactions, serious adverse events, or significant reactions/changes in the immunophenotype of patient lymphocytes in the early observation period within 7 days after the intervention.

*Keywords: cord blood, natural killer cells, NK lymphocytes, multiple myeloma, safety, immunophenotype*

## Введение

Тяжелые иммунные дисфункции имеют место у большинства онкологических пациентов. Одним из методов преодоления иммунных нарушений является трансплантация ГСК периферической крови как аутологичных, так и аллогенных, трансфузии аллогенных натуральных киллерных клеток (НК-клеток). Пуповинная кровь является известным источником не только ГСК, но также и НК-клеток, характеризуется быстрой доступностью образцов крови из публичных банков пуповинной крови [1, 10, 12].

НК-клетки опосредуют индуцирование антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности, но также обладают естественной цитотоксичностью, которая опосредована вовлечением их естественных рецепторов цитотоксичности. Они играют центральную роль в запуске активации НК [8, 9]. Онкогематологические больные обладают противоопухолевыми НК-клетками, которые не способны контролировать заболевание [2, 11]. Примечательно, что опухолевые клетки используют различные механизмы иммунного ускользания, например индуцируя дисфункцию НК-клеток [2]. Этот механизм также наблюдался у множества пациентов с солидными опухолями [7]. Таким образом, недостаточная эффективность терапии мноклональными антителами в монотерапии может быть связана с нарушением функции НК-клеток. Следовательно, существует клинический интерес к реактивации или замене НК-клеток пациента [13]. Трансфузия аллогенных НК-клеток на клиническом уровне эффективна, а НК-опосредованная терапия после трансплантации ГСК представляется безопасной [8, 9, 10, 11]. Несмотря на высокий цитолитический потенциал НК-клеток против различных опухолей, клинические результаты были весьма ограничены [13].

Дисфункция НК-клеток играет важную роль в патогенезе множественной миеломы (ММ), поэтому применение трансфузии концентратов ГСК аллогенной пуповинной крови, богатой НК-клетками, является важной областью исследования [4, 13].

Цель исследования, представленного в данной статье, – проанализировать безопасность одновременной трансфузии трех концентратов ГСК аллогенной пуповинной крови пациентам с рецидивирующей/рефрактерной ММ в ранний период – 7 дней после введения, а также изучить реакцию субпопуляцию лимфоцитов периферической крови пациентов на данное вмешательство.

## Материалы и методы

Данное исследование проведено по проекту «Приоритет 2030», протокол исследования утвержден экспертным Советом СамГМУ и одобрен этическим комитетом СамГМУ (протокол № 260 от 01.03.2023). Клиническая база исследования – отделения гематологии и химиотерапии 1 и 2 Клиник Самарского государственного медицинского университета (СамГМУ).

Исследование иммунофенотипа лимфоцитов крови пациентов проводилось в лаборатории проточной цитометрии Клиник СамГМУ. Исследование иммунофенотипа образцов пуповинной крови (ПК) проводилось в иммунологической лаборатории ГБУЗ «МЦ «Династия»».

В исследование включено 10 пациентов (7 мужчин и 3 женщин) с подтвержденной рецидивирующей/рефрактерной ММ в соответствии с Национальными клиническими рекомендациями, ранее получивших более 3 линий терапии. Возраст пациентов –  $59,4 \pm 3,4$  года. Всем пациентам проводилась однократная трансфузия трех аллогенных образцов концентрата ГСК пуповинной крови со средней дозой лейкоцитов  $60,50 \pm 8,2 \times 10^8$  (НК-клеток  $4,36 \pm 1,2 \times 10^8$ ) на одного пациента. Всего проведена трансфузия 30 образцов концентрата ГСК пуповинной крови медленно внутривенно струйно после разморозки у постели больного без отмывки от диметилсульфоксида, и проведения биологической пробы. Проводилась оценка ранних нежелательных реакций после трансфузии.

Анализ иммунофенотипа лимфоцитов пациентов исследовался дважды: в день трансфузии до начала протокола и через 7 дней после трансфузии концентрата ГСК ПК. Проведение иден-

тификации специфических рецепторов на поверхности лейкоцитов и ГСК пуповинной крови происходило после проведения процессинга пуповинной крови, т. е. получения концентрата ГСК перед криозаморозкой образцов. Образцы пуповинной крови и периферической крови пациентов были проанализированы с помощью метода проточной цитометрии на цитофлуориметре BDFACS Canto™ II (США), реагенты Vecton Dickinson and Company (США), программное обеспечение – BD FACSDiva, v. 9.0.1.

Процент исследуемой популяции клеток определялся методом проточной цитофлуориметрии из общего количества лейкоцитов, по экспрессии мембранных маркеров (кластеров CD-дифференцировки) в реакции прямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител. Серия моноклональных антител использовалась для определения уровней экспрессии стандартных рецепторов иммунного статуса (CD3, CD4, CD8, CD19, CD14, CD45, CD34, CD19/CD3, CD4/CD3, CD8/CD3, CD16/56/CD3, CD45/CD14, CD45/CD3/CD56/CD16).

Все образцы пуповинной крови подбирали по совместимости с пациентом по HLA-системе не менее 3 локусов из 6, а также по KIR-рецепторам по принципу аллореактивности к пациенту по типу рецептор-лиганд. Молекулярно-генетическое типирование генов KIR образцов пуповинной крови проводили методом полимеразной цепной реакции [15] с использованием специфичных для последовательности праймеров с последующей визуализацией амплифицированного продукта в агарозном геле. Амплификацию проводили на приборе Veriti (Applied Biosystems, США), продукты ПЦР визуализировали с помощью набора для приготовления 2,3% агарозного геля (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и системы визуализации геля DigiDoc-IT (UVP, Германия).

Анализ проводили для 16 генов и псевдогенов KIR: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1, 3DL2, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DS1, 2DP1, 3DL3, 2DL4, 2DL5, 3DP1.

Отбор концентрата ГСК пуповинной крови проводился в банке пуповинной крови государственного медицинского центра Самарской области «Династия». Заготовка пуповинной крови проводилась после подписания добровольного информированного согласия матери во время физиологических родов при отсутствии противопоказаний, с последующим выделением концентрата ГСК из пуповинной крови, HLA-типированием по шести основным локусам и

анализом KIR-рецепторов на лимфоцитах в лаборатории ГБУЗ «МЦ «Династия».

Перед трансфузией концентрата ГСК пуповинной крови пациенты получали циклофосфамид 5 мг/кг. Целью данной химиотерапии было снижение количества лимфоцитов в организме и повышение эффективности введения НК-клеток; введение НК-клеток сопровождалось подкожными инъекциями ИЛ-2 (ронколейкина ООО «НПК "Биотех"», Россия) в количестве 1 млн ЕД в сутки. ИЛ-2 является иммуномодулятором, стимулирующим активность НК-клеток и усиливающим противоопухолевую активность.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью компьютерной программы IBM SPSS Statistics 21. Использовались параметрические и непараметрические критерии. Для качественных признаков использовался тест хи-квадрат Пирсона с поправкой на непрерывность. Различия между группами исследования считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Серьезных опасных для жизни ранних пост-трансфузионных осложнений после трансфузии одновременно трех аллогенных концентратов ГСК пуповинной крови в первые 24 часа и в течение первых 7 дней после окончания лечения не наблюдалось. Ранние побочные эффекты имели место у 2 из 10 пациентов в виде дрожи в теле и повышенной тревожности без повышения температуры тела. Аллергических реакций, включая острую реакцию «трансплантат против хозяина» на введение ГСК, также не наблюдалось.

Иммунологическая характеристика концентрата лейкоцитов пуповинной крови после выделения концентрата ГСК ПК представлена в таблице 1.

Количество клеток с фенотипом CD34<sup>+</sup> в концентратах ГСК оценивали по следующим критериям: процентному содержанию от общего количества лимфоцитов ( $0,79 \pm 0,15\%$ ) и абсолютному количеству в 25 мл концентратов ГСК ( $3,15 \pm 1,3 \times 10^6$  клеток в мл). Важной особенностью концентрата ГСК является количество естественных клеток-киллеров (НК-клеток – CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), абсолютное число которых составляет  $1,46 \pm 0,5 \times 10^8$  в концентрате ГСК и  $25,6 \pm 0,33\%$  от всех лимфоцитов. Каждому пациенту проведена трансфузия одновременно трех концентратов ГСК пуповинной крови, т. е.  $4,36 \pm 1,2 \times 10^8$  НК-клеток.

Характеристика гетерогенности натуральных киллерных клеток концентрата ГСК пуповинной

**ТАБЛИЦА 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕЙКОЦИТОВ КОНЦЕНТРАТА ГСК ПУПОВИННОЙ КРОВИ (% ОТ ВСЕХ ЛЕЙКОЦИТОВ)**

TABLE 1. IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF LEUKOCYTES OF UMBILICAL CORD BLOOD HSC CONCENTRATE (% OF ALL LEUKOCYTES)

Наименование показателя Name of the indicator	CD3	CD19	CD4	CD3/CD4	CD8	CD3/CD8	CD45/ CD14
Количество наблюдений Number of observations	30	30	30	30	30	30	30
Среднее значение Average value	22,01	8,21	9,15	15,33	3,21	5,43	9,14
Стандартная ошибка среднего Standard error of the mean	1,76	0,3,6	0,39	0,86	0,22	0,33	0,82
Минимальное значение Minimum value	8,21	2,4	3,98	4,88	0,71	2,02	2,21
Максимальное значение Maximum value	44,25	12,4	27,41	33,56	8,64	18,73	23,97

**ТАБЛИЦА 2. АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ НК-ЛИМФОЦИТОВ КОНЦЕНТРАТА ГСК ПУПОВИННОЙ КРОВИ**

TABLE 2. ANALYSIS OF HETEROGENEITY OF NK LYMPHOCYTES OF UMBILICAL CORD BLOOD HSC CONCENTRATE

Имунофенотип Immunophenotype (n = 30)	Количество (%) Quantity (%)
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>-</sup> /CD56 <sup>+</sup>	21,03
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	17,69
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	13,53
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>dim</sup> /CD16 <sup>dim</sup>	45,15
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>dim</sup> /CD16 <sup>bright</sup>	0,27
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>	1,33
CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>-</sup>	0,99

крови в пересчете на лейкоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) перед криозаморозкой представлена в таблице 2.

Мощный цитотоксический потенциал активированных НК-клеток пуповинной крови против различных злокачественных опухолей был ранее описан многими авторами в исследованиях *in vitro* и *in vivo* и зависит от количества введенных НК-клеток, поэтому применяют протоколы наращивания количества НК-клеток [7, 12, 13, 14]. В нашем исследовании мы применили сразу трансфузию трех концентратов ГСК пуповинной крови с целью увеличения общего количества введенных НК-клеток для большего цитотоксического потенциала.

Через 7 дней после трансфузии концентрата ГСК пуповинной крови у пациентов в периферической крови не наблюдалось увеличения абсолютного количества лейкоцитов (до  $5,29 \pm 0,53 \times 10^9$  л после  $4,52 \pm 0,61 \times 10^9$  л), лимфоцитов, субпопуляции Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов, активированных лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>), а также натуральных киллерных клеток (NK) и TNK по сравнению с показателями до начала протокола (табл. 3).

Преимущество протоколов с использованием концентрата ГСК пуповинной крови заключается в том, что НК-клетки пуповинной крови с меньшей вероятностью вызовут клинические

**ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТ ОЦЕНКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ**

TABLE 3. RESULT OF ASSESSING THE PARAMETERS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS OF PATIENTS

Показатели субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов Indicators of peripheral blood lymphocyte subpopulations of patients (n = 10)		До лечения Before treatment (M±m)	Через 7 дней In 7 days (M±m)	p-value
CD3 <sup>+</sup>	%	88,51	90,27	
	абс. значение, × 10 <sup>9</sup> /л abs. value, × 10 <sup>9</sup> /L	1,11±0,13	1,23±0,12	> 0,05
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	%	47,03	42,2	
	абс. значение, × 10 <sup>9</sup> /л abs. value, × 10 <sup>9</sup> /L	0,55±0,07	0,55±0,06	> 0,05
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	%	40,86	47,53	
	абс. значение, × 10 <sup>9</sup> /л abs. value, × 10 <sup>9</sup> /L	0,55±0,10	0,66±0,20	> 0,05
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	%	13,95	18,68	
	абс. значение, × 10 <sup>9</sup> /л abs. value, × 10 <sup>9</sup> /L	0,16±0,05	0,22±0,12	> 0,05
CD19 <sup>+</sup>	%	2,18	2,37	
	абс. значение, × 10 <sup>9</sup> /л abs. value, × 10 <sup>9</sup> /L	0,03±0,01	0,03±0,01	> 0,05
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> (NK)	%	5,92	5,55	
	абс. значение, × 10 <sup>9</sup> /л abs. value, × 10 <sup>9</sup> /L	0,07±0,04	0,07±0,04	> 0,05
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> (TNK)	%	20,74	20,28	
	абс. значение, × 10 <sup>9</sup> /л abs. value, × 10 <sup>9</sup> /L	0,25±0,04	0,25±0,04	> 0,05

проблемы, характерные для CAR-T-клеток, и некоторые хронические эффекты, связанные с их длительной персистенцией [13]. Одной из основных проблем при использовании аллогенных иммунных клеток является возникновение реакций «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Аллогенная трансфузия НК-клеток хорошо переносится онкологическими пациентами; известно, что приживление НК-клеток ассоциируется с РТПХ только в сочетании с HLA-совместимой, обедненной Т-клетками трансплантацией стволовых клеток периферической крови [12, 13].

В нашем исследовании аллергические реакции и острая РТПХ не развивались, все трансфузии переносились пациентами без осложнений, значимых реакций и изменений иммунофенотипа лимфоцитов у пациентов в ранний период в течение 7 дней не наблюдались.

## Заключение

Одновременная трансфузия трех концентратов ГСК аллогенной пуповинной крови пациентам с рецидивирующей/рефрактерной ММ является безопасной процедурой, отсутствуют побочные реакции и серьезные нежелательные явления, а также значимые реакции и изменения иммунофенотипа лимфоцитов пациентов в ранний период наблюдения в течение 7 дней после вмешательства.

Необходимо продолжить наблюдение за пациентами в течение 12 месяцев для дальнейшей оценки безопасности и эффективности проведенного лечения.

## Благодарности

Авторы выражают свою признательность: ректору ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России профессору Колсанову А.В. за поддержку и возможность работы над проектом.

## Список литературы / References

1. Тюмина О.В., Волчков С.Е., Овчинников П.А. Применение гематопоэтических стволовых клеток пуповинной крови // Гены и Клетки, 2019. Т. 14, № 3. С. 236-237. [Tyumina O.V., Volchkov S.E., Ovchinnikov P.A. Application of cord blood hematopoietic stem cells. *Geny I Kletki = Genes and Cells*, 2019, Vol. 14, no. 3, pp. 236-237. (In Russ.)]
2. Boussiotis V. Molecular and biochemical aspects of the PD-1checkpoint path. *New Eng. J. Med.*, 2016, Vol. 375, pp. 1767-1778.
3. Clara J.A., Childs R.W. Harnessing natural killer cells for the treatment of multiple myeloma. *Semin. Oncol.*, 2022, Vol. 49, no. 1, pp. 69-85.
4. Dalle J.H., Menezes J., Wagner E., Blagdon M., Champagne J., Champagne M.A., Duval M. Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr. Res.*, 2005, Vol. 57, pp. 649-655.
5. Damele L., Spaggiari G.M., Parodi M., Mingari M.C., Vitale M., Vitale C. Cord blood-derived natural killer cell exploitation in immunotherapy protocols: more than a promise? *Cancers*, 2022, Vol. 14, 4439. doi: 10.3390/cancers14184439.
6. Escobedo-Cousin M., Jackson N., Laza-Briviesca R., Ariza-McNaughton L., Luevano M., Derniame S., Querol S., Blundell M., Thrasher A., Soria B., Cooper N., Bonnet D., Madrigal A., Saudemont A. Natural killer cells improve hematopoietic stem cell engraftment by increasing stem cell clonogenicity *in vitro* and in a humanized mouse model. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, 0138623. doi: 10.1371/journal.pone.0138623.
7. Mehta R.S., Randolph B., Daher M., Rezvani K. NK cell therapy for hematologic malignancies. *Int. J. Hematol.*, 2018, Vol. 107, no. 3, pp. 262-270.
8. Morvan M., Lanier L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat. Rev. Cancer*, 2016, Vol. 16, pp. 7-19.
9. Miller J.S., Soignier Y., Panoskaltis-Mortari A., McNearney S.A., Yun G.H., Fautsch S.K., McKenna D., Le C., Defor T.E., Burns L.J., Orchard P.J., Blazar B.R., Wagner J.E., Slungaard A., Weisdorf D.J., Okazaki I.J., McClave P.B. Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 8, pp. 3051-3057.
10. Romee R., Rosario M., Berrien-Elliott M.M., Wagner J.A., Jewell B.A., Schappe T., Leong J.W., Abdel-Latif S., Schneider S.E., Willey S., Neal C.C., Yu L., Oh S.T., Lee Y.-S., Mulder A., Claas F., Cooper M.A., Fehniger T.A. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci. Transl. Med.*, 2016, Vol. 8, 357ra123. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf2341.
11. Rubnitz J.E., Inaba H., Ribeiro R.C., Pounds S., Rooney B., Bell T., Pui C.-H., Leung W. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 2010, Vol. 28, pp. 955-959.
12. Sarvaria A., Jawdat D., Madrigal J.A., Saudemont A. Umbilical cord blood natural killer cells, their characteristics, and potential clinical applications. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 329. doi: 10.3389/fimmu.2017.00329.
13. Sánchez-Martínez D., Allende-Vega N., Orecchioni S., Talarico G., Cornillon A., Vo D., Rene C., Lu Z.-Y., Krzywinska E., Anel A. Expansion of allogeneic NK cells with efficient antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors. *Theranostics*, 2018, Vol. 8, no. 14, pp. 3856-3869.
14. Verneris M.R., Mille J.S. The Phenotypic and Functional Characteristics of Umbilical Cord Blood and Peripheral Blood Natural Killer Cell. *Br. J. Haematol.*, 2009, Vol. 147, no. 2, pp. 185-191.

---

### Авторы:

**Тюмина О.В.** — д.м.н., директор ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия»»; профессор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

**Давыдкин И.Л.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой и клиникой госпитальной терапии с курсом поликлинической терапии и трансфузиологии, проректор по научной работе ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

### Authors:

**Tyumina O.V.**, PhD, MD (Medicine), Director, Samara Regional Medical Center "Dynasty"; Professor of the Department of Hospital Therapy, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

**Davydkin I.L.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Hospital Therapy with Courses of Polyclinic Therapy and Transfusiology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

**Гриценко Т.А.** — к.м.н., заместитель директора НИИ гематологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

**Трусова Л.М.** — заведующая лабораторией иммунологического типирования ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия»», г. Самара, Россия

**Тюмин И.В.** — аспирант отделения клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск; врач-онколог ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия»», г. Самара, Россия

**Богущ В.В.** — биолог клинко-диагностической лаборатории клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

**Соколова В.В.** — студент ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

**Гусарова Е.А.** — студент ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

**Чибашова А.В.** — ассистент кафедры госпитальной терапии с курсом поликлинической терапии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

**Лимарева Л.В.** — д.б.н., профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

**Gritsenko T.A.**, PhD (Medicine), Deputy Director, Research Institute of Hematology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

**Trusova L.M.**, Head, Department of Immunology, Samara Regional Medical Center “Dynasty”, Samara, Russian Federation

**Tyumin I.V.**, Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of the National Medical Research Center for Radiology, Obninsk; Oncologist, Samara Regional Medical Center “Dynasty”, Samara, Russian Federation

**Bogush V.V.**, Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory of the clinics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

**Sokolova V.V.**, Student, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

**Gusarova E.A.**, Student, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

**Chibashova A.V.**, Assistant Professor, Department of Hospital Therapy with a Course of Outpatient Therapy and Transfusiology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

**Limareva L.V.**, PhD, MD (Biology), Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology Head of the Immunological Laboratory of the Clinics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Поступила 01.04.2024  
Отправлена на доработку 03.04.2024  
Принята к печати 04.04.2024

Received 01.04.2024  
Revision received 03.04.2024  
Accepted 04.04.2024



# ПЛЕЙОТРОПНОСТЬ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ВЛИЯНИЙ СИНТЕТИЧЕСКОГО ТИМИЧЕСКОГО ГЕКСАПЕПТИДА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН

Нестерова И.В.<sup>1,2</sup>, Ковалева С.В.<sup>1</sup>, Пиктурно С.Н.<sup>1</sup>, Чулкова А.М.<sup>1</sup>,  
Куранова Н.Н.<sup>1</sup>, Пирогова А.И.<sup>1</sup>, Поезжаев Е.А.<sup>1</sup>

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

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

**Резюме.** Причиной затяжного течения и частого рецидивирования хронических инфекционно-воспалительных заболеваний генитального тракта (ХИВЗГТ) является дефектное функционирование иммунной системы, что диктует необходимость поиска эффективных иммунотерапевтических подходов. Цель: уточнить особенности функционирования иммунной системы, системы интерферонов, профиля про- и противовоспалительных цитокинов в период обострения ХИВЗГТ у женщин и на этой основе разработать таргетную иммуномодулирующую терапию с использованием гексапептида с оценкой ее клинико-иммунологической эффективности. Исследуемые иммунокомпromетированные женщины 20-40 лет с обострением ХИВЗГТ по терапевтической тактике были разделены на 4 группы исследования (ГИ): ГИ1 (n = 22) и ГИ2 (n = 70) до лечения; ГИ1а – ГИ1, получавшая стандартную терапию; ГИ2а – ГИ2, получавшая стандартную терапию и гексапептид (ГП, Имунфан®). Группа сравнения (ГС) – 20 условно здоровых женщин. Определяли параметры клеточного и гуморального иммунитета, уровни сывороточных интерферонов, цитокинов. При обострении ХИВЗГТ выявлено снижение IFN $\alpha$  в обеих группах и IFN $\gamma$ , более выраженное в ГИ1. В ГИ1 были увеличены уровни двух системных провоспалительных цитокинов, IL-6 и TNF $\alpha$  и снижен уровень нейтрофил-ассоциированного цитокина IL-8. В ГИ2 был повышен уровень провоспалительного ци-

## Адрес для переписки:

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

## Address for correspondence:

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

## Образец цитирования:

И.В. Нестерова, С.В. Ковалева, С.Н. Пиктурно,  
А.М. Чулкова, Н.Н. Куранова, А.И. Пирогова,  
Е.А. Поезжаев «Плейотропность  
иммуномодулирующих влияний синтетического  
тимического гексапептида при хронических  
инфекционно-воспалительных заболеваниях  
генитального тракта у иммунокомпromетированных  
женщин» // Российский иммунологический журнал,  
2024. Т. 27, № 2. С. 307-316.  
doi: 10.46235/1028-7221-16740-POI

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

## For citation:

I.V. Nesterova, S.V. Kovaleva, S.N. Pikturno, A.M. Chulkova,  
N.N. Kuranova, A.I. Pirogova, E.A. Poezhaev "Pleiotropicity  
of immunomodulating effects of synthetic thymic hexapeptide  
in chronic infectious and inflammatory diseases of the genital  
tract in immunocompromized women", Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024,  
Vol. 27, no. 2, pp. 307-316.  
doi: 10.46235/1028-7221-16740-POI

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16740-POI

токаина IL-6. Отмечено повышение противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 в обеих группах. На фоне дефицита IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  и дисбаланса цитокинов в обеих группах исследования наблюдалось значимое снижение Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>, Т-хелперов CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, В-лимфоцитов CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>. После проведения стандартного лечения (ГИ1а) не отмечалось восстановления IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$ . Из противовоспалительных цитокинов снижался только TNF $\alpha$ , а уровни IL-1 $\beta$ , IL-6 были повышены к окончанию лечения, при этом отсутствовал компенсаторный рост противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10), что также не сопровождалось восстановлением клеточного и гуморального иммунитета. Полученные результаты создают предпосылки для поддержания хронического воспаления с возникновением обострения ХИВЗГТ уже через 3 месяца после лечения. После комплексного лечения с включением фГП (ГИ2а) IFN $\alpha$  восстанавливался в 50% случаев. Показано снижение ранее повышенных IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  на фоне отсутствия значимых изменений уровней нейтрофил-ассоциированных цитокинов IL-8 и IL-18. Разрешение воспаления сопровождалось ростом противовоспалительного цитокина IL-10. Модулирующий эффект влияния фГП на интерфероны и цитокины способствовал восстановлению Т-клеточного и гуморального иммунитета, что тесно взаимосвязано с наступлением клинической ремиссии ХИВЗГТ в более ранние сроки и увеличением длительности межрецидивного периода. Позитивная клинико-иммунологическая эффективность включения в комплексное лечение иммунокомпрометированных женщин с обострением ХИВЗГТ таргетной иммуномодулирующей терапии Имунфаном® обусловлена его плеiotропными эффектами влияния, что дает существенные преимущества по сравнению с использованием только стандартной терапии.

*Ключевые слова:* хронические воспалительные заболевания генитального тракта, иммунокомпрометированность, иммунотерапия, гексапептид, цитокины, интерфероны

## PLEIOTROPICITY OF IMMUNOMODULATING EFFECTS OF SYNTHETIC THYMIC HEXAPEPTIDE IN CHRONIC INFECTIOUS AND INFLAMMATORY DISEASES OF THE GENITAL TRACT IN IMMUNOCOMPROMIZED WOMEN

Nesterova I.V.<sup>a,b</sup>, Kovaleva S.V.<sup>a</sup>, Pikturno S.N.<sup>a</sup>, Chulkova A.M.<sup>a</sup>,  
Kuranova N.N.<sup>a</sup>, Pirogova A.I.<sup>a</sup>, Poezzhaev E.A.<sup>a</sup>

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

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

**Abstract.** A reason for a protracted course and frequent recurrence of pelvic inflammatory diseases (PID) is dysfunction of the immune system, which dictates the need of effective immunotherapeutic approaches. Objective: to clarify the features of immune system functioning, the interferon system, the profile of cytokines during the period of exacerbation of PID in women; to develop targeted immunotherapy using hexapeptide with assessment of its effectiveness. The studied immunocompromised women 20-40 years old with exacerbation of PID were divided into study groups (SG): SG1 (n = 22), SG2 (n = 70) before treatment; SG1a, SG1 receiving standard therapy; SG2a, SG2, receiving standard therapy and hexapeptide (HP, Imunofan®). The parameters of cellular and humoral immunity, levels of serum interferons, cytokines were determined. During exacerbation of PID, a decrease in IFN $\alpha$  was in both groups and IFN $\gamma$ , more pronounced in SG1. In SG1, the levels of IL-6, TNF $\alpha$  were increased, the level of IL-8 was decreased. In SG2, the level of IL-6 was increased. An increase in IL-4, IL-10 was noted in both groups. Against the background of IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  deficiency and cytokine imbalance, a significant decrease in T lymphocytes, T helper cells, B lymphocytes was observed in both study groups. After standard treatment, there was no recovery of IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ . Only TNF $\alpha$  decreased, the levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 were increased at the end of treatment, there was no increase in IL-4, IL-10 and restoration of cellular and humoral immunity. It leads to maintaining chronic inflammation and exacerbation of PID within 3 months after treatment. After immunotherapy including fHP, IFN $\alpha$  was restored in 50% cases.

There was a decrease in IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  without significant changes in the levels of IL-8, IL-18. Resolution of inflammation was accompanied by an increase in IL-10. The modulating effect of fHP on interferons and cytokines contributed to the restoration of T cell and humoral immunity, which is related to the onset of clinical remission of PID at an earlier time and an increase in the duration of the inter-relapse period. The positive effectiveness of immunotherapy with Imunofan<sup>®</sup> is due to its pleiotropic effects, which provides significant advantages compared to the use of standard therapy only.

*Keywords: chronic inflammatory diseases of the genital tract, immunocompromise, immunotherapy, hexapeptide, cytokines, interferons*

## Введение

В настоящее время одной из важнейших проблем адаптивной медицинской иммунологии является создание методов интеграционной реабилитации иммунной системы, которые могут быть использованы для восстановления адаптационных возможностей иммунной системы при нетипично протекающих хронических инфекционно-воспалительных заболеваниях, ассоциированных с приобретенными/вторичными иммунодефицитами [7]. В этой связи большой интерес представляет разработка новых иммунотерапевтических подходов к лечению нетипично протекающих хронических инфекционно-воспалительных заболеваний. Эта патология стабильно остается одной из основных в практической гинекологии, ввиду высокой частоты обращений к гинекологу, сложности диагностики и особенностей клинических проявлений, нередко приводящих к нарушению репродуктивных функций [2]. Поддержание хронического нетипично протекающего воспалительного процесса у женщин с хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями генитального тракта (ХИВЗГТ) связано с недостаточной эффективностью формирования адекватного иммунного ответа на инфекционные патогены на фоне вторичного иммунодефицита [6], что ведет к нарушению элиминации и длительной персистенции этиопатогенов. Показано, что у женщин с ХИВЗГТ стандартные этиотропные методы лечения недостаточно эффективны и имеют кратковременность действия. Эти факты свидетельствуют о недостаточной эффективности противоинфекционной иммунной защиты и о невозможности полноценного восстановления адекватного функционирования иммунной системы (ИС) на фоне стандартной терапии. В связи с изложенным определенным интерес представляет разработка новых методов таргетной иммуномодулирующей терапии, которые могли бы быть включены в комплексную терапию женщин с ХИВЗГТ с целью достижения позитивной клинико-иммунологической эффективности. В этой связи определенный

интерес представляет иммунотропный препарат Имунофан<sup>®</sup>, действующей субстанцией которого является синтетический гексапептид аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (ГП). ГП является активным центром гормона тимуса тимопоэтина и обладает не только широким спектром иммунорегуляторных воздействий, но и способностью вызывать инактивацию свободно-радикальных и перекисных соединений, восстанавливать баланс окислительно-антиокислительных реакций при инфекционно-воспалительных заболеваниях, усиливать действие антибактериальных препаратов, проявляя при этом определенный синергизм [4].

**Цель исследования** – уточнить особенности функционирования иммунной системы, системы интерферонов, профиля про- и противовоспалительных цитокинов в период обострения ХИВЗГТ у женщин и на этой основе разработать таргетную иммуномодулирующую терапию с использованием гексапептида с оценкой ее клинико-иммунологической эффективности.

## Материалы и методы

Под нашим наблюдением находились 92 женщины репродуктивного возраста от 20 до 40 лет с ХИВЗГТ в период обострения, поступивших в дневной стационар Клиники ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

В зависимости от клинико-иммунологических особенностей и терапевтической тактики пациентки с обострением ХИВЗГТ были разделены на группы исследования (ГИ): ГИ1 – 22 женщины до лечения; ГИ1а – после лечения женщин ГИ1, получавших традиционную терапию, которая включала антибактериальную, противогрибковую, местную противовоспалительную терапию и витаминотерапию; ГИ2 – 70 женщин до лечения; ГИ2а – после лечения женщин ГИ2, получавших комплексную терапию, включавшую традиционную терапию и иммунотерапию фармпрепаратом на основе ГП (фГП, Имунофан<sup>®</sup>) 45 мкг/мл 1 мл внутримышечно 1 раз в сутки в течение 10 дней (курсовая доза 450 мкг). ГИ2а разделена на груп-

пы ГИ2а.1 и ГИ2а.2 в зависимости от ответа системы интерферонов.

Группу сравнения составили 20 условно здоровых женщин репродуктивного возраста, обратившихся в клинику с целью контрацепции (установка внутриматочной спирали).

Методом проточной цитофлуориметрии (FC500, Beckman Coulter, США) с соответствующими МКАТ Beckman Coulter International S.A. (Франция) проведено иммунофенотипирование Т- и В-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>), естественных киллерных клеток (ЕКК – CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) периферической крови (ПК), рассчитан иммунорегуляторный индекс (ИРИ – CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). Методом ИФА определяли уровни сывороточных IgA, IgM, IgG, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , цитокинов – IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-18, IL-4, IL-10 (тест-системы АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия). При проведении статистического анализа использовали непараметрические статистические критерии Вилкоксона и Манна–Уитни. (программы Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2010). Результаты представляли в виде медианы (верхний и нижний квартиль) – Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Статистически значимые различия определяли при p < 0,05.

## Результаты и обсуждение

ХИВЗГТ у исследуемых женщин характеризовались длительным анамнезом заболевания (более 5 лет), частыми обострениями (3 и более раз в год) или вялотекущим затяжным течением обострений, отсутствием стойкого клинического эффекта при использовании традиционной системной и местной противовоспалительной терапии. Клиническое течение ХИВЗГТ позволяет

отнести данных женщин к иммунокомпрометированным [5].

При изучении данных анамнеза у женщин ГИ1 в 31,8% и женщин ГИ2 в 35,7% были выявлены дополнительные критериальные признаки иммунокомпрометированности [3]: наличие в анамнезе микст-герпесвирусных инфекций – ГВИ (ВПГ I и II типов инфекции, генитальной и орофациальной локализации с частотой обострений до 5-6 раз в год), ВПЧ-инфекции (кондиломы аногенитальной области), рекуррентные ОРВИ (6-8 и более раз в год).

При оценке интерферонового статуса у женщин ГИ1 в период обострения ХИВЗГТ было выявлено снижение уровня IFN $\alpha$  в 9,5 раза до 1,2 (0,95-2,2) пг/мл против 11,4 (8,3-11,4) пг/мл в ГС (p < 0,05) и незначительное уменьшение IFN $\gamma$  относительно показателей ГС (p < 0,05) (табл. 1).

В ГИ2 уровень IFN $\alpha$  был в 38 раз ниже уровня отмечаемого в ГС- 0,3 (0,3-1,3) пг/мл против 11,4 (8,3-11,4) пг/мл в ГС (p < 0,05) и в 4 раза ниже значений в ГИ1. При этом уровень IFN $\gamma$  статистически значимо не отличался от показателей ГС (p > 0,05) (табл. 1).

Выявленное снижение IFN $\alpha$ , наиболее выраженное в ГИ2, у исследуемых иммунокомпрометированных женщин с ХИВЗГТ и неадекватные для обострения воспалительного процесса уровни IFN $\gamma$  как в ГИ1 [1], так и ГИ2 свидетельствуют о дефектности системы интерферонов, нарушении противовирусных иммунных механизмов, что ассоциировано с персистирующей вирусной инфекцией, а также дисрегуляторными нарушениями, препятствующими полноценному взаимодействию иммунокомпетентных клеток в иммунном ответе на патогены.

**ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ СЫВОРОТОЧНЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ IFN $\alpha$  И IFN $\gamma$  ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН В ПЕРИОД ОБОСТРЕНИЯ ХИВЗГТ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. SERUM INTERFERON LEVELS OF IFN $\alpha$  AND IFN $\gamma$  IN IMMUNOCOMPROMISED WOMEN DURING THE PERIOD OF EXACERBATION OF PID DURING TREATMENT, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

	ГС CG	ГИ1 SG1	ГИ2 SG2	ГИ1а SG1а	ГИ2а SG2а
IFN $\alpha$ , пг/мл IFN $\alpha$ , pg/mL	11,4 (8,3-11,4)	1,2 (0,95-2,20)*	0,3 (0,3-1,3)*	1,6 (1,6-4,0)*	ГИ2а.1 – 0,8 (0,6-10,9) SG2а.1 – 0,8 (0,6-10,9) ГИ2а.2 – 15,8 (13,6-20,5) SG2а.2 – 15,8 (13,6-20,5)
IFN $\gamma$ , пг/мл IFN $\gamma$ , pg/mL	12,8 (12,3-3,0)	11,6 (11,2-2,2)*	14,35 (11,95-15,60)	11,4 (11,4-13,5)	12,7 (12,10-14,45)

Примечание. \* – различия показателей ГИ1, ГИ1а, ГИ2, ГИ2а, ГИ2а.1, ГИ2а.2 от показателей ГС (p < 0,05).

Note. \*, differences between the indicators of SG1, SG1а, SG2, SG2, SG2а, SG2а.1, SG2а.2 from the indicators of CG, p < 0.05.

**ТАБЛИЦА 2. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ЖЕНЩИН В ПЕРИОД ОБОСТРЕНИЯ ХИВЗГТ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 2. CYTOKINE PROFILE OF IMMUNOCOMPROMISED WOMEN DURING THE PERIOD OF EXACERBATION OF PID DURING TREATMENT, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

	ГС CG	ГИ1 SG1	ГИ2 SG2	ГИ1а SG1a	ГИ2а SG2a
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	4,3 (2,2-5,5)	5,5 (4,2-7,8)	10,7 (1,9-12,0)	6,7 (6,6-12,7)*	4,1 (2,40-7,45)
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	5,2 (3,3-11,1)	11,6 (11,4-11,9)*	12,3 (11,8-12,7)*	11,3 (11,2-12,5)*	10,4 (1,8-11,0)#
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	6,9 (6,0-7,6)	11,4 (8,0-12,9)*	10,0 (6,3-10,1)	5,8 (5,7-9,8)	5,7 (5,5-6,5)
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	12,0 (9,7-20,7)	6,8 (5,5-7,8)*	6,5 (4,5-9,8)	5,2 (5,1-9,6)*	9,5 (5,8-17,5)
IL-18, пг/мл IL-18, pg/mL	166,4 (128,0-197,9)	175,7 (163,4-180,8)	176,8 (167,8-212,8)	188,2 (188,1-243,8) <sup>§</sup>	234,6 (193,8-238,1)
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	4,9 (4,5-20,1)	18,4 (10,8-35,7)	17,4 (14,3-32,0)	7,7 (7,5-24,4)	5,4 (4,3-20,3)
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	6,9 (5,7-8,7)	8,1 (6,4-8,7)	10,6 (9,5-16,1)* ^	7,7 (7,6-12,8)	18,5 (18,0-21,5)* #

Примечание. \* – различия показателей ГИ1 и ГИ2 от показателей ГС (p < 0,05); ^ – различия показателей ГИ2 от показателей ГИ1 (p < 0,05); § – различия показателей ГИ1а от показателей ГИ1 (p < 0,05); # – различия показателей ГИ2а от показателей ГИ2 (p < 0,05).

Note. \*, differences in GI1 and GI2 indicators from CG indicators (p < 0.05); ^, differences in SG2 indicators from SG1 indicators (p < 0.05); §, differences between SG 1a indicators and SG 1 indicators (p < 0.05); #, differences in SG2a indicators from SG2 indicators (p < 0.05).

Так, у пациенток исследуемых групп отмечалось снижение содержания Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD19, Т-хелперов CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (p<sub>1,2</sub> < 0,05), более выраженное в ГИ2, а количество ЕКК CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> не превышало показателей ГС (рис. 1А, Б).

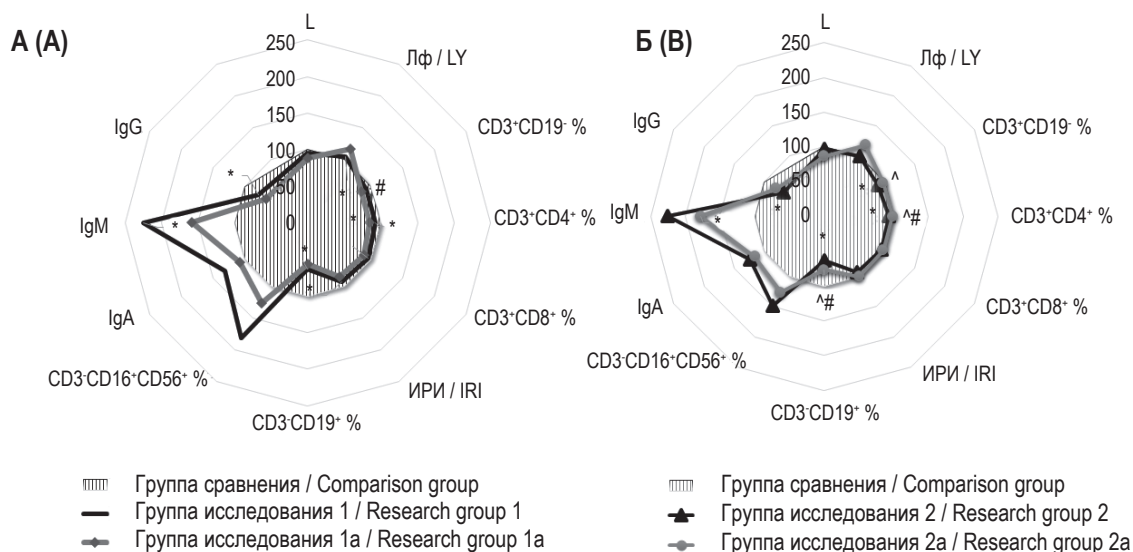
При оценке уровня провоспалительных цитокинов в ГИ1 было выявлено увеличение уровней 2 системных цитокинов, отвечающих за запуск воспалительного процесса: IL-6 в 2,2 раза (11,6 (11,4-11,9) пг/мл против 5,2 (3,3-11,1) пг/мл в ГС) и TNFα в 1,6 раза (11,4 (8,05-12,9) пг/мл против 6,9 (6,0-7,6) пг/мл в ГС (p<sub>1,2</sub> < 0,05). Уровень IL-1β составил 5,5 (4,2-7,8) пг/мл и статистически значимо не отличался от показателей ГС (p > 0,05). При этом было показано снижение уровня нейтрофил-ассоциированного цитокина IL-8 в 1,7 раза до 6,8 (5,5-7,8) пг/мл против 12,0 (9,7-20,7) пг/мл относительно ГС (p < 0,05), а уровень IL-18 – 175,7 (163,4-180,8) пг/мл, не отличался от ГС – 166,4 (128,0-197,9) пг/мл (p > 0,05) (табл. 2).

В ГИ2 был повышен 2,4 раза уровень IL-6 (12,3 (11,8-12,7) пг/мл против 5,2 (3,3-11,1) пг/мл в ГС (p < 0,05), тогда как концентрации других изучаемых цитокинов (IL-1β, TNFα, IL-8, IL-18) статистически значимо не отличались от ГС (p > 0,05) (табл. 2). Низкие концентрации ней-

трофил-ассоциированных цитокинов, вероятно, не обеспечивают полноценного включения НГ в реализацию воспалительного процесса, также ранее нами были выявлены у иммунокомпрометированных женщин с обострением ХИВЗГТ нарушения эффекторных функций НГ [3], что во многом объясняет поддержание и рецидивирование у женщин хронического инфекционно-воспалительного процесса.

Отмечено повышение противовоспалительных цитокинов: IL-4 в ГИ1 в 3,7 раза (p > 0,05), в ГИ2 в 3,5 раза (p > 0,05) и IL-10 в ГИ1 в 1,3 раза (p > 0,05), в ГИ2 в 1,5 раза (p < 0,05) относительно значений в ГС (табл. 2). Однако на этом фоне в обеих группах было зарегистрировано снижение количества В-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> (p<sub>1,2</sub> < 0,05). В ГИ1 и ГИ2 показатели концентрации иммуноглобулинов не отличались от ГС (p<sub>1,3</sub> > 0,05) (табл. 2, рис. 1А, Б).

После проведения стандартного лечения в ГИ1а не отмечалось значимых изменений уровней как IFNα, так и IFNγ. Так, уровень IFNα в ГИ1а составил 1,7 (1,6-4,0) пг/мл по сравнению с 1,2 (0,95-2,2) пг/мл в ГИ1 до лечения (p > 0,05), оставаясь ниже значений ГС – 11,4 (8,3-11,4) пг/мл (p < 0,05). Уровень IFNγ в ГИ1а составил 11,4 (11,4-13,5) пг/мл против 11,6 (11,2-12,2) пг/мл в



**Рисунок 1.** Показатели клеточного и гуморального звена иммунной системы иммунокомпromетированных женщин в период обострения ХИВЗГТ на фоне лечения: А – на фоне курса стандартной терапии; Б – на фоне комплексной терапии, включавшей традиционную терапию и иммунотерапию фармпрепаратом на основе ГП.

**Примечание.** \* – достоверность различий показателей от значений ГС,  $p < 0,05$ ; ^ – достоверность различий показателей до и после лечения: ГИ1а и ГИ2а по отношению к ГИ1 и ГИ2 соответственно;  $p < 0,05$ ; # – достоверность различий показателей ГИ2а от ГИ1а.

Figure 1. Indicators of the cellular and humoral components of the immune system of immunocompromised women during the period of exacerbation of PID during treatment: A, against the background of a course of standard therapy; B, against the background of complex therapy, including traditional therapy and immunotherapy with a pharmaceutical drug based on GP

Note: \*, reliability of differences between indicators and CG values,  $p < 0.05$ ; ^, reliability of differences in indicators before and after treatment: SG1a and SGI2a in relation to SG1 and SG2, respectively;  $p < 0.05$ ; #, reliability of differences between SG2a and SG1a indicators.

ГИ1 и был в пределах ГС – 12,8 (12,3-13,0) пг/мл ( $p > 0,05$ ). Также не было выявлено и позитивных эффектов в отношении Т-лимфоцитарного звена иммунитета, показатели которого не отличались от значений до лечения (рис. 1А).

На фоне комплексного лечения с включением фГП в зависимости от ответа системы интерферонов были выделены 2 группы. В ГИ2а.2 ( $n = 35$ ) было выявлено восстановление уровня  $IFN\alpha$ : отмечалось повышение концентрации  $IFN\alpha$  не только по отношению к показателям до начала лечения – 15,8 (13,6-20,5) пг/мл против 0,3 (0,3-1,3) в ГИ2 ( $p < 0,05$ ), но и по отношению к показателям ГС – 11,4 (8,3-11,4) ( $p < 0,05$ ). В ГИ2а.1 ( $n = 35$ ) отмечалось увеличение  $IFN\alpha$  в 2,7 раза в сравнении с показателями до лечения – 0,8 (0,6-10,9) пг/мл ( $p < 0,05$ ), однако относительно ГС уровень  $IFN\alpha$  оставался низким. При этом уровень  $IFN\gamma$  в ГИ2а составил 12,7 (12,1-14,45) пг/мл и не отличался от показателей до лечения и ГС ( $p_{1-2} > 0,05$ ) (табл. 1). Выявленные эффекты сопровождались восстановлением количества Т-лимфоцитов  $CD3^+CD19^+$ , Т-хелперов  $CD3^+CD4^+$  до значений ГС (рис. 1Б).

При оценке провоспалительных цитокинов иммунокомпromетированных женщин с обострением ХИВЗГТ после проведения стандартной терапии  $TNF\alpha$  – 11,4 (8,0-12,9) пг/мл в ГИ1 снижался после лечения до 5,75 (5,75-9,8), достигая значений уровня ГС – 6,9 (6,0-7,6) пг/мл ( $p > 0,05$ ). Уровень  $IL-8$  не менялся в сравнении со значениями до лечения 6,8 (5,5-7,8) пг/мл и был снижен в 2,3 раза по отношению к ГС – 5,2 (5,1-9,6) пг/мл против 12,0 (9,7-20,7) условно здоровых женщин ( $p < 0,05$ ).  $IL-18$  имел тенденцию к повышению 188,2 (188,1-243,8) пг/мл относительно ГИ1 175,7 (163,4-180,8) пг/мл и ГС 166,4 (128,0-197,9) пг/мл. Другие провоспалительные цитокины  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  после проведения стандартной терапии были повышены, и при этом уровень  $IL-6$  оставался в пределах значений до лечения ( $p_1 > 0,05$ ), а уровень  $IL-1\beta$  увеличивался в 1,6 раза по отношению к показателям до лечения ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Уровни противовоспалительных цитокинов  $IL-4$  и  $IL-10$  не менялись, сохраняясь на значениях до лечения ( $p_{1-2} > 0,05$ ) (табл. 2). Также не было выявлено восстановления показателей, характеризующих гуморальный иммунный от-

вет (В-лимфоцитов CD3-CD19<sup>+</sup>, IgA, IgM, IgG) (рис. 1А).

На фоне комплексной терапии с использованием фГП в группе женщин с обострением ХИВЗГТ (ГИ2) показано снижение уровня IL-1β в 2,6 раза с 10,7 (1,9-12,0) пг/мл до лечения до 4,1 (2,4-7,45) пг/мл по окончании лечения ( $p > 0,05$ ), что соответствует уровню условно здоровых женщин ( $p > 0,05$ ), а также снижение уровня TNFα в 1,8 раза с 10,0 (6,3-10,1) пг/мл в ГИ2 до 5,7 (5,5-6,5) пг/мл в ГИ2а, достигнув показателей ГС ( $p > 0,05$ ). Уровень IL-6 после лечения не менялся относительно ГИ2 10,4 (1,8-11,0) пг/мл против 11,6 (11,4-11,9) пг/мл ( $p < 0,05$ ) и оставался повышенным в 2 раза по отношению к ГС — 5,2 (3,3-11,1) пг/мл ( $p > 0,05$ ). Изменения уровней IL-8 и IL-18 после проведения иммуномодулирующей терапии фГП были незначительные ( $p_{1-2} > 0,05$ ) и оставались в пределах показателей условно здоровых женщин ( $p_{1-2} > 0,05$ ) (табл. 2).

Уровень противовоспалительного цитокина IL-10 в ГИ2а увеличивался до 18,5 (18,0-21,5) пг/мл относительно ГИ2 — 10,6 (9,5-16,1) пг/мл и ГС — 6,9 (5,7-8,7) ( $p_{1-2} < 0,05$ ). Содержание IL-4 снижалось в 3 раза в ГИ2а до 5,4 (4,3-20,3) пг/мл с 17,4 (14,3-32,0) пг/мл относительно его уровня до лечения и не отличалось от показателей условно здоровых женщин — 4,9 (4,5-20,1) пг/мл ( $p > 0,05$ ) (табл. 2). При этом отмечалось повышение содержания В-лимфоцитов CD3-CD19<sup>+</sup> и IgG до показателей ГС ( $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 > 0,05$ ) (рис. 1Б).

Таким образом, стандартная терапия при обострении ХИВЗГТ у иммунокомпрометированных женщин не привела к восстановлению уровня IFNα и дисбаланс цитокинов сохранился за счет преобладания провоспалительных цитокинов и отсутствия в ответ на воспаление компенсаторного роста противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10), что также не сопровождалось восстановлением клеточного и гуморального звеньев ИС. Полученные результаты свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе исхода обострения ХИВЗГТ с высоким риском поддержания воспалительного процесса и уменьшения длительности ремиссии, что подтверждается клиническими данными. Так, после проведения стандартной терапии в 13,6% случаев возникли обострения ХИВЗГТ уже через 3 месяца после лечения, а в анамнезе 6 месяцев рецидивы ХИВЗГТ были в 36,4% случаев.

Тогда как у иммунокомпрометированных женщин при обострении ХИВЗГТ на фоне комплексной терапии с использованием фГП отмечалась позитивная динамика в системе цитокинов и интерферонов. Так, восстановился уровень

IFNα у 50% иммунокомпрометированных женщин с обострением ХИВЗГТ, а повышенные до лечения уровни провоспалительных цитокинов IL-1β, TNFα к окончанию лечения нормализовались. Несмотря на отсутствие существенных изменений содержания нейтрофил-ассоциированных провоспалительных цитокинов IL-8 и IL-18, нами ранее было показано восстановление фагоцитарной и микробицидной функций нейтрофильных гранулоцитов (НГ), что можно объяснить таргетным воздействием фГП на НГ [3]. Среди противовоспалительных цитокинов наиболее значимые изменения отмечались в отношении IL-10, уровень которого повышался к окончанию комплексного лечения с включением фГП, что согласуется с известными данными о росте уровня противовоспалительных цитокинов при разрешении воспалительного процесса. Тогда как уровень IL-4 снизился до значений условно здоровых женщин, что сопровождалось восстановлением количества В-лимфоцитов CD3-CD19<sup>+</sup> и гуморального иммунитета, в частности IgG, участвующих в реализации Th2-типа иммунного ответа, регулируемых IL-4 [8]. Устранение дисбаланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и дефицита IFNα при использовании фГП у иммунокомпрометированных женщин с обострением ХИВЗГТ тесно взаимосвязано с наступлением клинической ремиссии заболеваний в более ранние сроки и пролонгирует длительность межрецидивного периода. Так, через 6 месяцев после проведения комплексного лечения с включением иммуномодулирующей терапии фГП в 90% случаев обострений ХИВЗГТ не наблюдалось и лишь в 10% случаев возникло обострение ХИВЗГТ вследствие проведения медицинских манипуляций.

## Заключение

Результаты настоящего исследования демонстрируют существенные преимущества включения в комплексное лечение иммунокомпрометированных женщин с обострением ХИВЗГТ таргетной иммуномодулирующей терапии Имунфаном® по сравнению с группой пациенток, получавших только стандартную терапию. Так, позитивная клиническая динамика ХИВЗГТ у женщин, получавших фГП, характеризовалась более ранним наступлением клинической ремиссии и значительным пролонгированием длительности межрецидивного периода. Позитивные клинические эффекты были получены на фоне устранения дисбаланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и дефицита IFNα при использовании фГП у иммунокомпрометированных женщин с обострением ХИВЗГТ.

Выявленные позитивные эффекты фГП на систему цитокинов и интерферонов носят иммуномодулирующий характер. Кроме того, фГП, участвуя, прежде всего, в тимической регуляции иммунного ответа, оказал модулирующее влияние на функционирование врожденного и адаптивного иммунитета. Установленная на фоне проведения таргетной иммуномодулирующей терапии Имунофаном® позитивная иммунологическая эффективность обусловлена, по нашему мнению, его плеiotропными эффектами влияния, что тесно коррелировало с полученными

позитивными клиническими эффектами у иммунокомпрометированных женщин с ХИВЗГТ. Таким образом, разработанный метод таргетной иммуномодулирующей терапии для иммунокомпрометированных женщин с ХИВЗГТ, включенный в комплекс стандартной терапии, позволил восстановить адаптационные возможности ИС и получить более выраженную позитивную клиническую эффективность, чем у женщин с ХИВЗГТ, получавших стандартную терапию, направленную, в основном, на элиминацию патогенов.

## Список литературы / References

1. Блохин Б.М., Прохорова А.Д., Суюндукова А.С. Актуальные вопросы интерферонотерапии // Терапия, 2018. № 7-8 (25-26). С. 125-132. [Blokhin B.M., Prokhorova A.D., Suyundukova A.S. Topical issues of interferon therapy. *Terapiya = Therapy*, 2018, no. 7-8 (25-26), pp. 125-132. (In Russ.)]
2. Зиганшин А.М., Мудров В.А. Оптимизация комплексной терапии воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин // Гинекология, 2019. № 21 (3). С. 30-34. [Ziganshin A.M., Mudrov V.A. Optimization of complex therapy of inflammatory diseases of women pelvic organs. *Ginekologiya = Gynecology*, 2019, no. 21 (3), pp. 30-34. (In Russ.)]
3. Ковалева С.В., Нестерова И.В., Пиктурно С.Н., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Тетерин Ю.В., Пирогова А.И., Просолупова Н.С., Чулкова А.М. Эффективность иммуномодулирующей терапии синтетическим аналогом активного центра гормона тимуса тимопоэтина в комплексном лечении иммунокомпрометированных женщин с хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями органов малого таза // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 287-294. [Kovaleva S.V., Nesterova I.V., Pikturno S.N., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Teterin Yu.V., Pirogova A.I., Prosolupova N.S., Chulkova A.M. Effectiveness of immunomodulatory therapy with a synthetic analogue of the active center of thymopoietin in the complex treatment of immunocompromised women with chronic infectious and inflammatory diseases of the pelvic organs. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 287-294. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-10011-EO.
4. Маркова Т.П., Чуви́ров Д.Г. Имунофан в комплексном лечении детей с повторными респираторными заболеваниями и микоплазменной инфекцией // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 12. С. 12-18. [Markova T.P., Chuvirov D.G. Imunofan in the complex treatment of children with recurrent respiratory diseases and mycoplasma infection. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 12, pp. 12-18. (In Russ.)]
5. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Пиктурно С.Н., Ломтатидзе Л.В., Чулкова А.М., Просолупова Н.С., Тетерин Ю.В. Позитивная клинико-иммунологическая эффективность препарата Имунофан® в комплексном лечении иммунокомпрометированных женщин с хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями генитального тракта // Эффективная фармакотерапия, 2023. Т. 19, № 26. С. 8-14. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Pikturno S.N., Lomtaticidze L.V., Chulkova A.M., Prosolupova N.S., Teterin Yu.V. Positive clinical and immunological efficacy of the drug Imunofan® in the complex treatment of immunocompromised women with chronic infectious and inflammatory diseases of the genital tract. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2023, Vol. 19, no. 26, pp. 8-14.
6. Нестерова И.В. Таргетная иммунотерапия при вторичных иммунодефицитах с инфекционным синдромом // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13, № 4 (22). С. 1512-1516. [Nesterova I.V. Targeted immunotherapy for secondary immunodeficiency with infectious syndrome. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 4, pp. 1512-1516. (In Russ.)] doi: 10.31857/S102872210007074-6.



7. Нестерова И.В., Татаурщикова Н.С. Перспективы развития адаптивной медицинской иммунологии // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 6. С. 1277-1288. [Nesterova I.V., Tataurschikova N.S. Prospects for the development of adaptive medical immunology. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 6, pp. 1277-1288. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PFT-2890

8. Нуралиев Н., Мустафаева Ф. Оценка иммунного статуса и эффективности иммуннокоррекции воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин // Вестник врача, Т. 1, № 3. С. 141-148. [Nuraliev N., Mustafayeva F. Assessment of the immune status and effectiveness of immunocorrection of inflammatory diseases of the pelvic organs in women. *Vestnik vracha = Bulletin of the Doctor*, 2020, Vol. 1, no. 3, pp. 141-148. (In Russ.)]

---

**Авторы:**

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

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

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

**Authors:**

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

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

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

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

**Куранова Н.Н.** — врач консультативно-диагностического отделения клиники ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

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

**Поезжаев Е.А.** — студент 6-го курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Chulkova A.M.**, PhD (Medicine), Head, Day Hospital Clinic, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Kuranova N.N.**, Doctor of the Consulting and Diagnostic Department Clinic, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

**Poezhaev E.A.**, 6<sup>th</sup> year Student of Pediatric Faculty, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

---

Поступила 29.03.2024

Отправлена на доработку 01.04.2024

Принята к печати 12.04.2024

Received 29.03.2024

Revision received 01.04.2024

Accepted 12.04.2024

## УРОВЕНЬ НЕКОТОРЫХ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С ИХ ГЕНЕТИЧЕСКИМ ПОЛИМОРФИЗМОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА

Чепурнова Н.С., Кныш С.В., Ющук В.Н., Лебедев С.В.,  
Харченко А.А.

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

**Резюме.** В статье представлены данные о состоянии системы протеолиза и генов регуляции матриксных металлопротеиназ у 180 условно здоровых женщин и мужчин молодого, среднего, пожилого и старческого возрастов. У пациентов производился однократный забор материала (буккальный эпителий). ПЦР-исследование буккального эпителия для анализа полиморфизмов генов MMP-1 rs1799750 и MMP-3 rs 3025058 проводили на приборной базе ДНК-амплификатора Bio-Rad CFX96 (г. Новосибирск, ООО «Национальный центр генетических исследований»). Уровни MMP-1, MMP-3 в сыворотке крови исследовали методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа (R&D Diagnostics Inc., США). Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием программы IBM SPSS Statistics 26 методами непараметрической статистики. Результаты исследования. Значения MMP-1 и MMP-3 в группе условно здоровых женщин в молодом возрасте были ниже значений среднего возраста, тогда как в старческом возрасте их содержание в сыворотке крови изменялось разнонаправленно: MMP-1 уменьшались, а MMP-3 – увеличивались. При анализе полиморфизмов гена MMP-1 rs1799750 у женщин молодого и среднего возраста с большим удельным весом превалировал гомозиготный генотип -/- с низкой экспрессией гена MMP-1, а у женщин старше 75 лет зафиксировано носительство гомозиготы G/G с активной экспрессией гена. При оценке экспрессии гена MMP-3 rs 3025058 установлено, что у женщин молодого возраста достоверно чаще встречался полиморфизм 5A/5A с высокой активностью гена, но с более низким уровнем MMP-3. В среднем и пожилом возрасте в 65% установлен гетерозиготный аллель 5A/6A с пониженной экспрессионной активностью гена. У условно здоровых мужчин уровень MMP-1 в сыворотке крови повышался в группах среднего и старческого возрастов, значения MMP-3 в группе до 45 лет были низкими по сравнению с группой пожилого возраста ( $p = 0,041$ ). MMP-1 rs1799750 у мужчин до 75 лет идентифицировался в варианте -/G у большинства, а в группе мужчин старше 75 лет прева-

### Адрес для переписки:

Чепурнова Наталья Сергеевна  
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.  
Тел.: 8 (914) 960-60-06.  
E-mail: dr.cns@yandex.ru

### Address for correspondence:

Natalya S. Chepurnova  
Pacific State Medical University;  
2 Ostryakov Ave  
Vladivostok  
690002 Russian Federation  
Phone: +7 (914) 960-60-06.  
E-mail: dr.cns@yandex.ru

### Образец цитирования:

Н.С. Чепурнова, С.В. Кныш, В.Н. Ющук, С.В. Лебедев,  
А.А. Харченко «Уровень некоторых матриксных  
металлопротеиназ в сыворотке крови во взаимосвязи  
с их генетическим полиморфизмом в зависимости от  
возраста» // Российский иммунологический журнал,  
2024. Т. 27, № 2. С. 317-322.  
doi: 10.46235/1028-7221-16623-LOS

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

### For citation:

N.S. Chepurnova, S.V. Knysh, V.N. Yushchuk, S.V. Lebedev,  
A.A. Kharchenko "Level of some matrix metalloproteinases  
in blood serum in relation to their genetic polymorphism  
depending on age", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 317-322.  
doi: 10.46235/1028-7221-16623-LOS

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16623-LOS

лировал гомозиготный вариант G/G с уровнем MMP-1 0,74 нг/мл. Гомозиготный полиморфизм гена MMP-3 rs 3025058 5A/5A с высокой активностью MMP-3 превалировал в группах мужчин до 60 лет с сывороточным уровнем MMP-3 100,2 нг/мл и 92,5 нг/мл соответственно.

*Ключевые слова:* матриксные металлопротеиназы, возраст, условно здоровые мужчины и женщины, гены

## LEVEL OF SOME MATRIX METALLOPROTEINASES IN BLOOD SERUM IN RELATION TO THEIR GENETIC POLYMORPHISM DEPENDING ON AGE

Chepurnova N.S., Knysh S.V., Yushchuk V.N., Lebedev S.V.,  
Kharchenko A.A.

*Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation*

**Abstract.** The article presents data on the state of the proteolysis system and genes for the regulation of matrix metalloproteinases in 180 conditionally healthy women and men of young, middle, elderly and senile ages. A single sampling of the material (buccal epithelium) was performed in patients. PCR examination of the buccal epithelium for the analysis of polymorphisms of the genes MMP-1 rs1799750 and MMP-3 rs 3025058 was carried out on the instrument base of the DNA amplifier Bio-Rad CFX96. Serum levels of MMP-1, MMP-3 were studied by the sandwich variant of solid-phase enzyme immunoassay. Statistical processing of the obtained results was carried out using the IBM SPSS Statistics 26 program using nonparametric statistics methods. The results of the study. The values of MMP-1 and MMP-3 in the group of conditionally healthy women at a young age were lower than the values of middle age, whereas in old age their serum levels varied in different directions: MMP-1 decreased, and MMP-3 increased. When analyzing polymorphisms of the MMP-1 rs1799750 gene, the homozygous genotype -/- with low expression of the MMP-1 gene prevailed in young and middle-aged women, and in women over 75 years of age, the carriage of the G/G homozygote with active gene expression was recorded. When evaluating the expression of the MMP-3 rs 3025058 gene, it was found that young women significantly more often had 5A/5A polymorphism with high gene activity, but with a lower level of MMP-3. In middle and old age, 65% have a heterozygous 5A/6A allele with reduced gene expression activity. In conditionally healthy men, the level of MMP-1 in blood serum increased in the middle-aged and senile groups, the values of MMP-3 in the group under 45 years of age were low compared with the elderly group ( $p = 0.041$ ). MMP-1 rs1799750 in men under 75 years of age was identified in the -/G variant in the majority. Homozygous polymorphism of the MMP-3 rs 3025058 5A/5A gene with high activity of MMP-3 prevailed in groups of men under 60 years of age with serum levels of MMP-3 100.2 ng/mL and 92.5 ng/mL, respectively.

*Keywords:* matrix metalloproteinases, age, conditionally healthy men and women, genes

### Введение

Долголетие представляет собой социально-биологическое явление, выражающееся в достижении человеком значительного возрастного рубежа и определяющееся сложной системой взаимосвязанных внутренних (генетических) и внешних (среда) факторов [1, 2]. Оно может быть связано как с отдельными людьми (индивидуальное долголетие), так и с популяциями в целом (популяционное долголетие). Среди макрорегионов России по абсолютной численности долгожителей, их доле в общей численности населения и по величине индекса долголетия

лидирует Центральный федеральный округ [2]. Аутсайдером же по всем данным параметрам является Дальневосточный федеральный округ. Старение можно описать как многофакторный процесс, включающий сложные взаимодействия между биологическими и молекулярными механизмами [3]. Способность различать нормальное биологическое старение и нарушение здоровья — важная область, в которой существует мало экспериментальных данных. Важной целью остается обеспечение точных показателей или предикторов возникновения ухудшения здоровья, а также способность охарактеризовать состояние оптимального здоровья, соответствующего возрасту.

В связи с востребованностью изучения информативных биомаркеров старения с каждым годом растет количество потенциальных генов, определяющих фенотип старения. Согласно данным мировой науки, существует два пути постарения: первый путь не отягощен возраст-ассоциированными заболеваниями, в то время как второй характеризуется прогрессирующей тенденцией к воспалению, инвалидизации и возрастным заболеваниями [2]. Поэтому ключевым моментом для установления роли полиморфного локуса в старении можно считать проведение работ по исследованию маркеров старения и их генетической регуляции соответственно возрастным категориям. В роли возможных предикторов патологического старения могут выступать внеклеточные протеиназы, представляющие собой группу белков, которые активируют субстраты путем ферментативного расщепления. Эта группа белков контролирует большое разнообразие ключевых физиологических и патологических процессов, включая ремоделирование тканей, репликацию ДНК, прогрессирование клеточного цикла, нейродегенерацию и др. Исследований, направленных на выявление маркеров физиологического и патологического старения человека – единичны, а исследования, включающие регуляцию этих маркеров на уровне генома, вообще отсутствуют.

**Цель исследования** – проанализировать генетические полиморфизмы MMP-1 и MMP-3 и их уровни в сыворотке крови у условно здоровых мужчин и женщин разного возраста.

## Материалы и методы

В исследование было включено 180 человек (мужчины составили 80 человек, женщины составили 100 человек, распределенных по возрасту (ВОЗ). Обследуемые проходили первый этап диспансеризации на клинических базах ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России. У пациентов производился однократный забор материала (буккальный эпителий) для ПЦР-анализа полиморфизмов, исследование проводили на приборной базе ДНК-амплификатора Bio-Rad CFX96. Для генотипирования выбранных нами полиморфных локусов ДНК была использована технология ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием конкурирующих флуоресцентных TaqMan-зондов. Каждая тест-система включала в себя два олигонуклеотидных праймера (прямой и обратный) и два флуоресцентных зонда, несущих «гаситель» (BHQ или BHQ2) на 3'-конце и разные флуоресцентные красители (FAM либо HEX) на 5'-конце зондов. Исследование полиморфизмов генов MMP-1 rs1799750 (с аллелями G/G, -/G, -/-) и MMP-3 rs 3025058 (с аллелями 5A/5A, 5A/6A, 6A/6A) проведено

в г. Новосибирск (ООО «Национальный центр генетических исследований»). Уровни MMP-1, MMP-3 в сыворотке крови исследовали методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа (R&D Diagnostics Inc., США). Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием программы IBM SPSS Statistics 26 методами непараметрической статистики; для анализа полученных данных использовали критерий Шапиро–Уилка. U-критерий Манна–Уитни и Вилкоксона, дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса, ранговую корреляцию по Спирмену, метод отношения шансов.

## Результаты и обсуждение

В группе условно здоровых женщин среднего возраста нами зафиксирован достоверно более высокий уровень MMP-1 в сыворотке крови ( $p = 0,01$ , табл. 1), при этом значения MMP-1 в возрасте 18-44 лет и 60 и более были сопоставимы. Уровни MMP-3 в группе молодого и пожилого возраста были сопоставимы и ниже значений групп среднего и старческого возрастов, при этом самые низкие значения установлены в группе молодого возраста ( $p = 0,05$ ), а высокие – в группе женщин старше 75 лет ( $p = 0,035$ ). При анализе полиморфизмов гена MMP-1 rs1799750 у женщин молодого возраста с большим удельным весом превалировал гомозиготный генотип -/- (нормальная активность гена) при низком сывороточном уровне MMP-1 (0,54 нг/мл и 0,59 нг/мл, соответственно). У женщин среднего возраста выявлено преобладание генотипа G/G с высокой степенью активности гена и высокими сывороточными уровнями MMP-1. В группе пожилого выявлена статистически более высокая встречаемость генотипа -/G в 79% с уровнем MMP-1 0,52 нг/мл. У женщин старше 75 лет зафиксировано носительство гомозиготы -/G в 87% с уровнем MMP-1 0,56 нг/мл. Оценка распределения аллелей MMP-3 rs 3025058 у условно здоровых женщин позволила установить, что у женщин молодого возраста достоверно чаще встречался полиморфизм 5A/5A с высокой экспрессионной активностью гена и с уровнем MMP-3 12,9 нг/мл. В среднем и пожилом возрасте в 65% установлен гетерозиготный аллель 5A/6A с нормальной экспрессионной активностью гена, а в старческом возрасте – генотип 6A/6A с низкой активностью гена, но с высоким уровнем MMP-3 в сыворотке крови, в среднем достигающим 15,9 нг/мл.

При анализе данных условно здоровых мужчин уровень MMP-1 в сыворотке крови был сопоставим с уровнем в молодом, среднем и пожилом возрасте (табл. 2), тогда как достоверно высокие показатели зарегистрированы в стар-

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН РАЗНОГО ВОЗРАСТА (МЕДИАННЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ ДОВЕРИТЕЛЬНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>))**

TABLE 1. CONTENT OF MATRIX METALLOPROTEINASES IN BLOOD SERUM IN CONDITIONALLY HEALTHY WOMEN OF DIFFERENT AGES (MEDIAN VALUES AND CORRESPONDING CONFIDENCE INTERVALS, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>))

Показатель Indicators	Практически здоровые женщины Practically healthy women n = 100			
	Молодой возраст Young age n = 30	Средний возраст Middle age n = 25	Пожилой возраст Old age n = 25	Старческий возраст Senile age n = 20
	1	2	3	4
<b>ММР-1, нг/мл</b> MMP-1, ng/mL	0,53 (0,41-0,60) p <sub>1-2</sub> = 0,034	0,66 (0,57-0,71) p <sub>2-3</sub> = 0,01	0,57 (0,42-0,69)	0,54 (0,40-0,73) p <sub>2-4</sub> = 0,028
<b>ММР-3, нг/мл</b> MMP-3, ng/mL	13,2 (12,6-16,1) p <sub>1-2</sub> = 0,05	15,0 (12,5-18,9)	14,5 (13,4-16,6) p <sub>3-4</sub> = 0,042	16,1 (12,9-18,3) p <sub>1-4</sub> = 0,035

Примечание. Достоверность различий по возрасту определяется при p-value ≤ 0,05.

Note. The reliability of age differences is determined at p-value ≤ 0.05.

**ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН РАЗНОГО ВОЗРАСТА (МЕДИАННЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ ДОВЕРИТЕЛЬНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>))**

TABLE 2. CONTENT OF MATRIX METALLOPROTEINASES IN BLOOD SERUM IN CONDITIONALLY HEALTHY MEN OF DIFFERENT AGES (MEDIAN VALUES AND CORRESPONDING CONFIDENCE INTERVALS, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>))

Показатель Indicators	Практически здоровые мужчины Practically healthy men n = 80			
	Молодой возраст Young age n = 20	Средний возраст Middle age n = 20	Пожилой возраст Old age n = 20	Старческий возраст Senile age n = 20
	1	2	3	4
<b>ММР-1, нг/мл</b> MMP-1, ng/mL	0,6 (0,53-0,73)	0,67 (0,59-0,78) p <sub>2-4</sub> = 0,05	0,61 (0,54-0,70) p <sub>3-4</sub> = 0,035	0,76 (0,65-0,79) p <sub>1-4</sub> = 0,034
<b>ММР-3, нг/мл</b> MMP-3, ng/mL	11,1 (11,5-14,1)	12,1 (10,4-14,3) p <sub>2-3</sub> = 0,42	13,3 (6,6-16,0) p <sub>1-3</sub> = 0,041	12,0 (12,1-14,0) p <sub>3-4</sub> = 0,05

Примечание. Достоверность различий по возрасту определяется при p-value ≤ 0,05.

Note. The reliability of age differences is determined at p-value ≤ 0.05.

ческом возрасте. Значения ММР-3 были ниже в группе молодого возраста (11,1 нг/мл), а в группе пожилого возраста они были равны 13,3 нг/мл (табл. 2). В структуре распределения генотипов ММР-1 rs1799750 у мужчин до 75 лет выявлен гетерозиготный аллель -/G у 80% с уровнем ММР-1 0,62 нг/мл. В группе мужчин старше

75 лет превалировал гомозиготный вариант G/G с уровнем ММР-1 0,74 нг/мл. Гомозиготный полиморфизм гена ММР-3 rs 3025058 5A/5A превалировал в группах мужчин до 60 лет с уровнем ММР-3 100,2 нг/мл и 92,5 нг/мл соответственно. У мужчин старше 60 лет зафиксирован гомози-

готный аллель 6A/6A с более низким уровнем MMP-3 56,8 нг/мл.

Важно, что MMP являются медиаторами стерильного воспаления при старении и возрастных заболеваниях. Несмотря на то, что средняя продолжительность жизни населения в мире увеличивается, сохраняются значительные последствия процесса старения. Возраст считается независимым и решающим фактором риска патологического старения. Старение клеток сосудов индуцирует сложные изменения структуры и функций эндотелия. Выявление, так называемых, признаков или биомаркеров старения стало преимуществом для исследований в этой области, поскольку оно позволило изучить патофизиологические механизмы и отсрочить появление множества связанных с возрастом синдромов и симптомов. Важно отметить, что относительно небольшое количество стареющих клеток (10%) достаточно для распространения клеточного старения на окружающие клетки в ткани [3].

Появляются все новые подтверждения перекрестной вовлеченности в процессы старения генов-кандидатов, ассоциированных с продолжительностью жизни. Для генов MMP, как и для многих других генов, характерен полиморфизм – наличие в популяции аллелей с той или иной нуклеотидной последовательностью. Полиморфные генетические локусы могут не вызывать никаких изменений в фенотипе, а могут иметь функциональный эффект, оказывая влияние на уровень экспрессии гена и количество белкового продукта, либо на стабильность и функциональные характеристики белка как фермента [3, 4]. К настоящему времени в генах MMP описан ряд функциональных однонуклеотидных полиморфных замен (single nucleotide polymorphism – SNP), расположенных в регуляторных регионах генов (промоторах) и изменяющих уровень экспрессии MMP. Гены MMP картированы на хромосомах 1, 8, 11, 14, 16, 20, 22. Большинство из них расположено кластером на плече 11-й хромосомы (речь идет о MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-12, MMP-13, MMP-20) [4, 5, 6].

Ген MMP-1 является наиболее экспрессирующимся. Экспрессия гена MMP-1 в основном контролируется уровнем транскрипции и стабильности мРНК. С другой стороны, подавляют транскрипцию MMP-1 – трансретиноевая кислота и трансформирующий фактор роста  $\beta$  (Pietrzak J. и соавт., 2019).

Цитокины, которые повышают уровень транскрипции MMP-3, включают фактор роста фибробластов, эпидермальный фактор роста, колониестимулирующий фактор макрофагов и интерфероны  $\beta$  и  $\gamma$  [3]. Durmanova V. и соавт. (2021) сосредоточились на MMP-2 и MMP-3 из-за их

участия в процессах, связанных с нейродегенерацией. MMP-3, также известный как стромелизин-1, представляет собой белок массой 54 кДа, продуцируемый различными клетками, включая макрофаги, стромальные фибробласты, эндотелиальные клетки, иммунные клетки и синовиальные клетки [3]. Он участвует в протеолизе различных молекул адгезии, факторов роста, цитокинов (TNF и IL-1 $\beta$ ) и проформ других MMP, таких как proMMP-1, proMMP-3 и proMMP-9. MMP-3 представляет собой «скрытую» металлопротеиназу, главным образом вырабатываемую клетками соединительной ткани, активируется через проколлагеназу-1 и деградирует компоненты экстрацеллюлярной матрицы протеогликан, фибронектин, желатин и различные типы коллагенов. MMP-3 имеет широкий диапазон субстратной специфичности и обладает способностью активировать другие MMP, что суммарно вызывает деградацию большинства компонентов экстрацеллюлярного матрикса. В головном мозге MMP-3 необходим для роста нейритов, пластичности нейронов и ремиелинизации [4].

Учитывая вышеизложенное и в связи с увеличением доли лиц, страдающих синдромами, связанными со старением организма, является актуальной идентификация молекулярно-генетических факторов, обеспечивающих продление активного возрастного периода с сохранением физической, психической, умственной активности и в целом способствующих успешному долголетию. Таким образом, долголетие часто характеризуется не уникальным и однозначным фенотипом – их может быть несколько.

## Выводы

1. Значения MMP-1 и MMP-3 в группе условно здоровых женщин в молодом возрасте были ниже значений среднего возраста, кроме того, в старческом возрасте они изменялись разнонаправленно: MMP-1 уменьшались, а MMP-3 – увеличивались. При анализе полиморфизмов гена MMP-1 rs1799750 у женщин молодого и среднего возраста с большим удельным весом превалировал гомозиготный генотип -/- с низкой экспрессией гена MMP-1, а у женщин старше 75 лет зафиксировано носительство гомозиготы G/G с высокой экспрессией гена. MMP-3 rs 3025058 у женщин молодого возраста достоверно чаще встречался полиморфизм 5A/5A с высокой экспрессией, но с более низким уровнем MMP-3. В среднем и пожилом возрасте в 65% установлен гетерозиготный аллель 5A/6A с пониженной экспрессионной активностью гена, а в старческом возрасте генотип 6A/6A с малой активностью гена, но с высоким уровнем сывороточной MMP-3.

2. У условно здоровых мужчин MMP-1 повышалась в группах среднего и старческого возрастов, значения MMP-3 были высокими в группе пожилого возраста. MMP-1 rs1799750 у большинства мужчин до 75 лет идентифицировался в варианте -/G, а в группе мужчин старше 75 лет превалировал гомозиготный ва-

риант G/G с уровнем MMP-1 0,74 нг/мл. Гомозиготный полиморфизм гена MMP-3 rs 3025058 5A/5A с высокой экспрессией превалировал в группах мужчин до 60 лет с уровнем MMP-3 100,2 нг/мл и 92,5 нг/мл соответственно, что было достоверно выше уровней групп старше 60 лет.

## Список литературы / References

1. Грачев Н.И., Красников В.Е., Турмова Е.П., Маркелова Е.В., Рублев В.Ю., Назаренко С.А. Анализ показателей матричной металлопротеиназы-9, тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ 1-го типа и их комплекса у пациентов с острым инфарктом миокарда, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам // Тихоокеанский медицинский журнал, 2018. № 4 (74). С. 45-48. [Grachev N.I., Krasnikov V.E., Turmova E.P., Markelova E.V., Rublev V.Yu., Nazarenko S.A. Analysis of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase type 1 and their complex in patients with acute myocardial infarction who have exposed high coronary interventions. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2018, no. 4 (74), pp. 45-48. (In Russ.)]
2. Barcena M.L., Aslam M., Pozdniakova S., Norman K., Ladilov Y. Cardiovascular Inflammation: Mechanisms and Translational Aspects. *Cells*, 2022, Vol.11, no. 6, 1010. doi: 10.3390/cells11061010.
3. Durmanova V., Javor J., Parnicka Z., Minarik G., Ocnasova A., Vaseckova B., Reznakova V., Kralova M., Hromadka T., Shawkatova I. Impact of MMP2 rs243865 and MMP3 rs3025058 polymorphisms on clinical findings in Alzheimer's disease patients. *Mediators Inflamm.*, 2021, Vol. 2021, 5573642. doi:10.1155/2021/5573642.
4. Lech A.M., Wiera G., Mozrzykmas J.W. Matrix metallo-proteinase-3 in brain physiology and neurodegeneration. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2019, Vol. 28, no. 12, pp. 1717-1722. doi: 10.17219/acem/110319.
5. Pietrzak J., Mirowski M., Jeleń A., Świechowski R., Wodziński D., Niebudek K., Balcerczak E. Decreased MMP1 gene expression in acute myeloid leukaemia. *Mol. Biol. Rep.*, 2019, Vol. 46, pp. 2293-2298.
6. Rodriguez-Garcia M., Patel M.V., Shen Z., Wira C.R. The impact of aging on innate and adaptive immunity in the human female genital tract. *Aging Cell*, 2021, Vol. 20, no. 5, e13361. doi:10.1111/acel.13361.

### Авторы:

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

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

**Ющук В.Н.** — ассистент кафедры общественного здравоохранения ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Лебедев С.В.** — проректор по развитию ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Харченко А.А.** — студентка лечебного факультета ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

### Authors:

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

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

**Yushchuk V.N.**, Assistant Professor, Department of Public Health, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

**Lebedev S.V.**, Vice-Rector for Development, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

**Kharchenko A.A.**, Student, Medical Faculty, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 22.03.2024

Отправлена на доработку 24.03.2024

Принята к печати 26.03.2024

Received 22.03.2024

Revision received 24.03.2024

Accepted 26.03.2024



## ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ C-589T IL4 И G-1082A IL10 У ДЕТЕЙ С НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Агеева Е.С., Аблаева Р.Н., Рымаренко Н.В., Белоглазов В.А.,  
Яцков И.А., Жукова А.А.

Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

**Резюме.** Иммунные реакции участвуют в инициации и развитии COVID-19. По сравнению с легкими случаями COVID-19 уровни интерлейкинов в сыворотке крови значительно повышались у тяжелых и критических пациентов с COVID-19. Повышение IL-4 и IL-10 связано с тяжестью заболевания. Полиморфизм C-589T гена IL4 ассоциирован с повышенной промоторной активностью гена. Аллельные варианты GA и GG-1082 гена IL10 обладают большей активностью по сравнению с генотипом AA-1082 гена IL10.

Целью исследования было изучение частоты встречаемости полиморфных вариантов генов C-589T IL4 и G-1082A IL10 у детей с новой коронавирусной инфекцией в популяции Республики Крым.

Обследованы 68 пациентов в возрасте от 0 до 14 лет с диагнозом «НКИ средней и тяжелой степени тяжести», 100 взрослых пациентов (45,6±6,14 года). Анализировали частоту встречаемости полиморфизма генов C-589T IL4, G-1082A IL10.

Варианты CC и CT полиморфизма C-589T гена IL4 в группе детей с НКИ встречались чаще, чем TT C-589T IL4. Статически значимые различия по частоте встречаемости мутантного генотипа CC полиморфизма C-589T гена IL4 были показаны между группой детей и взрослых. При проведении статического анализа не было выявлено каких-либо различий генотипов с заболеванием НКИ ни у детей, ни у взрослых. Анализ распространенности генотипов G-1082A IL10 показал, что у детей наиболее частым является – GA, такая же тенденция характерна и для взрослых, и для группы контроля.

Анализ отношения шансов показал, что патогенетического значения между полиморфизмом генов C-589T IL4 и G-1082A IL10 и риском развития новой коронавирусной инфекции в исследованных группах выявлено не было.

**Ключевые слова:** полиморфизм, новая коронавирусная инфекция, C-589T IL4, G-1082A IL10, дети, COVID-19

### Адрес для переписки:

Агеева Елизавета Сергеевна  
Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский  
институт имени С.И. Георгиевского  
295051, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, бул.  
Ленина, 5/7.  
Тел.: 8 (978) 506-55-01.  
E-mail: ageevaeliz@rambler.ru

### Address for correspondence:

Elizaveta S. Ageeva  
Order of Labor Red Banner S. Georgievsky Medical Institute  
5/7 Lenin Blvd  
Simferopol, Republic of Crimea  
295051 Russian Federation  
Phone: +7 (978) 506-55-01.  
E-mail: ageevaeliz@rambler.ru

### Образец цитирования:

Е.С. Агеева, Р.Н. Аблаева, Н.В. Рымаренко, В.А. Белоглазов, И.А. Яцков, А.А. Жукова «Частота встречаемости полиморфизма генов C-589T IL4 и G-1082A IL10 у детей с новой коронавирусной инфекцией» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 323-328.  
doi: 10.46235/1028-7221-16742-FOP

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

### For citation:

E.S. Ageeva, R.N. Ablaeva, N.V. Rymarenko, V.A. Beloglazov, I.A. Yatskov, A.A. Zhukova "Frequency of polymorphism of the C-589T IL4 and G-1082A IL10 genes in children with new coronavirus infection", Russian Journal of Immunology / Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 323-328.  
doi: 10.46235/1028-7221-16742-FOP

© Ageeva E.S. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16742-FOP

# FREQUENCY OF POLYMORPHISM OF THE C-589T IL4 AND G-1082A IL10 GENES IN CHILDREN WITH NEW CORONAVIRUS INFECTION

Ageeva E.S., Ablaeva R.N., Rymarenko N.V., Beloglazov V.A., Yatskov I.A., Zhukova A.A.

Order of Labor Red Banner S. Georgievsky Medical Institute, V. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

**Abstract.** Immune responses are involved in the initiation and development of COVID-19. Compared with mild COVID-19 cases, serum interleukins levels were significantly increased in severe and critical COVID-19 patients. Increases in IL-4 and IL-10 are associated with disease severity. The C-589T polymorphism of IL4 gene is associated with increased promoter activity of gene. Allelic variants GA and GG-1082 of IL10 gene have greater activity compared to the AA-1082 IL10. The purpose was to study the frequency of occurrence of polymorphic variants of the C-589T IL4 and G-1082A IL10 genes in children with a new coronavirus infection in the population of Crimea. Methods. Examined: 68 patients aged 0 to 14 years with a diagnosis of moderate and severe COVID-19, 100 adult patients (45.6±6.14 years). The frequency of occurrence of polymorphisms of the C-589T IL4 and G-1082A IL10 genes was analyzed. Results. The CC and CT variants of the C-589T IL4 in the group of children were more common than the TT C-589T IL4 variants. Statistically significant differences in the frequency of occurrence of the mutant CC genotype of the C-589T IL4 were shown between groups of children and adults. Statistical analysis did not reveal any genotype differences with disease in either children or adults. Analysis of the prevalence of G-1082A IL10 genotypes showed that in children the most common is GA. The same trend is typical for adults and control group. Conclusions. Analysis of the odds ratio showed that there was no pathogenetic significance between the polymorphism of the C-589T IL4 and G-1082A IL10 genes and the risk of developing a new coronavirus infection in the studied groups.

**Keywords:** polymorphism, new coronavirus infection, C-589T IL4, G-1082A IL10, children, COVID-19

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-20021, <https://rscf.ru/project/23-15-20021/>.

## Введение

Иммунные реакции участвуют в инициации и развитии COVID-19, а цитокиновый шторм является признаком плохого прогноза у пациентов с COVID-19 [7, 8, 9]. Важную роль в прогрессировании COVID-19 играют интерлейкины (IL) [10]. По сравнению с легкими случаями COVID-19 уровни интерлейкинов в сыворотке крови значительно повышались у тяжелых и критических пациентов [7] и отличались у выживших и не выживших пациентов с COVID-19 [3]. Данные, представленные в литературе свидетельствуют о том, что повышение IL-4 и IL-10 связано с тяжестью заболевания COVID-19 [2, 4]. Высокая концентрация IL-10 в сыворотке крови у пациентов с инфекцией COVID-19 может быть как противовоспалительным механизмом, так и иммуносупрессивным биомаркером [5].

При COVID-19-инфекции одним из путей воспаления в организме является индукция сиг-

нального пути JAK-STAT6 за счет увеличения клеток Th2 и IL-4 [11]. IL-4 подавляет высвобождение цитокинов воспаления. Является активатором JAK-STAT пути, стимулирует синтез IL-4, IL-5 и IL-6. Повышение продукции IL-4 свидетельствует о смещении баланса в сторону доминирования Th<sub>2</sub>-пути.

Сигнальный каскад в клетках, отвечающих на IL-10, опосредуется путем Jak1/тирозинкиназа 2 (Tyk2)/преобразователь сигнала и активатор транскрипции 3 (STAT3). STAT3 подавляет активацию STAT6 и, следовательно, ингибирует экспрессию генов, чувствительных к IL-4/IL-13, в моноцитах и дендритных клетках (DC) [1].

Таким образом, специфический иммунный профиль инфекции SARS-CoV-2 может привести к вторичным инфекциям и дисфункции различных органов организма. В связи с чем, понимание роли различных цитокинов в индукции инфекции и воспаления у пациентов с COVID-19 может выявить эффективные стратегии лечения.

Функционально значимым полиморфным вариантом гена IL4 является полиморфизм C-590T, который представляет собой замену С на Т в

590-м положении. Полиморфизм *C-589T* гена *IL4* ассоциирован с повышенной промоторной активностью гена. Расположен в 1-й хромосоме в области 1q31-q32, состоит из 5 экзонов. Аллельные варианты *GA* и *GG-1082* гена *IL10* обладают большей активностью по сравнению с генотипом *AA-1082* гена *IL10*.

**Целью нашего исследования было** изучение частоты встречаемости полиморфных вариантов генов *C-589T IL4* и *G-1082A IL10* у детей с новой коронавирусной инфекцией в популяции Республики Крым.

## Материалы и методы

Для молекулярно-генетической характеристики пациентов с инфекцией COVID-19 были обследованы: 68 пациентов (в возрасте от 0 до 14 лет) с диагнозом НКИ средней и тяжелой степени тяжести, поступившие в отделение ГБУЗ РК «Республиканская детская инфекционная клиническая больница» (г. Симферополь). В группу взрослых было включено 100 пациентов, средний возраст  $45,6 \pm 6,14$  года, перенесших НКИ, проходивших реабилитацию в постковидном периоде в пульмонологическом отделении ГБУЗ РК «АНИИ им. И.М. Сеченова».

Контрольную группу составили 85 относительно здоровых респондентов, не перенесших НКИ в анамнезе, 46 женщин (54%) и 39 мужчин (45%), средний возраст которых составил  $42,2 \pm 4,32$  года.

Критериями включения в исследование были: перенесенная новая коронавирусная инфекция. Подписанное информированное согласие на включение в исследование. Критериями исключения явились: наличие осложненных форм перенесенных вирусных пневмоний при наличии выраженных функциональных легочных и внелегочных нарушениях.

Исследование одобрено на заседании «Комитета по этике» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» (протокол № 8 от 06.09.2022 г.).

Верификация диагноза «новая коронавирусная инфекция» была основана на подтверждении вируса SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР и наличия клинически идентифицируемых симптомов или признаков инфекции верхних дыхательных путей, а именно заложенность глотки, боль в горле и лихорадка, и при рентгенологическом исследовании. Все пациенты подписывали информационное согласие на проведение исследования.

Выделение ДНК осуществлялось из цельной крови пациентов с новой коронавирусной инфекцией и здоровых добровольцев с помощью набора «ДНК-экспресс кровь» (НПФ «Литех», Россия) согласно инструкции производителя.

Для анализа полиморфизма генов *C-589T IL4*, *G-1082A IL10*, кровь забирали из периферической вены. Постановка аллель-специфических ПЦР осуществлялась с помощью наборов фирмы НПФ «Литех» (Россия) согласно инструкции производителя. Детекция продуктов амплификации осуществлялась методом горизонтального электрофореза в 3%-ном агарозном геле.

Исследование проводилось в центре коллективного пользования научного оборудования «Молекулярная биология» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского».

Статистический анализ полученных данных производился с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics 27. Ожидаемую частоту аллелей рассчитывали на основе закона Харди–Вайнберга. Для сравнения частот сочетаний аллелей использовали тест  $\chi^2$  с поправкой Йейтса на непрерывность. Ассоциация полиморфизмов с новой коронавирусной инфекцией анализировалась путем определения отношения шансов (ОШ) и 95%-ного доверительного интервала (95% ДИ),  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Распределение генотипов полиморфизма генов *C-589T IL4* и *G-1082A IL10* соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ( $p > 0,05$ ). В группе детей с НКИ варианты *CC* и *CT* полиморфизма *C-589T* гена *IL4* встречались чаще, чем *TT C-589T IL4*. Такая же тенденция распределения генотипов сохранялась и в группе взрослых пациентов, переболевших COVID-19. Статически значимые различия по частоте встречаемости мутантного генотипа *CC* полиморфизма *C-589T* гена *IL4* были показаны между группой детей и взрослых ( $p < 0,05$ , табл. 1).

При проведении статического анализа не было выявлено каких-либо различий генотипов с заболеванием НКИ ни у детей, ни у взрослых (табл. 2).

Анализ распространенности генотипов *G-1082A IL10* показал, что у детей наиболее частым является *GA*, такая же тенденция характерна и для взрослых, и для группы контроля (табл. 1). При проведении статического анализа не было выявлено каких-либо различий или ассоциированности генотипов с заболеванием новой коронавирусной инфекцией ни у детей, ни у взрослых.

Анализ отношения шансов показал, что патогенетического значения между полиморфизмом генов и риском развития новой коронавирусной инфекции в исследованных группах выявлено не было (табл. 3).

**ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОТИПА ПОЛИМОРФИЗМА C-589T IL4 И G-1082A IL10 У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ ( $\chi^2$ , df = 1)**

TABLE 1. ALLELE FREQUENCIES OF THE C-589T IL4 AND G-1082A IL10 POLYMORPHISM GENOTYPE IN COVID-19 SURVIVORS AND THE CONTROL GROUP ( $\chi^2$ , df = 1)

Генотип Genotype	Дети Children n (%)	Взрослые Adult n (%)	Контроль Controls n (%)
<b>C-589T IL4</b>			
CC	32 (47,1)	64 (64,0%) <sup>1</sup>	48 (56,5)
CT	29 (42,6)	34 (34,0%)	30 (35,3)
TT	7 (10,3)	2 (2,0)	7 (8,2)
<b>G-1082A IL10</b>			
GG	10 (14,7)	17 (17,0)	22 (25,9)
GA	33 (48,5)	53 (53,0)	38 (48,2)
AA	25 (36,8)	30 (30,0)	22 (25,9)

Примечание. <sup>1</sup> – статистическая значимость при сравнении взрослых и детей  $p < 0,05$ .

Note. <sup>1</sup>, statistical significance when comparing adults and children  $p < 0.05$ .

**ТАБЛИЦА 2. ЗНАЧЕНИЕ КРИТЕРИЯ ОТНОШЕНИЯ ШАНСОВ РИСКА РАЗВИТИЯ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ С ПОЛИМОРФИЗМОМ C-589T ГЕНА IL4**

TABLE 2. VALUE OF ODDS RATIO CRITERIA FOR THE RISK OF NEW DEVELOPMENT POLYMORPHISM OF CORONAVIRUS INFECTION C-589T IL4 GENE

Генотип Genotype	Критерий сопряженности ( $\chi^2$ ) Conjugacy criterion ( $\chi^2$ )	Критерий отношения шансов (OR) Odds ratio (OR) test	95%-ный доверительный интервал (ДИ) 95% confidence interval (CI)		Уровень значимости, $p$ Significance level, $p$
			Нижний предел Lower limit	Верхний предел Upper limit	
<b>У детей с инфекцией COVID-19</b> In children with COVID-19 infection					
CC	1,623	0,669	0,383	1,168	0,203
CT	1,030	1,401	0,792	2,479	0,311
TT	0,061	1,278	0,482	3,384	0,805
<b>У взрослых с инфекцией COVID-19</b> In adults with COVID-19 infection					
CC	0,753	1,341	0,759	2,369	0,386
CT	0	0,957	0,534	1,714	1,0
TT	2,632	0,233	0,049	1,134	0,105

В литературе описано, что генотип GG полиморфизма -1082 гена IL10 ассоциирован с восприимчивостью и длительной персистенцией вирусной инфекции. Критическим является устойчивый эффект повышения уровня IL10 в сыворотке крови и ингибирующее воздействие на иммунные клетки [6]. Полученные нами результаты демонстрируют, что частоты аллелей А и G IL10-1082 составляли 0,6 и 0,4 соответственно, и

сопоставимы с результатами исследований, представленными в других популяциях пациентов. Однако не демонстрируют взаимосвязи между полиморфизмом IL-10 и риском развития НКИ ни у детей, ни у взрослых. При анализе частоты встречаемости аллельных комбинаций C-589T гена IL4 установлено, что частота аллелей С у детей не отличалась от контроля, но была ниже чем у взрослых пациентов (0,7 и 0,8 соответственно).

**ТАБЛИЦА 3. ЗНАЧЕНИЕ КРИТЕРИЯ ОТНОШЕНИЯ ШАНСОВ РИСКА РАЗВИТИЯ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ С ПОЛИМОРФИЗМОМ G-1082A ГЕНА IL10**

TABLE 3. VALUE OF ODDS RATIO CRITERIA FOR THE RISK OF NEW DEVELOPMENT POLYMORPHISM OF CORONAVIRUS INFECTION G-1082A IL10 GENE

Генотип Genotype	Критерий сопряженности ( $\chi^2$ ) Conjugacy criterion ( $\chi^2$ )	Критерий отношения шансов (OR) Odds ratio (OR) test	95 % доверительный интервал (CI) 95% confidence interval (CI)		Уровень значимости, p Significance level, p
			Нижний предел Lower limit	Верхний предел Upper limit	
<b>У детей с инфекцией COVID-19</b> In children with COVID-19 infection					
GG	1,068	0,502	0,247	1,019	0,080
GA	0,020	1,0	0,574	1,741	0,888
AA	2,317	1,672	0,914	3,057	0,128
<b>У взрослых с инфекцией COVID-19</b> In adults with COVID-19 infection					
GG	1,896	0,583	0,293	1,159	0,169
GA	0,180	1,174	0,674	2,044	0,672
AA	0,223	1,220	0,657	2,264	0,637

Однако данные различия также не были ассоциированы с риском развития НКИ.

## Выводы

1. C-589T IL4 и G-1082A IL10 не ассоциированы с риском развития НКИ у взрослых или детей.

2. Распределения встречаемости полиморфных вариантов генов IL-4 и IL-10 в группах пациентов не отличались от частоты встречаемости генотипов в группе контроля ( $p > 0,05$ ).

### Финансирование и спонсорская поддержка

Публикация размещена при участии Балтийского федерального университета им. И. Канта.

## Список литературы / References

- Carlini V., Noonan D.M., Abdalaleem E., Goletti D., Sansone C., Calabrone L., Albini A. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1161067. doi: 10.3389/fimmu.2023.1161067.
- Chang Y., Bai M., You Q. Associations between serum interleukins (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, and IL-10) and disease severity of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Biomed. Res. Int.*, 2022, Vol. 2022, 2755246. doi: 10.1155/2022/2755246.
- Chen R., Sang L., Jiang M., Yang Z., Jia N., Fu W., Xie J., Guan W., Liang W., Ni Z., Hu Y., Liu L., Shan H., Lei C., Peng Y., Wei L., Liu Y., Hu Y., Peng P., Wang J., Liu J., Chen Z., Li G., Zheng Z., Qiu S., Luo J., Ye C., Zhu S., Zheng J., Zhang N., Li Y., He J., Li J., Li S., Zhong N. Medical treatment expert group for COVID-19. Longitudinal hematologic and immunologic variations associated with the progression of COVID-19 patients in China. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 146, no. 1, pp. 89-100.
- Dhar S.K., KV., Damodar S., Gujar S., Das M. IL-6 and IL-10 as predictors of disease severity in COVID-19 patients: results from meta-analysis and regression. *Heliyon*, 2021, Vol. 7, no. 2, e06155. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06155.
- Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G., Yuan Z., Feng Z., Zhang Y., Wu Y., Chen Y. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827.
- Helminen M.E., Kilpinen S., Virta M., Hurme M. Susceptibility to primary Epstein-Barr virus infection is associated with interleukin-10 gene promoter polymorphism. *J. Infect Dis.*, 2001, Vol. 184, no. 6, pp. 777-780.
- Hojyo S., Uchida M., Tanaka K., Hasebe R., Tanaka Y., Murakami M., Hirano T. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflamm Regen.*, 2020, Vol. 40, 37. doi: 10.1186/s41232-020-00146-3.
- Mahmudpour M., Roozbeh J., Keshavarz M., Farrokhi S., Nabipour I. COVID-19 cytokine storm: The anger of inflammation. *Cytokine*, 2020, Vol. 133, 155151. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155151.

9. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J.; HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*, 2020, Vol. 395, no. 10229, pp. 1033-1034.
10. Qian G., Zhang Y., Xu Y., Hu W., Hall I.P., Yue J., Lu H., Ruan L., Ye M., Mei J. Reduced inflammatory responses to SARS-CoV-2 infection in children presenting to hospital with COVID-19 in China. *EClinicalMedicine*, 2021, Vol. 34, 100831. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.100831.
11. Renu K., Prasanna P.L., Valsala G.A. Coronaviruses pathogenesis, comorbidities and multi-organ damage – A review. *Life Sci.*, 2020, Vol. 255, 117839. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117839.

---

**Авторы:**

**Агеева Е.С.** — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой биологии медицинской, Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

**Аблаева Р.Н.** — ассистент кафедры биологии медицинской, Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

**Рымаренко Н.В.** — д.м.н., профессор, профессор кафедры педиатрии с курсом инфекционных болезней, Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

**Яцков И.А.** — к.м.н., доцент кафедры внутренней медицины № 2, Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

**Белоглазов В.А.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой внутренней медицины № 2, Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

**Жукова А.А.** — к.б.н., доцент кафедры биологии медицинской, Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

**Authors:**

**Ageeva E.S.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Medical Biology, Order of Labor Red Banner S. Georgievsky Medical Institute, V. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

**Ablaeva R.N.**, Assistant Professor, Department of Medical Biology, Order of Labor Red Banner S. Georgievsky Medical Institute, V. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

**Rymarenko N.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Professor, Department of Pediatrics with a Course in Childhood Infectious Diseases, Order of Labor Red Banner S. Georgievsky Medical Institute, V. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

**Yatskov I.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Medicine No. 2, Order of Labor Red Banner S. Georgievsky Medical Institute, V. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

**Beloglazov V.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Internal Medicine No. 2, Order of Labor Red Banner S. Georgievsky Medical Institute, V. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

**Zhukova A.A.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Medical Biology, Order of Labor Red Banner S. Georgievsky Medical Institute, V. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

## АУТОИММУННО ОБУСЛОВЛЕННОЕ СУИЦИДАЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ

Быков Ю.В.<sup>1</sup>, Быкова А.Ю.<sup>1</sup>, Беккер Р.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ставрополь, Россия

<sup>2</sup> Университет имени Давида Бен-Гуриона в Негеве, г. Беэр-Шева, Израиль

**Резюме.** Известно аутоиммунное заболевание, которое получило название «анти-NMDA-рецепторного энцефалита», или «энцефалита Далмау» (по имени его первооткрывателя). Оно связано с наличием высоких титров антител к определенному эпитопу NR1 субъединицы NMDA-рецепторов в крови и/или в ликворе. Это заболевание в своей классической форме сопровождается выраженными психическими (депрессия, бред, галлюцинации, тревога, нарушения сна, когнитивные нарушения, кататония и др.) и неврологическими (судороги, дискинезии) симптомами, нарушениями сознания и вегетативной регуляции (регуляции дыхания, температуры, артериального давления, сердечного ритма), а также суицидальностью, которая не пропорциональна степени тяжести психической патологии. Однако существуют и «неклассические» формы анти-NMDA-рецепторного энцефалита, которые могут проявляться исключительно психической симптоматикой (например депрессией, психозом, суицидальным поведением), без характерных неврологических симптомов и/или нарушений вегетативной регуляции. В некоторых из подобных случаев диагноз «анти-NMDA-рецепторного энцефалита» был в итоге поставлен с опозданием на месяцы, годы и даже десятилетия. Кроме того, в последние десятилетия накапливается все больше данных о том, что у части пациентов с, казалось бы, «классическими» психическими расстройствами, такими как шизофрения, биполярное аффективное расстройство, депрессивные расстройства – и особенно у тех из них, которые проявляют резистентность к традиционной психофармакотерапии – тоже обнаруживаются повышенные титры анти-NMDA-рецепторных антител в крови и/или в ликворе. Также показано, что повышенные титры анти-NMDA-рецепторных антител часто обнаруживаются при посмертном патологоанатомическом исследовании умерших от суицида. Титры анти-NMDA-рецепторных антител у психиатрических пациентов хорошо коррелируют с наличием суицидальных попыток в недавнем анамнезе и/или с текущей активной суицидальной идеацией. Некоторым из таких пациентов может помочь в купировании суицидальности и/или в преодолении резистентности к психофармакотерапии – энергичная иммуносупрессивная терапия, аналогичная той, которая обычно применяется при «классическом» анти-NMDA-рецепторном энцефалите с неврологическими и вегетативными проявлениями. В данной статье представлены описание и анализ трех клинических случаев пациентов с различными

### Адрес для переписки:

Быков Юрий Витальевич  
ФГБОУ «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ  
355003, Россия, г. Ставрополь, ул. Ленина 328/9, кв. 11.  
Тел.: 8 (962) 443-04-92.  
Факс: 8 (8652) 71-87-51.  
E-mail: yubikov@gmail.com

### Address for correspondence:

Yuri V. Bykov  
Stavropol State Medical University  
328/9 Lenin St, Apt 11  
Stavropol  
355003 Russian Federation  
Phone: +7 (962) 443-04-92.  
Fax: +7 (8652) 71-87-51.  
E-mail: yubikov@gmail.com

### Образец цитирования:

Ю.В. Быков, А.Ю. Быкова, Р.А. Беккер «Аутоиммунно обусловленное суицидальное поведение» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 329-334. doi: 10.46235/1028-7221-16588-AMS

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

### For citation:

Yu.V. Bykov, A.Yu. Bykova, R.A. Bekker "Autoimmune mediated suicidal behavior", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 329-334.  
doi: 10.46235/1028-7221-16588-AMS

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16588-AMS

психическими расстройствами, острой суицидальностью и повышенными титрами анти-NMDA-рецепторных антител, у которых такая терапия оказалась эффективной.

*Ключевые слова:* анти-NMDA-рецепторные антитела, суицидальное поведение, аутоиммунный энцефалит, психические расстройства, иммуносупрессоры, предотвращение суицида

## AUTOIMMUNE MEDIATED SUICIDAL BEHAVIOR

Bykov Yu.V.<sup>a</sup>, Bykova A.Yu.<sup>a</sup>, Bekker R.A.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

<sup>b</sup> David Ben-Gurion University at Negev, Beer-Sheba, Israel

**Abstract.** There is a known autoimmune disease, which is called ‘anti-NMDA receptor encephalitis’, or ‘Dalmau encephalitis’ (named after its discoverer). It is associated with the presence of high titers of antibodies to a certain epitope of the NR1 subunit of NMDA receptors in the blood and/or in the cerebrospinal fluid. This disease in its classic form is accompanied by severe mental (depression, delusions, hallucinations, anxiety, sleep disorders, cognitive impairment, catatonia, etc.) and neurological (convulsions, dyskinesias) symptoms, disturbances of consciousness and autonomic regulation (regulation of respiration, temperature, blood pressure, heart rhythm), as well as with suicidality, which seems to be disproportionate to the severity of mental disturbances. However, there are also ‘non-classical’ forms of anti-NMDA receptor encephalitis. These can manifest with exclusively psychiatric symptoms (for example, depression, psychosis, suicidal behavior), without characteristic neurological symptoms and/or disorders of autonomic regulation. In some of these cases, the correct diagnosis of anti-NMDA receptor encephalitis was delayed by months, years or even decades. In addition, in recent decades, increasing evidence had accumulated that in some patients with so-called ‘classical’ mental disorders, such as schizophrenia, bipolar affective disorder, depressive disorders – and especially in those who show resistance to traditional psychopharmacotherapy – elevated titers of anti-NMDA receptor antibodies can be detected in their blood and/or in their cerebrospinal fluid. It has also been shown that elevated blood titers of anti-NMDA receptor antibodies are often detected in post-mortem examinations of suicide victims. Anti-NMDA receptor antibody titers in psychiatric patients correlate well with a recent history of suicide attempts and/or with current active suicidal ideation. Some of these patients may benefit from aggressive immunosuppressive therapy that is similar to the regimens normally used to treat ‘classical’ anti-NMDA receptor encephalitis with neurological and autonomic manifestations. This might stop their suicidal ideation and/or help in overcoming their resistance to psychopharmacotherapy. This article presents a description and analysis of three clinical cases of patients with various mental disorders, acute suicidality and elevated titers of anti-NMDA receptor antibodies, in whom such therapy has been effective.

*Keywords:* anti-NMDA receptor antibodies, suicidal behavior, autoimmune encephalitis, mental disorders, immunosuppressants, suicide prevention

## Введение

В 2005 году научный коллектив под руководством профессора Жозепа Обрадора Далмау впервые описал 10 случаев новой, ранее не известной формы аутоиммунного паранеопластического лимбического энцефалита, которая была ассоциирована с наличием тератомы яичника у молодых женщин и протекала с выраженными психиатрическими (аффективные колебания, бред, галлюцинации, кататония, нарушения памяти и когнитивных функций, нарушения сознания), неврологическими (дискинезии, судороги и др.) и вегетативными (нарушения дыхания и регуляции артериального давления, температуры тела, сердечного ритма) симптомами [19].

В 2007 году этот же коллектив ученых сумел показать, что проявления этой болезни связаны с наличием в крови и/или в ликворе пациенток аутоантител к NR1 субъединице NMDA глутаматергических рецепторов и что эти аутоантитела вызывают слипание нескольких рядом расположенных на клеточной мембране NMDA-рецепторов в один большой надмолекулярный агрегат, с последующей интернализацией этого агрегата (погружением его внутрь клетки) и снижением или утратой функции NMDA рецепторов. Эта форма аутоиммунного энцефалита была названа анти-NMDA-рецепторным энцефалитом, или «энцефалитом Далмау» [2].



На описанной в 2007 году более крупной выборке пациенток (35 случаев) они впервые отметили, что далеко не всегда анти-NMDA-рецепторный энцефалит имеет типичную клиническую динамику (сначала психиатрические симптомы, потом неврологические, потом грубые нарушения сознания и вегетативной регуляции; обратное развитие при улучшении состояния происходит тоже в обратном порядке) и может протекать только с психиатрической симптоматикой на протяжении всего периода болезни [2].

Кроме того, тогда же ими было впервые отмечено, что анти-NMDA-рецепторный энцефалит часто сопровождается выраженной суицидальностью, непропорциональной степени тяжести депрессии или психоза [2].

Это открытие привлекло большое внимание ученых всего мира. Вскоре было показано, что анти-NMDA рецепторный энцефалит встречается вовсе не только у молодых женщин, но и у мужчин, и у детей и подростков, и у пожилых людей обоего пола, и что он далеко не всегда связан с наличием тератомы яичника или другой опухоли [8, 14].

Триггером или предрасполагающим фактором для развития этой формы аутоиммунного энцефалита может быть, например, беременность или недавно перенесенная острая вирусная инфекция (например COVID-19, грипп или герпес, особенно герпетический энцефалит), или наличие какого-либо другого аутоиммунного заболевания (например ревматоидного артрита (РА) или рассеянного склероза) [3, 4, 7, 12, 21].

Более того, оказалось, что у некоторой части пациентов с, казалось бы, «чисто психиатрическими» заболеваниями (например шизофренией, биполярным аффективным расстройством (БАР), депрессивными расстройствами) обнаруживаются повышенные титры анти-NMDA-рецепторных антител в крови и/или в ликворе [11, 18]. Это особенно часто наблюдается у тех пациентов, которые считались резистентными к психофармакотерапии (ПФТ) [9, 16].

Также было показано, что у пациентов, умерших вследствие завершеного суицида – с повышенной, по сравнению с среднепопуляционным уровнем, частотой обнаруживаются повышенные титры анти-NMDA-рецепторных антител в крови и/или в ликворе [6, 10].

У пациентов с недавними суицидальными попытками в анамнезе или с сильной текущей суицидальной идеацией повышенные титры анти-NMDA-рецепторных антител тоже обнаруживаются статистически достоверно чаще, чем у пациентов с аналогичной степенью тяжести психической патологии (депрессии, психоза и т. п.), но без суицидальных попыток в недавнем анам-

незе и/или выраженной текущей суицидальной идеации [6, 10].

С другой же стороны, большое количество данных указывает на важную роль нарушений в работе NMDA глутаматергической системы в патогенезе суицидального поведения. Так, именно NMDA-рецепторному антагонизму приписывают сильное и быстро наступающее антисуицидальное влияние кетамина, комбинации декстрометорфана с хинидином, N-ацетилцистеина [5, 17, 22].

Аналогичную острую антисуицидальную активность бупренорфина, трамадола, оксикодона тоже связывают с косвенной опиоидной модуляцией активности NMDA глутаматергической системы, а не непосредственно с их каппа-антагонизмом и/или мю-агонизмом [1, 13, 15].

Давно и хорошо известную антисуицидальную активность препаратов лития и клозапина тоже связывают с их прямым (как в случае клозапина) или косвенным (как у лития) влиянием на NMDA глутаматергическую систему [23].

Отдельный интерес в рамках темы данной статьи представляет то, что антисуицидальная активность клозапина показана не только в контексте шизофрении, но и в контексте анти-NMDA-рецепторного энцефалита. Способность лития быстро купировать суицидальную идеацию и снижать риск суицидальных попыток тоже была продемонстрирована не только при БАР или униполярных депрессиях, но и при анти-NMDA-рецепторном энцефалите [20, 24].

На основе всех этих сходящихся данных некоторые авторы выдвигают достаточно радикально звучащую гипотезу о том, что по крайней мере часть случаев суицидального поведения может иметь аутоиммунный генез и может быть связана с наличием анти-NMDA-рецепторных антител в крови и/или в ликворе и что таких пациентов, возможно, следует пытаться лечить иммуномодуляторами по схемам, предназначенным для лечения анти-NMDA-рецепторного энцефалита [6, 10].

**Цель исследования** – представить описание трех клинических случаев пациентов с различными резистентными к ПФТ психическими расстройствами, выраженной суицидальностью и повышенными титрами анти-NMDA-рецепторных антител в крови, но без классических неврологических и/или вегетативных симптомов, нарушений сознания. В каждом из этих трех случаев иммуномодулирующая терапия, аналогичная той, которая рекомендуется при «классическом» анти-NMDA-рецепторном энцефалите, привела к быстрому купированию суицидальности, а затем и к ремиссии психического расстройства.

## Материалы и методы

В разное время наблюдались 3 пациента разного пола и возраста, с разными психиатрическими диагнозами, недостаточным или полностью отсутствующим ответом на стандартную ПФТ и выраженной суицидальностью в картине болезни.

Пациентка № 1 – 22-летняя, ранее психически и соматически здоровая женщина с первой беременностью. К сроку 16 недель ухудшилось психическое и физическое самочувствие. Женщина много времени проводила в постели, проявляла подозрительность, недоверчивость, необоснованную ревность, раздражительность и нетерпение по отношению к мужу, много плакала. Затем начала высказывать суицидальные намерения, явно бредовые идеи отношения и ревности, а также «разговаривать с сущностями», которых никто, кроме нее, не видел. Была госпитализирована в психиатрический стационар, расценена как страдающая от первого в жизни эпизода шизоаффективного расстройства (ШАР). Лечение антипсихотиками (АП) не давало эффекта и плохо переносилось из-за выраженных явлений экстрапирамидного синдрома (ЭПС).

Пациент № 2 – 16-летний подросток с установленными ранее диагнозами «ювенильного ревматоидного артрита» (ЮРА) и «терапевтически резистентной шизофрении» (ТРШ) и стажем заболевания около 2 лет. К моменту обращения с родителями за консультацией получал по линии ЮРА метотрексат (15 мг в неделю) и этодолак (600-1000 мг/сут в зависимости от интенсивности болей в суставах), а по линии ТРШ – клозапин (350 мг/сут). Имел в анамнезе 2 неудавшиеся суицидальные попытки. В разговоре признал, что не оставляет намерения «когда-нибудь все же добиться своего».

Пациент № 3 – 30-летний мужчина, перенесший амбулаторно COVID-19 в сравнительно легкой форме. После выздоровления от острой фазы заболевания стал предъявлять жалобы на сильную тоску, подавленность, разбитость, «нежелание жить», нарушения памяти, концентрации внимания и когнитивного функционирования, суицидальные мысли. Обращался с этими жалобами к двум разным психиатрам, получал назначения антидепрессантов (АД) – флувоксамина (до 300 мг/сут), амитриптилина (до 100 мг/сут), венлафаксина (до 150 мг/сут) – без особого эффекта.

## Результаты и обсуждение

Среди прочих исследований, которые порекомендовал провести консультант в каждом из этих трех случаев – был и анализ на титр анти-NMDA-рецепторных антител в плазме крови. Основ-

анием для такой рекомендации было отсутствие эффекта от ПФТ или ее плохая переносимость, а также наличие в каждом из этих трех случаев известных провоцирующих факторов развития анти-NMDA рецепторного энцефалита (беременность, наличие коморбидного аутоиммунного заболевания, недавно перенесенная вирусная инфекция).

Во всех трех случаях он оказался резко повышенным (1:320 у пациентки № 1 и у пациента № 2, 1:64 у пациента № 3 при норме до 1:20).

При поиске причин, которые могли бы объяснить наличие высокого титра анти-NMDA-антител, у пациентки № 1 при ультразвуковом исследовании (УЗИ) органов брюшной полости было найдено образование правого яичника до 5 мм в диаметре. На УЗИ его не смогли дифференцировать между функциональной кистой и тератомой. При диагностической лапароскопии было подтверждено наличие тератомы, проведено ее оперативное удаление. Гистологически опухоль оказалась доброкачественной, зрелой тератомой.

Параллельно с этим женщина получила терапию первой линии анти-NMDA-рецепторного энцефалита: 5 плазмаферезов с интервалами 3 дня, инфузии метилпреднизолона 1000 мг 3 дня подряд, 4 инфузии ритуксимаба 375 мг/м<sup>2</sup> (400 мг на инфузию) с интервалами 7 дней. Лечение привело к быстрому купированию суицидальности (уже после первого плазмафереза), а затем – к полной ремиссии всей психотической и депрессивной симптоматики, снижению титров анти-NMDA-антител до неопределяемого уровня. Пациентка родила здорового мальчика весом 2750 г на 39-й неделе.

У пациента № 2 лечение состояло из 5 сеансов полнообъемного плазмафереза с интервалами 7 дней, а также 4 инфузий ритуксимаба в дозе 375 мг/м<sup>2</sup> (500 мг на инфузию) с интервалами 7 дней.

Впоследствии подросток был переведен ревматологом на терапию инфликсимабом. На этом фоне он смог достичь ремиссии шизофрении, оставаясь на прежней дозе клозапина (350 мг/сут). Суицидальные мысли дезактуализировались. Титр анти-NMDA-антител снизился до нормы (1:16 в анализе от июня 2023 г.).

Пациенту № 3 был рекомендован однократный полнообъемный плазмаферез, затем однократная инфузия тоцилизумаба (антагониста интерлейкина-6) – в дозе 8 мг/кг (600 мг на инфузию) и затем – короткий курс высоких доз пероральных глюкокортикоидов – ГК (60 мг/сут преднизолона на 2 недели, с последующим плавным снижением до 0).

Выбор именно такого режима иммуносупрессии у пациента № 3 был обусловлен тем, что и в отношении тоцилизумаба, и в отношении ГК имеются предварительные данные об их эффективности при затяжном постковидном синдроме (они входят в экспериментальный протокол I-RECOVER). В то же время оба этих препарата имеют доказанную эффективность и при «классическом» анти-NMDA-рецепторном энцефалите.

Проведение плазмафереза, последующее введение тоцилизумаба и начало курса ГК привело к быстрой (в течение нескольких дней) редукции суицидальности и депрессивной симптоматики у пациента №3, причем вообще без применения каких-либо психотропных средств. К моменту окончания курса ГК молодой человек находился в состоянии полной клинической ремиссии по линии депрессии. Титр анти-NMDA-рецепторных антител в крови также нормализовался (1:8 в анализе, проведенном в марте 2023 г., спустя 3 месяца после завершения курса ГК).

## Заключение

Данные три клинических случая, на наш взгляд, показывают, что в круг тех обследо-

ваний, которые следует предпринять у пациентов с острой суицидальностью на фоне различных психических патологий, желательно включать и определение титра анти-NMDA-рецепторных антител в крови.

Особенно важно это у тех пациентов, у которых по анамнезу известно наличие таких предрасполагающих к развитию «классического» анти-NMDA-рецепторного энцефалита или к «неврологически бессимптомному» повышению титра анти-NMDA рецепторных антител факторов, как беременность (случай пациентки №1), злокачественные опухоли, недавно перенесенная вирусная инфекция (например, как в случае пациента № 3, COVID-19), коморбидные аутоиммунные заболевания (например, как у пациента № 2, ЮРА).

В случаях с повышенными титрами анти-NMDA-рецепторных антител — энергичная иммуносупрессивная терапия, аналогичная той, которая применяется при «классическом» анти-NMDA-рецепторном энцефалите, может помочь быстро купировать суицидальность.

## Список литературы / References

1. Cameron C.M., Nieto S., Bosler L., Wong M., Bishop I., Mooney L., Cahill C.M. Mechanisms underlying the anti-suicidal treatment potential of buprenorphine. *Adv. Drug. Alcohol. Res.*, 2021, Vol. 1, 10009. doi: 10.3389/adar.2021.10009.
2. Dalmau J., Tüzün E., Wu H., Masjuan J., Rossi J.E., Voloschin A., Baehring J.M., Shimazaki H., Koide R., King D., Mason W., Sansing L.H., Dichter M.A., Rosenfeld M.R., Lynch D.R. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann. Neurol.*, 2007, Vol. 61, no. 1, pp. 25-36.
3. Dalmau J. Pregnancy, N-methyl-D-aspartate receptor antibodies, and neuropsychiatric diseases. *Ann. Neurol.*, 2020, Vol. 87, no. 2, pp. 324-325.
4. Gulec B., Kurucu H., Bozbay S., Dikmen Y., Sayman H., Tuzun E., Tutuncu M., Uygunoglu U., Yalcinkaya C., Saip S., Siva A. Co-existence of multiple sclerosis and anti-NMDA receptor encephalitis: A case report and review of literature. *Mult. Scler. Relat. Disord.*, 2020, Vol. 42, 102075. doi: 10.1016/j.msard.2020.102075.
5. Hans D., Rengel A., Hans J., Bassett D., Hood S. N-Acetylcysteine as a novel rapidly acting anti-suicidal agent: A pilot naturalistic study in the emergency setting. *PLoS One*, 2022, Vol. 17, no. 1, e0263149. doi: 10.1371/journal.pone.0263149.
6. Hansen N., Timäus C. Autoimmune encephalitis with psychiatric features in adults: historical evolution and prospective challenge. *J. Neural Transm. (Vienna)*, 2021, Vol. 128, no. 1, pp. 1-14.
7. Ide T., Kawanami T., Tada Y., Eriguchi M. Overlapping rheumatoid meningitis with anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: A case report. *Clin. Case Rep.*, 2023, Vol. 11, no. 4, e7199. doi: 10.1002/ccr3.7199.
8. Jaka S., Singh S., Vashist S., Pokhrel S., Saldana E., Sejdiu A., Taneja S., Arisoyin A., Mogallapu R., Gunturu S., Bachu A., Patel R.S. Pediatric anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis: Exploring psychosis, related risk factors, and hospital outcomes in a nationwide inpatient sample: A cross-sectional study. *PLoS One*, 2024, Vol. 19, no. 2, e0296870. doi: 10.1371/journal.pone.0296870.
9. Kelleher E., McNamara P., Dunne J., Fitzmaurice B., Heron E.A., Whitty P., Walsh R., Mooney C., Hogan D., Conlon N., Gill M., Vincent A., Doherty C.P., Corvin A. Prevalence of N-methyl-d-aspartate receptor antibody (NMDAR-Ab) encephalitis in patients with first episode psychosis and treatment resistant schizophrenia on clozapine, a population based study. *Schizophr. Res.*, 2020, Vol. 222, pp. 455-461.
10. Kruse J.L., Lapid M.I., Lennon V.A., Klein C.J., Toole O.O., Pittock S.J., Strand E.A., Frye M.A., McKeon A. Psychiatric autoimmunity: N-methyl-D-aspartate receptor IgG and beyond. *Psychosomatics*, 2015, Vol. 56, no. 3, pp. 227-241.

11. León-Caballero J., Pacchiarotti I., Murru A., Valentí M., Colom F., Benach B., Pérez V., Dalmau J., Vieta E. Bipolar disorder and antibodies against the N-methyl-D-aspartate receptor: A gate to the involvement of autoimmunity in the pathophysiology of bipolar illness. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2015, Vol. 55, pp. 403-412.
12. Leyboldt F., Titulaer M.J., Aguilar E., Walther J., Bönstrup M., Havemeister S., Teegen B., Lütgehetmann M., Rosenkranz M., Magnus T., Dalmau J. Herpes simplex virus-1 encephalitis can trigger anti-NMDA receptor encephalitis: case report. *Neurology*, 2013, Vol. 81, no. 18, pp. 1637-1639.
13. Magen E., Geishin A., Lauden A. Rapid Improvement of treatment-resistant major depression during the administration of low-dose oxycodone. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 2021, Vol. 41, no. 1, pp. 81-83.
14. Rainey K., Gholkar B., Cheesman M. Anti-NMDA receptor encephalitis: an easily missed diagnosis in older patients. *Age Ageing*, 2014, Vol. 43, no. 5, pp. 725-726.
15. Reeves R.R., Cox S.K. Similar effects of tramadol and venlafaxine in major depressive disorder. *South Med. J.*, 2008, Vol. 101, no. 2, pp. 193-195.
16. Senda M., Bessho K., Oshima E., Sakamoto S., Tanaka K., Tsutsui K., Kanbayashi T., Takaki M., Yoshimura B. Anti-inflammatory therapy and immunotherapy were partially effective in a patient with anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies and a special subgroup of treatment-resistant schizophrenia. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 2016, Vol. 36, no. 1, pp. 92-93.
17. Singh B., Voort J.V., Pazdernik V.K., Frye M.A., Kung S. Treatment-resistant depression patients with baseline suicidal ideation required more treatments to achieve therapeutic response with ketamine/esketamine. *J. Affect. Disord.*, 2024, Vol. 351, pp. 534-540.
18. Tong J., Huang J., Luo X., Chen S., Cui Y., An H., Xiu M., Tan S., Wang Z., Yuan Y., Zhang J., Yang F., Li C.R., Hong L.E., Tan Y. Elevated serum anti-NMDA receptor antibody levels in first-episode patients with schizophrenia. *Brain Behav. Immun.*, 2019, Vol. 81, pp. 213-219.
19. Vitaliani R., Mason W., Ances B., Zwerdling T., Jiang Z., Dalmau J. Paraneoplastic encephalitis, psychiatric symptoms, and hypoventilation in ovarian teratoma. *Ann. Neurol.*, 2005, Vol. 58, no. 4, pp. 594-604.
20. Wallengren S., Johansson B.A., Rask O. Acute manic state with psychotic features in a teenager with autoimmune encephalitis: a case report. *J. Med. Case Rep.*, 2021, Vol. 15, no. 1, 295. doi: 10.1186/s13256-021-02879-2.
21. Wang H. COVID-19, Anti-NMDA Receptor Encephalitis and MicroRNA. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 825103. doi: 10.3389/fimmu.2022.825103.
22. Wang P.R., Yavi M., Lee H., Kotb Y., Shora L., Park L.T., Zarate C.A. Jr. An open-label study of adjunctive dextromethorphan/quinidine in treatment-resistant depression. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 2023, Vol. 43, no. 5, pp. 422-427.
23. Wasserman D. Oxford textbook of suicidology and suicide prevention. Oxford University Press, 2021. 2<sup>nd</sup> Ed. 856 p.
24. Yang P., Li L., Xia S., Zhou B., Zhu Y., Zhou G., Tu E., Huang T., Huang H., Li F. Effect of clozapine on anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis with psychiatric symptoms: a series of three cases. *Front. Neurosci.*, 2019, Vol. 13, 315. doi: 10.3389/fnins.2019.00315.

---

**Авторы:**

**Быков Ю.В.** — к.м.н., доцент, кафедра анестезиологии и реаниматологии с курсом ДПО ФГБОУ «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ставрополь, Россия

**Быкова А.Ю.** — ординатор кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ФГБОУ «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ставрополь, Россия

**Беккер Р.А.** — магистр компьютерных наук, научный сотрудник лаборатории автономных роботов факультета электроники и компьютерных наук, Университет имени Давида Бен-Гуриона в Негеве, г. Беэр-Шева, Израиль

---

**Authors:**

**Bykov Yu.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Anesthesiology and Reanimatology, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

**Bykova A.Yu.**, Ordinator, Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

**Bekker R.A.**, M.Sc. in Computer Sciences, Research Associate, Laboratory of Autonomous Robotics, Department of Electronic Engineering and Computer Sciences, David Ben-Gurion University at Negev, Beer-Sheba, Israel

---

Поступила 10.03.2024  
Принята к печати 17.03.2024

---

Received 10.03.2024  
Accepted 17.03.2024

## ЦЕНТРАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ МОДУЛИРОВАННЫХ EX VIVO КОФЕИНОМ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В МЕХАНИЗМАХ РЕДАКТИРОВАНИЯ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОГО ПОВЕДЕНИЯ

Маркова Е.В., Княжева М.А.

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

**Резюме.** Депрессия является серьезной медико-социальной проблемой в силу большой распространенности, вовлеченности лиц трудоспособного возраста и отсутствия высокоэффективной терапии. Социальные стрессорные факторы способствуют распространенности депрессии. Пандемия COVID-19 и связанные с ней правила социального дистанцирования, военные столкновения, ухудшение экономической ситуации могут приводить к болезненной «ломке» социально-биологических механизмов адаптации и способствовать увеличению распространенности депрессивных расстройств, которые, по прогнозам ВОЗ, к 2030 году могут занять второе место в структуре причин нетрудоспособности, что обуславливает интерес к исследованию данной проблемы и поиску новых эффективных подходов к терапии. Патогенез депрессивных состояний до конца не изучен, тем не менее многочисленные факты указывают на важную роль нарушения процессов нейроиммунного взаимодействия. Снижение когнитивных функций при депрессивных расстройствах вызвано нейровоспалительными и нейродегенеративными изменениями. Последние преимущественно регистрируются в гиппокампе, многочисленные изменения пластичности которого наблюдались как у пациентов с клинической депрессией, так и при моделировании депрессии на грызунах. Имеется также достаточное количество данных о существенной роли иммунокомпетентных клеток и продуцируемых ими цитокинов при депрессии, в том числе в формировании характерного поведенческого фенотипа. Ранее нами было показано, что иммунокомпетентные клетки селезенки депрессивно-подобных мышей после обработки *ex vivo* кофеином, психоактивным препаратом с широким спектром иммуномодулирующих свойств изменяют свою функциональную активность и после внутривенного введения сингенным депрессивно-подобным реципиентам оказывают редактирующий депрессивно-подобное поведение эффект. Целью настоящей работы было исследовать центральные эффекты модулированных кофеином иммунокомпетентных клеток селезенки в механизмах редактирования депрессивно-подобного поведения. Установлено, что у депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации сингенных спленоцитов, *ex vivo* модулированных кофеином, отмечается увеличение

### Адрес для переписки:

Маркова Евгения Валерьевна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
клинической и фундаментальной иммунологии»,  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (903) 934-67-86.  
Факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail: evgeniya\_markova@mail.ru

### Address for correspondence:

Evgeniya V. Markova  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
14 Yadrintsevskaya St  
Novosibirsk  
630099 Russian Federation  
Phone: +7 (903) 934-67-86.  
Fax: +7 (383) 222-70-28.  
E-mail: evgeniya\_markova@mail.ru

### Образец цитирования:

Е.В. Маркова, М.А. Княжева «Центральные  
эффекты модулированных *ex vivo* кофеином  
иммунокомпетентных клеток в механизмах  
редактирования депрессивно-подобного поведения»  
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,  
№ 2. С. 335-342.  
doi: 10.46235/1028-7221-16621-CEO  
© Маркова Е.В., Княжева М.А., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

E.V. Markova, M.A. Knyazheva “Central effects of *ex vivo*  
caffeine-modulated immune cells in the mechanisms of editing  
depressive-like behavior”, *Russian Journal of Immunology/  
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*, 2024, Vol. 27, no. 2,  
pp. 335-342.  
doi: 10.46235/1028-7221-16621-CEO  
© Markova E.V., Knyazheva M.A., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.46235/1028-7221-16621-CEO

плотности пирамидных нейронов в CA1 и CA3 зонах гиппокампа, сопровождающееся повышением уровня BDNF в гиппокампе и префронтальной коре на фоне снижения содержания ряда провоспалительных (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ) и повышения уровней противовоспалительных (IL-10 и IL-4) цитокинов в патогенетически значимых для состояния депрессивности структурах головного мозга (гиппокампе, гипоталамусе, префронтальной коре и стриатуме). Обсуждаются механизмы выявленных структурных и функциональных изменений в мозге реципиентов после трансплантации, модулированных кофеином спленоцитов, включая их возможное непосредственное влияние, подтверждением чему служит визуализация трансплантированных клеток в паренхиме головного мозга депрессивно-подобных реципиентов.

*Ключевые слова:* депрессивно-подобное состояние, модулированные иммунокомпетентные клетки, структуры головного мозга, пирамидные нейроны, нейротрофический фактор головного мозга, цитокины

## CENTRAL EFFECTS OF *EX VIVO* CAFFEINE-MODULATED IMMUNE CELLS IN THE MECHANISMS OF EDITING DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOR

Markova E.V., Knyazheva M.A.

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

**Abstract.** Depression is a serious medical and social problem due to its high prevalence, involvement of people of working age and lack of highly effective therapy. Social stressors contribute to the prevalence of depression. The COVID-19 pandemic and the associated rules of social distancing, military clashes, and a deteriorating economic situation can lead to a painful “breakdown” of socio-biological adaptation mechanisms and contribute to an increase in the prevalence of depressive disorders, which, according to WHO forecasts, may take second place in the world by 2030, which leads to interest in studying this problem and finding new effective approaches to therapy. Decreased cognitive function in depressive disorders is caused by neuroinflammatory and neurodegenerative changes. The latter are predominantly recorded in the hippocampus, numerous changes in the plasticity of which have been observed both in patients with clinical depression and in rodent models of depression. There is also a sufficient amount of data on the significant role of immune cells and their cytokines in depression, including in the development of behavioral phenotype. We have previously shown that spleen cells of depressive-like mice after *ex vivo* treatment with caffeine, a psychoactive drug with a wide range of immunomodulatory properties, change their functional activity and, after intravenous administration to syngeneic depressive-like recipients, have editing depressive-like behavior effect. The purpose of this work was to investigate the central effects of caffeine-modulated spleen cells in the mechanisms of editing depressive-like behavior. It was found that in depressive-like recipients after transplantation of syngeneic caffeine-modulated splenocytes, there is an increase in the density of neurons in the CA1 and CA3 zones of the hippocampus, accompanied by BDNF level increase in the hippocampus and prefrontal cortex against the background of a decrease of a number of pro-inflammatory (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ ) and increased of anti-inflammatory (IL-10 and IL-4) cytokines in brain structures pathogenetically significant for the state of depression. The mechanisms of the identified structural and functional changes in the recipient’s brain after the caffeine-modulated splenocytes transplantation are discussed, including their possible direct influence, confirmed by visualization of transplanted cells in the brain parenchyma of depressed-like recipients.

*Keywords:* depressive-like state, modulated immune cells, brain structures, pyramidal neurons, brain-derived neurotrophic factor, cytokines

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований НИИФКИ.

### Введение

Большая депрессия – это распространенное, а иногда и смертельное расстройство, обозна-

ченное Всемирной организацией здравоохранения как ведущая причина инвалидности во всем мире (World Health Organization, 2021. Depression. Accessed on April, 4, 2022). Депрессия серьезно влияет на здоровье и качество жизни человека, что не ограничивается чрезмерными негативными эмоциями, ангедонией и когнитивными

нарушениями. Современные антидепрессанты, несомненно, являются эффективным лечением примерно в 70% случаев, что является значительным, однако, часть пациентов остаются частично или полностью невосприимчивыми к лечению. И это, скорее всего, не просто объясняется резистентностью к лечению, существует вероятность того, что современные антидепрессанты неэффективно воздействуют на все патофизиологические процессы, ответственные за основные симптомы депрессии, что обуславливает интерес к исследованию данной проблемы и поиску новых эффективных подходов к терапии.

Регуляторные двусторонние взаимодействия между иммунной системой и мозгом привлекают значительное внимание к роли иммунной системы при нервно-психических заболеваниях, особенно при депрессии. Установлено, что хронический стресс, вызывающий изменения в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе и иммунной системе, тесно связан с развитием депрессивных расстройств, действуя как триггер тревоги и депрессии [4, 5, 6, 14]. Иммунная система играет важную роль в патологических изменениях, возникающих при депрессии. Изменения как клеточных, так и гуморальных иммунных реакций были показаны у пациентов с большой депрессией, начиная со снижения активности естественных киллеров, количества и пролиферативной активности лимфоцитов с последующими признаками повышенной воспалительной активности (повышение уровней циркулирующих маркеров воспаления). По современным представлениям большая депрессия позиционируется, в частности, как хронический низкоградиентный воспалительный процесс. При моделировании состояния депрессивности на грызунах также показан провоспалительный эффект хронического социального стресса, проявляющийся в повышении продукции ряда провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками; повышении резистентности миелоидных клеток к глюкокортикоидам; усилении миелоидной дифференцировки и мобилизации моноцитов из костного мозга в циркуляцию и их миграцию как на периферию, так и в головной мозг с последующей активацией микроглии и развитием нейровоспаления [3, 6, 9, 14], что раскрывает иммуно-опосредованные механизмы влияния периферических иммунных клеток на поведенческие реакции [4, 5]. Снижение когнитивных функций при депрессивных расстройствах вызвано как нейровоспалительными, так и нейродегенеративными изменениями в головном мозге. Провоспалительные цитокины и медиаторы воспаления, такие как оксид азота, активируют глутаматергическую систему

мозга, окислительный стресс и индукцию апоптоза в нейронах, астроцитах и олигодендроцитах. Нейродегенеративные изменения наблюдаются в префронтальной коре и преимущественно в гиппокампе, структуре мозга, играющей решающую роль в генез симптомов депрессии [6, 8, 9], и проявляются в изменении его пластичности [5, 6, 8, 9, 14, 15], что в свою очередь влияет на целостность нейрональной сети гиппокампа, ослабляя его ограничивающее влияние на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему и, следовательно, пролонгированному ответу на психологические стрессоры [5, 14, 15]. Имеется достаточное количество данных о существенной роли иммунных клеток и продуцируемых ими цитокинов при стрессе и депрессии, в том числе в развитии депрессивного поведенческого фенотипа [4, 5, 7, 9, 14]. Ранее нами было показано, что иммунокомпетентные клетки селезенки депрессивно-подобных мышей после обработки *ex vivo* кофеином, психоактивным препаратом с иммуномодулирующими свойствами изменяют свою функциональную активность и после внутривенного введения сингенным депрессивно-подобным реципиентам оказывают иммуномодулирующий эффект, сопровождающийся редактированием характерных для состояния депрессивности поведенческих паттернов (снижение ангедонии, стимуляция ориентировочно-исследовательского поведения, стимуляция двигательной активности в тесте «Принудительное плавание») [1, 2, 10, 11].

**Целью настоящей работы** было исследовать центральные механизмы редактирования депрессивно-подобного поведения модулированными кофеином иммунокомпетентными клетками селезенки.

## Материалы и методы

В исследованиях использовались мыши-самцы (СВА × С57BL/6) F1 в возрасте 3-3,5 месяцев, массой 25-30 г, полученные из питомника НИЛЭМ (г. Томск). Животных содержали в лабораторном виварии в стандартных условиях на стандартном рационе, со свободным доступом к воде и естественным световым режимом. Исследования с животными проводились в соответствии с законодательными актами Российской Федерации, Европейского парламента и совета Европейского Союза, декларирующими правила обращения с животными, используемыми в научных целях, и были одобрены на заседании локально-этического комитета НИИФКИ (протокол заседания № 139 от 30.05.2022 г.).

Депрессивно-подобное состояние формировалось у пассивных самцов (n = 78) в результате длительного (20 дней) социального стресса (клас-

сическая модель депрессии). Затем депрессивно-подобных самцов изолировали в отдельные клетки, чтобы избежать агонистического взаимодействия, и им трансплантировали прекультивированные с кофеином клетки селезенки ( $15 \times 10^6$  клеток в объеме 0,3 мл физраствора на мышь), взятые от сингенных депрессивно-подобных доноров, как это было подробно описано ранее [1, 10, 11]. В контрольной группе депрессивно-подобных реципиентов подготовку и трансплантацию клеток реализовали в аналогичных условиях эксперимента, за исключением того, что спленоциты прекультивировались без кофеина.

Всех реципиентов через 48 часов после введения клеток усыпляли в камере с  $\text{CO}_2$ ; транкардиально перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS), а затем 4%-ным параформальдегидом в PBS. Быстро извлекали головной мозг, его обезвоживали 40%-ным раствором сахарозы в  $1 \times \text{PBS}$  с 4%-ным параформальдегидом, замораживали в среде О.С.Т и хранили при температуре  $-70^\circ\text{C}$ . Криосрезы гиппокампа толщиной 30 мкм были получены при помощи криотома HistoSafeMicroCut – SADV (Китай). Окрашивание по Нисслию проводили по стандартной процедуре (Paxinos and Franklin, 2019). Изображение было получено и проанализировано с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ci (Nikon, Япония), соединенного с камерой Nikon DS-Fi2 (Nikon, Япония) и программным обеспечением Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, CA, США). Нейрональную площадь гиппокампа определяли полуквантитативным методом.

В лизатах отдельных структур мозга реципиентов измеряли уровни BDNF и патогенетически значимых для депрессии цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10) методом ИФА с использованием соответствующих тест-систем (R&D Systems, Великобритания) согласно инструкциям производителя.

Перед внутривенным введением прекультивированных с кофеином спленоцитов была произведена их окраска витальным красителем CFSE (Invitrogen, США) для последующей визуализации клеток в паренхиме головного мозга депрессивно-подобных реципиентов, которая была проведена через 48 часов после клеточной трансплантации. Цитометрический анализ проводили с помощью проточного цитофлюориметра BD FACSVerser и программного обеспечения BD FACSuite.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием парного теста Манна–Уитни (программное обеспечение Statistica для Windows 10.0). Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка средне-

го значения. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Как упоминалось выше, нейродегенеративные изменения в гиппокампе рассматриваются как один из патогенетических механизмов когнитивных нарушений при депрессии. Клинические исследования и результаты нейровизуализации показали, что объем гиппокампа пациентов при депрессии снижается; подобные результаты наблюдались и на экспериментальных моделях: хронический стресс уменьшает объем гиппокампа за счет апоптоза пирамидных нейронов преимущественно в CA1 и CA3 регионах и ингибирует нейрогенез у крыс [5, 12, 15].

В результате проведенных исследований нами установлено, что плотность пирамидных нейронов в указанных регионах была существенно выше у депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином сингенных клеток селезенки (рис. 1).

Полный цикл нейрогенеза занимает не менее 35–45 дней для функциональной интеграции новообразованных нейронов в сети гиппокампа. Поскольку увеличение плотности нейронов в CA1 и CA3 регионах гиппокампа наблюдалось нами значительно раньше, то, скорее всего, оно обусловлено влиянием введенных иммунокомпетентных клеток на нейроны, находящиеся на поздних стадиях нейрогенеза и/или выживание нейронов.

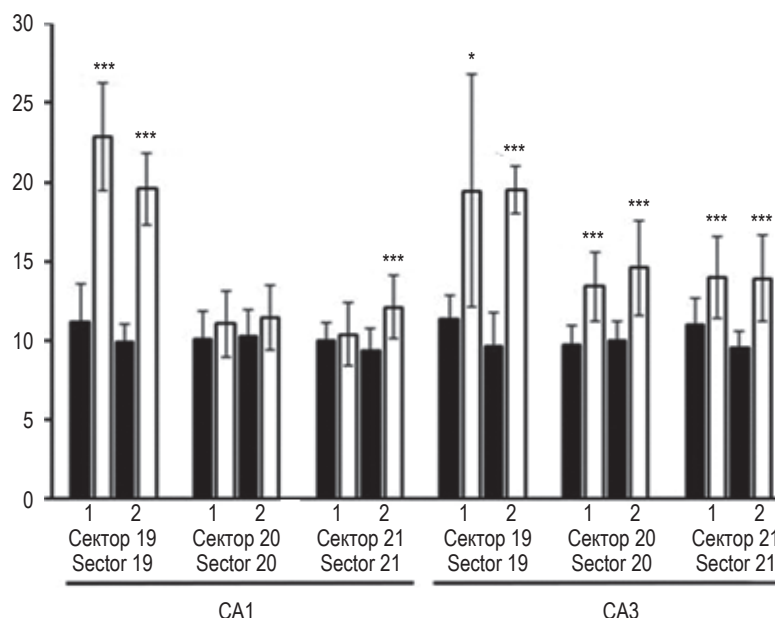
Хорошо известно, что нейротрофические факторы, в частности наиболее широко представленный в головном мозге BDNF (brain-derived neurotrophic factor), играют значительную роль в развитии, дифференцировке, синаптогенезе и выживании нейронов, равно как и в процессах их адаптации к внешним воздействиям [12, 14, 15]. Нарушения метаболизма, транспорта или передачи сигналов BDNF занимают существенное место в патогенезе депрессивных расстройств [12, 14]. Имеются данные о том, что нейродегенеративные процессы при депрессивных расстройствах частично обратимы на фоне успешной терапии препаратами, обладающими нейротрофическими свойствами; при этом восстановление ткани и функций мозга связывают с образованием новых нейронов из стволовых клеток [5, 8, 15]. В связи с этим у депрессивно-подобных реципиентов было исследовано количественное содержание BDNF в отдельных структурах головного мозга, наиболее подверженных, как указывалось выше, дегенеративным изменениям при депрессии. Анализ полученных результатов показал, что повышение плотности пирамидных нейронов в CA1 и CA3 регионах гиппокампа у сингенных депрессивно-



подобных реципиентов после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином спленоцитов сопровождалось также и повышением уровня BDNF, как в этой структуре мозга, так и в префронтальной коре (табл. 1). Полученные результаты, демонстрирующие стимуляцию нейрогенеза и повышение уровня BDNF в патогенетически значимых для состояния депрессивности структурах мозга, свидетельствуют о стимуляции процессов нейропластичности у депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином сингенных клеток селезенки.

Важное место в патогенезе депрессии, в том числе в развитии депрессивно-подобного поведения, также принадлежит, как уже указывалось выше, провоспалительным цитокинам [5, 6, 7, 9, 14]. Более того, изменения объема гиппокампа

при депрессии связаны с нейровоспалительными изменениями. Провоспалительные цитокины изменяют нейрохимический баланс в мозге; они снижают уровень BDNF и могут отрицательно влиять на нейрогенез и нейропластичность за счет взаимодействия с BDNF-связывающими рецепторами (рецепторами TrkB); а также, посредством влияния на систему глутамата, снижают нейротрансмиссию и повышают эксайтотоксичность [4, 5, 6, 9, 14, 15], вовлекаясь тем самым в патофизиологические механизмы депрессии. Нами было показано, что у депрессивно-подобных реципиентов изменялось количественное содержание ряда цитокинов, являющихся маркерами состояния депрессивности, в отдельных структурах головного мозга, связанных с депрессией, при этом наибольшие изменения регистрировались в гиппокампе, где выявлено сниже-



**Рисунок 1. Нейрональная площадь (%) CA1 и CA3 регионов гиппокампа депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации сингенных спленоцитов, модулированных *ex vivo* кофеином**

Примечание. Цифровое обозначение секторов полей CA1, CA3 гиппокампа соответствует уровням срезов относительно брегмы, согласно гистологическому атласу мозга мыши (по Paxinos G., Franklin K.B.J. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates, 2013). По оси ординат – нейрональная плотность (%). Темные столбики – контрольная группа депрессивно-подобных реципиентов, которым была произведена трансплантация спленоцитов, прекультивированных без кофеина. Светлые столбики – опытная группа депрессивно-подобных реципиентов, которым была произведена трансплантация спленоцитов, прекультивированных с кофеином. 1 – левое полушарие мозга; 2 – правое полушарие мозга; n = 10-18 в каждой группе; \* – p < 0,05, \*\*\* – p < 0,001 между показателями в контрольном и опытном образцах.

Figure 1. Neuronal area (%) of hippocampus CA1 and CA3 regions in depressed-like recipients after transplantation of syngeneic splenocytes modulated *ex vivo* by caffeine

Note. The digital designation of sectors of fields CA1, CA3 of the hippocampus corresponds to the levels of sections relative to bregma, according to the histological atlas of the mouse brain (according to Paxinos G., Franklin K.B.J. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates, 2013). The y-axis is neuronal density (%). Dark bars represent a control group of depressive-like recipients who underwent transplantation of splenocytes precultured without caffeine. Light bars, an experimental group of depressive-like recipients who underwent transplantation of splenocytes precultured with caffeine. 1, left hemisphere of the brain; 2, right hemisphere of the brain; n = 10-18 in each group; \*, p < 0.05; \*\*\*, p < 0.001 between the indicators in the control and experimental samples.

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ BDNF (пг/мг ТКАНИ) В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНЫХ РЕЦИПИЕНТОВ (CBA × C57Bl/6) F1 ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СИНГЕННЫХ СПЛЕНОЦИТОВ, МОДУЛИРОВАННЫХ EX VIVO КОФЕИНОМ**

TABLE 1. BDNF CONTENT (pg/mg TISSUE) IN THE BRAIN STRUCTURES OF DEPRESSIVE-LIKE RECIPIENTS (CBA × C57Bl/6) F1 AFTER TRANSPLANTATION OF SYNGENEIC SPLENOCYTES MODULATED EX VIVO BY CAFFEINE

Структура мозга Brain structure	Контроль Control	Опыт Experience
Гиппокамп Hippocampus	347,5±97,8	587,9±96,7*
Префронтальная кора Prefrontal cortex	121,2±72,3	267,5±65,8*

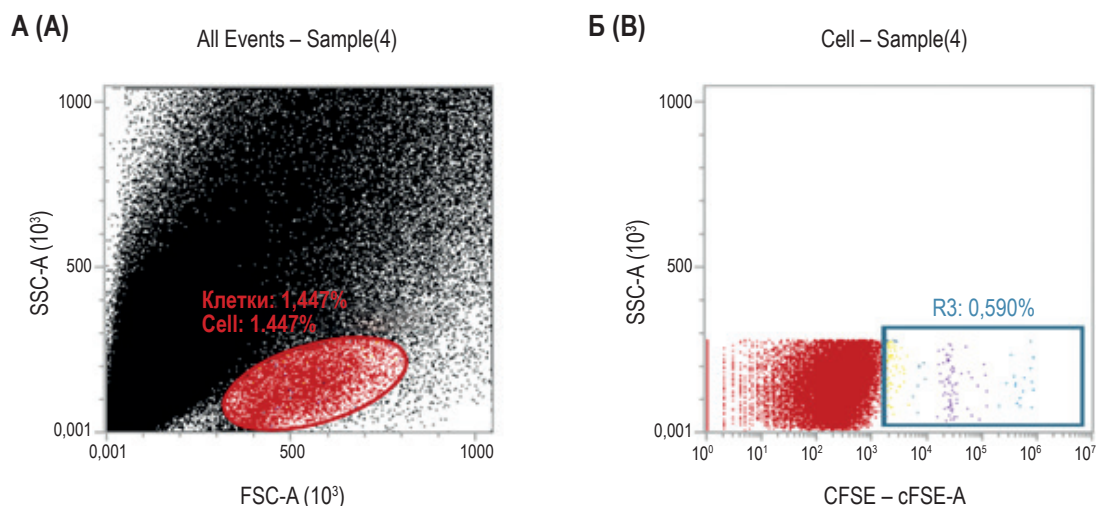
Примечание. Контроль – образцы лизатов соответствующей структуры головного мозга депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации прекультивированных без кофеина спленоцитов. Опыт – образцы лизатов соответствующей структуры головного мозга депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации прекультивированных с кофеином спленоцитов; n = 10 в каждой группе; \* – p < 0,05 между соответствующими показателями в контрольном и опытном образцах.

Note. Control, lysates samples of the corresponding brain structure of depressed-like recipients after transplantation of splenocytes precultured without caffeine. Experience, lysates samples of the corresponding brain structure of depressed-like recipients after transplantation of splenocytes precultured with caffeine; n = 10 in each group; \*, p < 0.05 between the corresponding indicators in the control and experimental samples.

ние провоспалительных цитокинов IFN $\gamma$ , IL-6, TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , при повышении противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10; в гипоталамусе наблюдалось снижение IFN $\gamma$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ; в префронтальной коре регистрировалось снижение IFN $\gamma$ ; а в стриатуме – повышение IL-10 [1, 2, 11],

что свидетельствует о снижении нейровоспаления.

Известно также, что не только цитокины, но и продуцирующие их клетки способны проникать в головной мозг и изменять его функции, включая поведенческие реакции, путем непосредственно-



**Рисунок 2. Лимфоцитарная фракция клеток мозга депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации модулированных ex vivo кофеином и меченных CFSE сингенных спленоцитов**

Примечание. А – диаграмма фронтального-бокового рассеяния, [cell] – область лимфоцитарного облака; Б – диаграмма бокового рассеяния против CFSE, гейтирована по области [cell] цитогаммы А, предназначена для выявления относительного содержания меченных CFSE лимфоцитов от общего числа лимфоцитов. Фракция лимфоцитов была обогащена на трехступенчатом градиенте перколла.

Figure 2. Lymphocyte fraction of brain cells from depressed-like recipients after transplantation of ex vivo caffeine-modulated and CFSE-labeled syngeneic splenocytes

Note. A, frontal-side scattering diagram, [cell], area of the lymphocyte cloud; B, side scatter plot against CFSE, gated by the [cell] area of cytogram A, intended to identify the relative content of CFSE-labeled lymphocytes from the total number of lymphocytes. The lymphocyte fraction was enriched on a three-step Percoll gradient.

го контакта с клетками мозга [13]. Визуализация в паренхиме головного мозга депрессивно-подобных реципиентов функционально активных лимфоцитов в составе введенных клеток селезенки, прекультивированных с кофеином и меченных витальным красителем CFSE (рис. 2), позволяет рассматривать также и этот механизм редактирования поведенческого фенотипа реципиентов трансплантированными иммунокомпетентными клетками, чему способствует повышенная вследствие нейровоспаления при состоянии депрессивности проницаемость гематоэнцефалического барьера.

Продемонстрированные в настоящем исследовании морфологические и функциональные изменения в патогенетически значимых структурах мозга депрессивно-подобных реципиентов после трансплантации модулированных *ex vivo* кофеином спленоцитов могут представлять собой один из механизмов коррекции депрессивно-

подобного поведения, показанного ранее у этих животных [1, 2, 11].

## Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что модулированные *ex vivo* кофеином иммунокомпетентные клетки селезенки после внутривенного введения вызывают у сингенных депрессивно-подобных реципиентов стимуляцию процессов нейропластичности на фоне снижения нейровоспаления. Поскольку нейрогенерация гиппокампа, уровни BDNF и провоспалительных цитокинов рассматриваются как мишени для лечения депрессивных расстройств, выявленные в настоящем исследовании центральные эффекты модулированных *ex vivo* кофеином иммунокомпетентных клеток у депрессивно-подобных реципиентов могут также являться механизмами редактирования их поведенческого фенотипа.

## Список литературы / References

1. Маркова Е.В. Иммунокомпетентные клетки и регуляция поведенческих реакций в норме и патологии. Красноярск: Научно-инновационный центр, 2021. 184 с. [Markova E.V. Immune cells and regulation of behavioral reactions in health and disease]. Красноярск: Scientific and Innovation Center, 2021. 184 p.
2. Маркова Е.В., Княжева М.А. Психонейроиммуномодулирующий эффект иммунокомпетентных клеток при депрессивно-подобном состоянии // Патогенез, 2022. № 3. С. 107-108. [Markova E.V., Knyazheva M.A. Psychoneuroimmunomodulatory effect of immunocompetent cells in a depressive-like state. *Patogenez = Pathogenesis*, 2022, no. 3, pp. 107-108. (In Russ.)]
3. Орловская И.А., Топоркова Л.Б., Савкин И.В., Княжева М.А., Серенко Е.В., Гойман Л.В., Шевченко Ю., Маркова Е.В. Влияние растворимых факторов макрофагов M2 фенотипа на гемопоэз при депрессивно-подобном состоянии // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 1057-1064. [Orlovskaya I.A., Toporkova L.B., Knyazheva M.A., Savkin I.V., Serenko E.V., Goiman E.V., Shevchenko Yu.A., Markova E.V. Influence of soluble factors from the M2 phenotype macrophages on hematopoiesis in depressionlike state. *Meditinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 1057-1064. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IOS-2516.
4. Ambrée O., Ruland C., Scheu S., Arolt V., Alferink J. Alterations of the innate immune system in susceptibility and resilience after social defeat stress. *Front. Behav. Neurosci.*, 2018, Vol. 12, 141. doi:10.3389/fnbeh.2018.00141.
5. Bhattacharya A., Drevets W.C. Role of Neuro-immunological factors in the pathophysiology of mood disorders: implications for novel therapeutics for treatment resistant depression. *Curr. Top. Behav. Neurosci.*, 2017, Vol. 31, pp. 339-356.
6. Dean J., Keshavan M. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J. Psychiatr.*, 2017, Vol. 27, pp. 101-111.
7. Idova G.V., Markova E.V., Gevorgyan M.M., Al'perina E.L., Zhanaeva S.Y. Cytokine production by splenic cells in C57BL/6J mice with depression-like behavior depends on the duration of social stress. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2018, Vol. 164, pp. 645-649.
8. Jun H., Mohammed S., Hussaini Q., Rigby M.J., Jang M.H. Functional role of adult hippocampal neurogenesis as a therapeutic strategy for mental disorders, *Neural Plast.*, 2012, Vol. 2012, 854285. doi: 10.1155/2012/854285.
9. Kim Y.K., Na K.S., Myint A.M., Leonard B.E. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2016, Vol. 64, pp. 277-284.
10. Markova E.V., Knyazheva M.A. Immunomodulatory properties of caffeine and caffeine-treated immune cells in depression-like state. *Meditinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 3, pp. 533-538. doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2666.
11. Markova E.V., Knyazheva M.A. Immune cells as a potential therapeutic agent in the treatment of depression. *Meditinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 4, pp. 699-704. doi: 10.15789/1563-0625-ICA-2277.

12. Qiao H., An S.C., Xu C., Ma X.M. Role of proBDNF and BDNF in dendritic spine plasticity and depressive-like behaviors induced by an animal model of depression. *Brain Res.*, 2017, Vol. 1663, pp. 29-37.
13. Rattazzi L., Piras G., Ono M., Deacon R., Pariante C.M., D'Acquisto F. CD4(+) but not CD8(+) T cells revert the impaired emotional behavior of immunocompromised RAG-1-deficient mice. *Transl. Psychiatry*, 2013, Vol. 3, e280. doi: 10.1038/tp.2013.54.
14. Remes O., Mendes J.F., Templeton P. Biological, psychological, and social determinants of depression: a review of recent literature. *Brain Sci.*, 2021, Vol. 11, no. 12, 163. doi: 10.3390/brainsci11121633.
15. Xu W., Yao X., Zhao F., Zhao H., Cheng Z., Yang W., Cui R., Xu S., Li B. Changes in Hippocampal Plasticity in Depression and Therapeutic Approaches Influencing These Changes. *Neural Plast.*, 2020, Vol. 2020, 8861903. doi: 10.1155/2020/8861903.

---

**Авторы:**

**Маркова Е.В.** — д.м.н., главный научный сотрудник и руководитель лаборатории нейробиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Княжева М.А.** — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории нейробиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

---

**Authors:**

**Markova E.V.**, PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head, Neuroimmunology Laboratory, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Knyazheva M.A.**, PhD (Biology), Junior Research Associate, Neuroimmunology Laboratory, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

---

Поступила 22.03.2024  
Принята к печати 24.03.2024

---

Received 22.03.2024  
Accepted 24.03.2024

# НЕЙРОЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ ВETERANОВ СОВРЕМЕННЫХ БОЕВЫХ КОНФЛИКТОВ С ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИМ СТРЕССОВЫМ РАССТРОЙСТВОМ

Пашнин С.Л.<sup>1</sup>, Давыдова Е.В.<sup>1,2</sup>, Альтман Д.Ш.<sup>1</sup>

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

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

**Резюме.** Формирование постстрессовых расстройств у ветеранов современных боевых конфликтов обусловлено особенностями взаимовлияния психических и иммуно-эндокринных процессов, направленных на поддержание стабильности организма в условиях хронической активации физиологических систем посредством процесса, известного как аллостаз. Целью исследования явилось изучение уровней стресс-медиаторов гипоталамо-гипофизарного и надпочечникового происхождения, показателей цитокинового профиля крови ветеранов современных войн с посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР).

В исследовании приняли участие 38 ветеранов специальной военной операции (СВО) на Украине с диагнозом по МКБ-10: ПТСР (F43.1). Диагноз верифицирован на основании нейропсихологического и патопсихологического обследования. В группу сравнения вошли 30 ветеранов Чеченской военной кампании того же возраста. В крови проводилось определение уровней стрессовых гормонов методом ИФА: АКТГ (тест-система IBL, Германия); норадреналин (Cloud-Clone, Китай); кортизол (ООО «Хема-Медика», Россия); дигидроэпиандростерон (DVC, Канада). Цитокиновый профиль крови определяли при помощи мультиплексного анализа тест-системой Bio-Plex (MERZ, Германия). Сравнение данных проводили с помощью программы Statistica for Windows vers. 10.0.

Свидетельством накопления «аллостатического груза» при формировании ПТСР у ветеранов СВО явилось повышение в крови концентраций АКТГ, норадреналина, кортизола, являющихся пластическими константами кататоксической стратегии адаптации к воздействию пролонгированного боевого стресса. Снижение концентрации дегидроэпиандростерона способствовало развитию психологической дезадаптации и стресс-индуцированных когнитивных расстройств. Аллостатические реакции при ПТСР включали изменение цитокинового профиля крови в виде повышения уровней провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-12 IL-6, TNF $\alpha$ ), снижения противовоспалительных и регулятор-

## Адрес для переписки:

Давыдова Евгения Валерьевна  
ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница»  
454048, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 70.  
Тел.: 8 (351) 749-37-75.  
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

## Address for correspondence:

Evgeniya V. Davydova  
Chelyabinsk Regional Clinical Hospital  
70 Vorovsky St  
Chelyabinsk  
454048 Russian Federation  
Phone: +7 (351) 749-37-75.  
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

## Образец цитирования:

С.Л. Пашнин, Е.В. Давыдова, Д.Ш. Альтман  
«Нейроцитокиновый профиль крови  
ветеранов современных боевых конфликтов  
с посттравматическим стрессовым расстройством»  
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,  
№ 2. С. 343-350.  
doi: 10.46235/1028-7221-16669-NBP

© Пашнин С.Л. и соавт., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

S.L. Pashnin, E.V. Davydova, D.Sh. Altman "Neurocytokine  
blood profile of veterans of modern combat conflicts with post-  
traumatic stress disorder", Russian Journal of Immunology/  
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2,  
pp. 343-350.  
doi: 10.46235/1028-7221-16669-NBP

© Pashnin S.L. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16669-NBP

ных цитокинов (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-2). Подобный нейровоспалительный статус также может быть связан с развитием психо-поведенческих симптомов ПТСР.

Формирование дезадаптивных изменений при накоплении «аллостатического груза» клинически выражалось в виде ПТСР и сопровождалось изменением нейроцитокинового профиля крови в виде повышения уровней АКТГ, норадреналина, кортизола, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ , на фоне снижения концентрации дегидроэпиандростерона, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-2, что в целом отражает превалирование кататоксической стратегии адаптации у комбатантов СВО.

*Ключевые слова:* боевой стресс, гормоны стресса, цитокины, посттравматическое стрессовое расстройство

## NEUROCYTOKINE BLOOD PROFILE OF VETERANS OF MODERN COMBAT CONFLICTS WITH POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER

Pashnin S.L.<sup>a</sup>, Davydova E.V.<sup>a, b</sup>, Altman D.Sh.<sup>a</sup>

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

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

**Abstract.** The formation of post-stress disorders in veterans of modern military conflicts is due to the peculiarities of the mutual influence of mental and immuno-endocrine processes aimed at maintaining the stability of the body in conditions of chronic activation of physiological systems through a process known as allostasis. The purpose of the study was to study the levels of stress mediators of hypothalamic-pituitary and adrenal origin, the cytokine profile of blood of veterans of modern wars with PTSD.

38 veterans of a special military operation in Ukraine with a diagnosis according to ICD 10: PTSD (F43.1) took part in the study. The diagnosis was verified on the basis of neuropsychological and pathopsychological examination. The comparison group included 30 veterans of the Chechen military campaign of the same age. The levels of stress hormones in the blood were determined by ELISA using the following method: ACTH (IBL, Germany); norepinephrine (Cloud-Clone, China); cortisol (HemaMedica, Russia); dihydroepiandrosterone (DBC, Canada). The blood cytokine profile was determined using a multiplex analysis using the Bio-Plex test system (MERZ, Germany).

Evidence of the accumulation of “allostatic load” during the formation of PTSD in SVO veterans was an increase in the blood concentrations of ACTH, norepinephrine, and cortisol, which are plastic constants of the catatoxic strategy of adaptation to the effects of prolonged combat stress. Allostatic reactions in PTSD included changes in the cytokine profile of the blood in the form of increased levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 TNF $\alpha$ ) and decreased anti-inflammatory and regulatory cytokines (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-2). This neuroinflammatory status may be associated with the development of psycho-behavioral symptoms of PTSD.

The formation of maladaptive changes with the accumulation of “allostatic load” was clinically expressed in the form of PTSD and was accompanied by changes in the neurocytokine blood profile in the form of increased levels of ACTH, norepinephrine, cortisol, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 TNF $\alpha$ , against the background of a decrease in the concentration of dehydroepiandrosterone, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-2, which generally reflects the prevalence of the catatoxic adaptation strategy in combatants.

*Keywords:* combat stress, stress hormones, cytokines, post-traumatic stress disorder

## Введение

Иммунобиологические механизмы формирования постстрессовых расстройств у ветеранов современных боевых конфликтов тесно связаны с особенностями взаимовлияния психических

и иммуно-эндокринных процессов, направленных на поддержание стабильности организма в условиях хронической активации физиологических систем посредством процесса, известного как аллостаз [1, 9]. Формирование долгосрочных адаптационных стратегий организма, отвечаю-

ших концепции аллостаза, сопровождается изменением ряда пластических физиологических констант [3]. Аллостаз при остром стрессе формируется посредством синергетической активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и системы LC-NE в стволе головного мозга ((LC) – голубое пятно, NE норэпинефрин) [9] и детерминирован функциональным состоянием мозга и его отдельных структур. Формирование аллостатических изменений инициируется высвобождением семейства кортикотропин-релизинг-факторов, стимулирующей секреции адренкортикотропного гормона (АКТГ) из аденогипофиза, который в свою очередь активизирует кору надпочечников и выброс в кровь секрецию кортизола в качестве гормона стресса [3, 9]. Однако вызванные длительным и интенсивным по силе стрессовым воздействием нейроэндокринные реакции приводят к аллостатическому сбою, определяемому как реакция на стресс, превышающая основные потребности и приводящая к дезадаптивным последствиям [3]. Накопление «аллостатического груза» эквивалентно совокупности стресс-индуцированных нейро-иммунных и эндокринных изменений в организме и рассматривается в качестве «цены адаптации», обеспечивающей постоянство внутренней среды «через изменение». Нейробиологические реакции на стрессор значительно варьируют в связи с различной индивидуальной нейрокогнитивной реактивностью, клиническими эквивалентами которой могут выступать пограничные расстройства личности или посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР). С позиций выраженности психопатологической симптоматики наиболее часто у комбатантов имеет место тревожно-эксплозивный клинический вариант ПТСР, реже диссоциативный и апатический, требующие значительных усилий психосоциальной коррекции и реабилитации [2].

**Целью исследования** явилось изучение уровня стресс-медиаторов гипоталамо-гипофизарного и надпочечникового происхождения, показателей цитокинового профиля крови ветеранов современных войн с посттравматическим стрессовым расстройством.

## Материалы и методы

Данное исследование проведено в рамках программы комплексной реабилитации ветеранов современных военных конфликтов на базе ГБУЗ «Челябинский областной клинический терапевтический госпиталь для ветеранов войн», в котором приняли участие 88 военнослужащих в возрасте от 28 до 57 лет (средний возраст  $48,3 \pm 4,6$

года), среди которых 38 пациентов – ветеранов специальной военной операции на территории Украины (УСВО), вошли в основную (1) группу исследования и имели документально подтвержденный диагноз ПТСР (МКБ-10: F43.1; МКБ-11: 6B40). Группу сравнения (2) составили 30 ветеранов второй Чеченской военной кампании (2 ЧВК), средний возраст которых составил  $55,2 \pm 4,4$  года, у которых отсутствовали клинические признаки психопатологии. Длительность пребывания в зоне боевых действий от 3 мес. до 1,9 года. Группу референсных значений (3) составили 20 здоровых военнослужащих, не принимавших участия в боевых действиях (средний возраст  $48,7 \pm 3,6$  года). Проводимые исследования рассмотрены с позиций биомедицинской этики и одобрены на заседании этического комитета ООО «ДокторЛаб» (протокол № 3 от 17.10.2020 г.). Права исследователей и пациентов оформлены в виде подписания информированного согласия пациента. С целью выставления диагноза, в соответствии рекомендациями ФГБУ «НМИЦ психиатрии и неврологии имени В.М. Бехтерева» МЗ РФ (Санкт-Петербург) [2] всем участникам исследования проводилось нейропсихологическое тестирование, включающее: Структурированное клиническое диагностическое интервью (СКИД), модуль I «ПТСР»; Шкалы для клинической диагностики ПТСР (Clinical-Administered PTSD Scale – CAPS); Миссисипскую шкалу для оценки посттравматических реакций; Шкалу оценки интенсивности боевого опыта (Combat Exposure Scale – CES)), Шкалу оценки выраженности психофизиологической реакции на стресс. Патопсихологическое тестирование позволяло анамнестически выявить наличие, характер, силу, интенсивность и продолжительность психотравмирующего события и определить уровень выраженности симптоматики ПТСР. Верификация диагноза ПТСР проводилась путем сравнения диагностических критериев МКБ-10 (F43.1 ПТСР), МКБ-11 «Расстройства, непосредственно связанные со стрессом: ПТСР (6B40)» и DSM-IV (рубрика «Тревожные расстройства» (300.xx)) и с учетом изменений, указанных в DSM-V пересмотра. В исследование не были включены пациенты с тяжелыми контузиями, ЧМТ, психорганической патологией, декомпенсацией соматического состояния, употребляющих наркотические и психотропные средства.

Венозную кровь для исследования собирали в утренние часы, натощак. Определение уровня стрессовых гормонов проводилось с помощью конкурентного иммуноферментного метода: концентрация адрено-кортикотропного гормо-

на (АКТГ) в сыворотке крови (пг/мл) помощью тест-системы IBL International GmbH (Гамбург, Германия); норадреналина (НА) (пг/мл) тест-системой Cloud-Clone (Китай); уровень кортизола (ООО «Хема-Медика», Россия (нмоль/л)); дегидроэпиандростерон, ДГЭА, (нг/мл) тест-системой DBC (Канада). Цитокиновый профиль крови оценивали при помощи мультиплексного анализа на иммуноанализаторе Luminex Magpix 100 (США) с использованием тест-системы мультиплексного анализа Bio-Plex (MERZ, Германия) для определения IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, IL-13, IL-12, IL-2, IL-4, IL-8, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ .

Статистическую обработку материала проводили с применением пакета прикладных программ Statistica for Windows vers. 10.0. (StatSoft Inc. (США)) с представлением данных в виде медианы и квартильного размаха Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Различия между показателями оценивали при помощи модуля непараметрической статистики, используя критерий Манна-Уитни для независимых выборок, при достижении уровня значимости (p) не более 0,05.

## Результаты и обсуждение

Объективным показателем накопления «аллостатического груза» при действии на организм комбатанта интенсивного и пролонгированного стресса в условиях пребывания в зоне боевых действий является изменение уровней стрессовых гормонов гипоталамо-гипофизарного и надпочечникового происхождения (табл. 1).

Анализ содержания в крови стрессовых гормонов показал значимое повышение в крови ветеранов УСВО с ПТСР концентраций АКТГ, норадреналина, кортизола, рассматриваемое, с одной стороны, как пластический эквивалент тяжести перенесенного пролонгированного психоэмоционального стресса, с другой – как отражение накопления «аллостатического груза», являющегося совокупностью стресс-индуцированных нервных и эндокринных изменений в организме и своеобразной «ценой адаптации», обеспечивающей постоянство внутренней среды «через изменение» [9]. Такая «цена адаптации» с высоким и длительно сохраняющимся повышенным уровнем гормонов стресса приводит к накоплению, кумуляции «аллостатического груза» клиническим эквивалентом которого может являться ПТСР. О повышении симпатонейральной активности головного мозга при ПТСР также свидетельствует зафиксированный нами повышенный уровень норадреналина в крови, в сравнении с группой сравнения и контрольной.

Известно, что наиболее пролонгированные фазы стрессовой реакции детерминированы включением соматотропного и тиреотропного паттернов эндокринной регуляции. В то же время гонадотропная составляющая в условиях стресса характеризуется дисбалансом синтоксической и более энергозатратной кататоксической программ адаптации и при подавлении синтоксической программы снижается выделение фертильных факторов, в частности  $\alpha$ 2-микроглобулина,

**ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ СТРЕССОВЫХ ГОРМОНОВ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-НАДПОЧЕЧНИКОВОЙ ОСИ У ВЕТЕРАНОВ БОЕВЫХ ДЕЙСТВИЙ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. LEVELS OF STRESS HORMONES OF THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AXIS IN COMBAT VETERANS, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Показатели Indicators	Группа 1 Ветераны УСВО с ПТСР Group 1 USVO veterans with PTSD n = 38	Группа 2 Ветераны 2 ЧВК Group 2 Veterans 2 PMCs n = 30	Группа 3 Контрольная Group 3 Control n = 20
АКТГ (пг/мл) ACTH (pg/mL)	128,8 (110,7-144,1)	48,4 (33,6-58,9)*	38,6 (26,3-48,9)*
Норадреналин (нг/мл) Norepinephrine (ng/mL)	298,3 (219,4-324,6)	96,8 (79,5-117,6)*	79,8 (66,3-89,7)*
Кортизол (нмоль/мл) Cortisol (nmol/mL)	1286,5 (1189,8-1452,4)	312,3 (289,6-412,5)*	198,3 (110,6-256,9)**
ДГЭА (нг/мл) DHEA (ng/mL)	19,5 (15,6-24,3)	28,6 (26,3-33,9)*	32,6 (28,4-35,4)*

Примечание: Достоверность различий (p) – критерий Манна-Уитни; \* – значимые различия с группой 1; \*\* – с группой 2.

Note. Significance of differences (p), Mann-Whitney test; \*, significant differences with group 1; \*\*, with group 2.



ТАБЛИЦА 2. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ ВЕТЕРАНОВ СОВРЕМЕННЫХ БОЕВЫХ КОНФЛИКТОВ, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )  
TABLE 2. BLOOD CYTOKINE PROFILE OF VETERANS OF MODERN COMBAT CONFLICTS, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Показатели, пг/мл Indicators, pg/ml	Группа 1 Ветераны УСВО с ПТСР Group 1 USVO veterans with PTSD n = 38	Группа 2 Ветераны 2 ЧВК Group 2 Veterans 2 PMCs n = 30	Группа 3 Контрольная Group 3 Control n = 20
TNF $\alpha$	13,5 (11,9-18,6)	3,3 (2,9-4,5)*	1,7 (0,9-2,3)*
IFN $\gamma$	10,6 (8,6-12,6)	18,1 (16,3-24,6)*	33,4 (28,5-38,6)**
IL-1 $\beta$	23,7 (13,3-25,9)	10,5 (8,3-11,6)*	7,4 (4,2-8,3)*
IL-6	17,8 (16,6-19,6)	13,1 (11,5-15,6)*	11,2 (9,2-12,5)*
IL-12	25,6 (18,6-29,6)	16,4 (14,3-18,2)*	14,5 (11,2-15,8)*
IL-4	1,22 (0,98-1,96)	4,2 (2,8-6,2)*	3,9 (2,8-5,1)*
IL-10	11,2 (10,3-13,3)	44,5 (59,3-65,3)*	48,2 (35,7-54,2)*
IL-13	18,6 (14,2-23,3)	22,3 (19,6-25,6)	24,3 (15,6-25,8)
IL-2	10,6 (6,3-12,3)	41,9 (34,5-48,9)*	56,3 (48,5-69,3)
TGF- $\beta$	10,3 (8,8-11,5)	29,6 (25,4-36,5)*	23,4 (18,6-26,5)*

Примечание: Достоверность различий (p) – критерий Манна–Уитни; \* – значимые различия с группой 1; \*\* – с группой 2.

Note. Significance of differences (p), Mann–Whitney test; \*, significant differences with group 1; \*\*, with group 2.

трофобластического – PI гликопротеида, препятствующих деструктивному действию дезадаптивных стрессовых реакций [4].

Особое значение имеет снижение содержания дегидроэпиандростерона (ДГЭА) в крови ветеранов с ПТСР в сравнении с показателями группы сравнения и контрольной. При остром и пролонгированном стрессе повышение концентрации ДГЭА является не только маркером остроты стрессовой реакции, но и протекторным ограничительным механизмом в отношении других гормонов стресса, в частности кортизола и катехоламинов, максимум его концентрации в крови фиксируется на пике и к окончанию стрессовой реакции [5]. Имеются данные о снижении уровня ДГЭА через 3 месяца после острого стрессового события [6]. Кроме того, показано, что ДГЭА предотвращает развитие психологической дезадаптации и стресс-индуцированных расстройств, а снижение концентрации ДГЭА наблюдается при наличии негативных поведенческих реакций при ПТСР [8].

Запуск иммуноопосредованных нейровоспалительных процессов на территории ЦНС при формировании аллостаза возникает в контексте повышенных стрессовых реакций совместно с изменениями функции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГН) и активности автономной нервной системы. Однако при ПТСР наблюдается дисбаланс в виде гипоактивной

ГГН оси и гиперактивации симпатической нервной системы, приводящий к усилению нейровоспалительных реакций на территории головного мозга [10]. Массивный выброс катехоламинов в кровотоки индуцирует рекрутинг иммунных клеток. Роль интерлейкинов в запуске и разворачивании адаптационных постстрессовых программ достаточно дискутабельна, однако, имеются сведения о роли IL-4, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10 в активации симпатического отдела ВНС (кататоксический профиль программы), а IL-2, IL-12 в активации парасимпатического отдела (синтоксическая программа адаптации) [4]. Определение цитокинового профиля крови ветеранов показало ряд характерных изменений (табл. 2).

Согласно нашим данным, аллостатические реакции при ПТСР включали наличие в крови ветеранов УСВО значимого повышения концентрации провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ ) и снижения концентрации цитокинов, проявляющих противовоспалительную и регуляторную направленность действия (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-2).

Включение симпатонейральных реакций при накоплении «аллостатического груза» сопровождается повышением секреции норадреналина/норэпинефрина, а при действии последнего на клетки нейроглии, лимфоциты приводит к стимуляции выброса IL-1 $\beta$  и IL-6 [3]. В свою очередь кортизол индуцирует образование и выброс в кровотоки ряд медиаторов воспаления: TNF $\alpha$ ,

IL-6 и метаболитов арахидоновой кислоты, в частности циклооксигеназы-2. Кроме того, известно об участии мелатонина в секреции цитокинов при стрессе [4]. Данная нейровоспалительная реакция в первые фазы стрессовой реакции улучшает мозговое кровоснабжение, утилизацию глюкозы, повышает синаптическую пластичность и обеспечивает стимуляцию гиппокампа-зависимых и передне-лобных зон, отвечающих за когнитивное обеспечение эмоциональной составляющей стресса [4].

В то же время цитокин-индуцированная стимуляция блуждающего нерва («воспалительный рефлекс») оказывает понижающую регуляцию относительно продукции провоспалительных цитокинов. Микроглиальные клетки в условиях пролонгированного стресса усиливают продукцию IL-4, проявляющего на территории головного мозга нейротрофические свойства и снижающего экспрессию системы медиаторов воспаления IL-1 $\beta$ /IL-1 $\beta$ R1 [13]. Установленное нами повышение уровня TGF- $\beta$  реализуется в виде усиления протекции тканей мозга в отношении деструктивного действия повышенных концентраций медиаторов воспаления TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, оксида азота и эйкозаноидов, также предотвращая развитие эндотелиальной дисфункции [7]. Цитокиновые сигналы, подаваемые высокими концентрациями TGF- $\beta$ 1, увеличивают количество и функциональную активность T-регуляторных клеток (Treg), а IL-2 и IL-10 способствует выработке и дифференцировке последних, способствуя таким образом реализации синтоксической программы адаптации к стрессу [4].

В эксперименте показано, что в крови мышей, подвергавшихся длительному иммобилизационному стрессу, в крови определяются высокие уровни Th1-зависимых цитокинов (IL-6, IL-10, IL-4), напротив, интактные мыши характеризовались преобладанием Th2-цитокинов (IFN $\gamma$  и IL-2) [11].

Отдельными исследованиями показано, что нейровоспалительный статус при ПТСР может

быть связан с развитием психо-поведенческих симптомов ПТСР, в частности экспериментально показано, что нейровоспаление ухудшает когнитивные функции и замедляет сроки исчезновения возвратных воспоминаний о психо-травмирующем событии [12]. Напротив, показано, что глюкокортикоиды уменьшают длительность и эмоциональный окрас вызывающих отвращение воспоминаний через изменение функциональных связей между миндалиной и лобной корой [10].

ДГЭА оказывает стимулирующее влияние на синтез IL-2, IFN $\gamma$ , IGF-I (инсулиноподобный фактор роста), IL-10, VEGF (сосудистого эндотелиального ростового фактора), тем самым приводя к нивелированию стресс-индуцированных нарушений иммунной системы и реализации когнитивной дисфункции. Предположительно, зафиксированное нами снижение уровня ДГЭА в группе ветеранов УСВО определенным образом связано с наличием ПТСР.

## Заключение

Таким образом, формирование дезадаптивных изменений у ветеранов современных боевых конфликтов при накоплении «аллостатического груза» клинически выражается в формировании различных постстрессовых расстройств, в частности ПТСР, и сопровождается изменением нейроритмоцинового профиля крови. При ПТСР наблюдается дисбаланс адаптационных программ в виде преобладания кататоксической программы, заключающейся в повышении уровней АКТГ, норадреналина, кортизола, провоспалительных цитокинов: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 и TNF $\alpha$  и подавлении выраженности энергосберегающей синтоксической программы в виде снижения ДГЭА, уровней противовоспалительных цитокинов: TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-2, что в целом способствует формированию клинических эквивалентов дезадаптивных расстройств.

## Список литературы / References

1. Альтман Д.Ш., Кочеткова Н.Г., Зурочка А.В., Давыдова Е.В. Темпы биологического старения и маркеры аллостаза у ветеранов афганского конфликта с ранними формами хронической ишемии мозга // *Acta Biomedica Scientifica*, 2012. № 3 (2). С. 15-18. [Altman D.Sh., Kochetkova N.G., Zurochka A.V., Davydova E.V. Rates of biological aging and markers of allostasis in veterans of the Afghan conflict with early forms of chronic cerebral ischemia. *Acta Biomedica Scientifica = Acta Biomedica Scientifica*, 2012, no. 3 (2), pp. 15-18. (In Russ.)] *mozga* (дата обращения: 01.04.2024).
2. Крюков Е.В., Шамрей В.К. Военная психиатрия в XXI веке: современные проблемы и перспективы развития. СПб.: СпецЛит, 2022. 367 с. [Kryukov E.V., Shamrey V.K. *Military psychiatry in the 21<sup>st</sup> century: modern problems and development prospects*]. St. Petersburg: SpetsLit, 2022. 367 p.

3. Севрюкова Г.А. Реостаз, аллостаз и аллостатическая нагрузка: что понимается под этими терминами? / Международный научно-исследовательский журнал, 2022. № 10 (124). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://research-journal.org/archive/10-124-2022>. [Sevryukova G.A. Rheostasis, allostasis and allostatic load: what is meant by these terms? *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal = International Scientific Research Journal*, 2022, no. 10 (124). [Electronic resource]. Access mode: <https://research-journal.org/archive/10-124-2022>.
4. Токарев А.Р. Нейро-цитокиновые механизмы острого стресса (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий, 2019. № 3. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/neyro-tsitokinovy-e-mehanizmy-ostrogo-stressa-obzor-literatury>. [Tokarev A.R. Neurocytokine mechanisms of acute stress (literature review). *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Bulletin of New Medical Technologies*, 2019, no. 3. [Electronic resource]. Access mode: <https://cyberleninka.ru/article/n/neyro-tsitokinovy-e-mehanizmy-ostrogo-stressa-obzor-literatury>.
5. Dutheil F., de Saint Vincent S., Pereira B., Schmidt J., Moustafa F., Charkhabi M., Bouillon-Minois J-B., Clinchamps M. DHEA as a biomarker of stress: a systematic review and meta-analysis. *Front. Psychiatry*, 2021, no. 12, 688367. doi: 10.3389/fpsyt.2021.688367.
6. Foster M.A., Taylor A.E., Hill N.E., Bentley C., Bishop J., Gilligan L.C. Mapping the steroid response to major trauma from injury to recovery: a prospective cohort study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2020, no. 105, pp. 925-937.
7. Galic M.A., Riazzi K., Pittman Q.J. Cytokines and brain excitability. *Front. Neuroendocrinol*, 2012, no. 33, pp. 116-125.
8. Jiang X., Zhong W., An H., Fu M., Chen Y., Zhang Z. Attenuated DHEA and DHEA-S response to acute psychosocial stress in individuals with depressive disorders. *J. Affect. Disord.*, 2017, no. 215, pp. 118-124.
9. McEwen B.S., Gianaros P.J. Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2010, no. 1186, pp. 190-222.
10. Swartz J.R., Prather A.A., Hariri A.R. Threat-related amygdala activity is associated with peripheral CRP concentrations in men but not women. *Psychoneuroendocrinology*, 2017, no. 78, pp. 93-96.
11. Quiñones M.M., Maldonado L., Velazquez B., Porter J.T. Candesartan ameliorates impaired fear extinction induced by innate immune activation. *Brain Behav. Immun.*, 2016, no. 52, pp. 169-177.
12. Young M.B., Howell L.L., Hopkins L. A peripheral immune response to remembering trauma contributes to the maintenance of fear memory in mice. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, no. 94, pp. 143-151.
13. Yu Z., Fukushima H., Ono C. Microglial production of TNF-alpha is a key element of sustained fear memory. *Brain Behav. Immun.*, 2017, no. 59, pp. 313-321.

---

**Авторы:**

**Пашнин С.Л.** – врач-нейрохирург, заслуженный врач РФ, заведующий отделением нейрохирургии ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

**Authors:**

**Pashnin S.L.**, Neurosurgeon, Honored Physician of the Russian Federation, Head, Department of Neurosurgery, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

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

**Альтман Д.Ш.** — д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, главный врач ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

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

**Altman D.Sh.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Physician of the Russian Federation, Chief Physician, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

---

Поступила 27.03.2024

Отправлена на доработку 29.03.2024

Принята к печати 30.03.2024

Received 27.03.2024

Revision received 29.03.2024

Accepted 30.03.2024

## НАРУШЕНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПОСТКОВИДНЫХ ПАЦИЕНТОВ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИЕЙ

Савчук К.С.<sup>1</sup>, Рябова Л.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

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

**Резюме.** Постковидный синдром объединяет множество неблагоприятных исходов с часто возникающими впервые состояниями, включая сахарный диабет (СД) 2-го типа. Актуальностью исследования являются недостаточные данные о Т-клеточном иммунитете у больных с гипергликемией после перенесенного COVID-19. Целью данного исследования явилось выявление особенностей Т-клеточного иммунитета у лиц с постковидным синдромом и впервые выявленными нарушениями углеводного обмена (НУО) в постковидном периоде. В исследование включено 100 пациентов (32 мужчин и 68 женщин) в возрасте от 38 до 70 лет (средний возраст ( $M \pm m$ ) составил  $59,40 \pm 8,80$  года) с верифицированным состоянием после COVID-19. Все пациенты были распределены на три группы: группа 1 – пациенты с сопутствующей впервые выявленной нарушенной толерантностью к глюкозе (НТГ) в постковидном периоде (до инфицирования SARS-CoV-2 повышения гликемии по данным первичной медицинской документации не было выявлено) ( $n = 30$ ), группа 2 – пациенты с сопутствующим впервые выявленным сахарным диабетом 2-го типа ( $n = 30$ ), группа 3 – пациенты с развитием постковидного синдрома без гипергликемии ( $n = 40$ ). В ходе исследования были определены следующие параметры: CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> (Т-лимфоциты), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> (хелперы индукторы), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> (цитотоксические Т-лимфоциты), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup> (Т-регуляторные клетки), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> (Т-лимфоциты – ранняя активация), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> (Т-лимфоциты – поздняя активация). Инфицирование SARS-CoV-2 с развитием в дальнейшем постковидного синдрома и стойкой гипергликемией (НТГ, СД 2-го типа) в постковидном периоде сопровождалось более высоким уровнем общего числа Т-лимфоцитов. При исследовании популяции Т-лимфоцитов выявлены изменения субпопуляционного состава. В группе пациентов с НУО отмечено значимое повышение Т-цитотоксических, Т-регуляторных клеток. Более выраженные изменения субпопуляционного состава определены в группе больных с впервые выявленным СД 2-го типа в постковидном периоде – повышение относительного и абсолютного чисел Т-хелперов и Т-клеток

### Адрес для переписки:

Савчук Ксения Сергеевна  
ООО «АльфаСтрахование-ОМС»  
454128, Россия, г. Челябинск, ул. Университетская  
набережная, 105-702.  
Тел.: 8 (951) 452-19-69.  
E-mail: ksenyasavchuk@gmail.com

### Address for correspondence:

Ksenia S. Savchuk  
AlfaStrakhovanie-OMS LLC  
105-702 University Embankment  
Chelyabinsk  
454128 Russian Federation  
Phone: +7 (951) 452-19-69.  
E-mail: ksenyasavchuk@gmail.com

### Образец цитирования:

К.С. Савчук, Л.В. Рябова «Нарушение Т-клеточного звена иммунной системы у постковидных пациентов с впервые выявленной гипергликемией» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 351-356. doi: 10.46235/1028-7221-16817-DOT

© Савчук К.С., Рябова Л.В., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

K.S. Savchuk, L.V. Ryabova "Distribution of the T cell element of the immune system in post-covid patients with first identified hyperglycemia", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 351-356. doi: 10.46235/1028-7221-16817-DOT

© Savchuk K.S., Ryabova L.V., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16817-DOT

поздней активации лимфоцитов. Нарушения углеводного обмена, ассоциированные с COVID-19, сопровождаются изменением субпопуляционного состава Т-лимфоцитов. У лиц с впервые выявленным СД 2 типа в постковидном периоде выявлена гиперактивация Т-клеточного звена иммунной системы. Неоднородные данные получены у лиц с впервые выявленной нарушенной толерантностью к глюкозе, что требует дальнейшего исследования указанной группы больных.

*Ключевые слова:* сахарный диабет, SARS-CoV-2 инфекция, постковидные пациенты, нарушенная толерантность к глюкозе, Т-клетки, иммунный ответ

## DISTRIBUTION OF THE T CELL ELEMENT OF THE IMMUNE SYSTEM IN POST-COVID PATIENTS WITH FIRST IDENTIFIED HYPERGLYCEMIA

Savchuk K.S.<sup>a</sup>, Ryabova L.V.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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

**Abstract.** Introduction. Post-Covid syndrome combines many adverse outcomes with often new-onset conditions, including type 2 diabetes mellitus (DM). The relevance of the study is the insufficient data on T cell immunity in patients with hyperglycemia after COVID-19. The purpose of this study was to identify the characteristics of T cell immunity in individuals with post-Covid syndrome and newly diagnosed carbohydrate metabolism disorders (CDM) in the post-Covid period. The study included 100 patients (32 men and 68 women) aged from 38 to 70 years (mean age ( $M \pm m$ ) was  $59.40 \pm 8.80$  years) with a verified post-COVID-19 condition. All patients were divided into three groups: group 1 – patients with concomitant newly diagnosed impaired glucose tolerance (IGT) in the post-Covid period (prior to SARS-CoV-2 infection, no increase in glycemia was detected according to primary medical documentation) ( $n = 30$ ), group 2 – patients with concomitant newly diagnosed type 2 diabetes mellitus ( $n = 30$ ), and group 3 – patients with the development of post-Covid syndrome without hyperglycemia ( $n = 40$ ). During the study, the following parameters were determined: CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> (T lymphocytes), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> (helper inducers), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> (cytotoxic T lymphocytes), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup> (T regulatory cells), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> (T lymphocytes – early activation), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> (T lymphocytes – late activation). Infection with SARS-CoV-2 with the subsequent development of post-Covid syndrome and persistent hyperglycemia (IGT, type 2 diabetes) in the post-Covid period was accompanied by a higher level of the total number of T lymphocytes. A study of the T lymphocyte population revealed changes in the subpopulation composition. In the group of patients with CDM, a significant increase in T cytotoxic and T regulatory cells was noted. More pronounced changes in the subpopulation composition were identified in the group of patients with newly diagnosed type 2 diabetes in the post-Covid period: an increase in the relative and absolute numbers of T helper cells and T cells of late activation of lymphocytes. Disorders of carbohydrate metabolism associated with COVID-19 are accompanied by changes in the subpopulation composition of T lymphocytes. In individuals with newly diagnosed type 2 diabetes in the post-Covid period, hyperactivation of the T cell component of the immune system was revealed. Heterogeneous data were obtained in individuals with newly diagnosed impaired glucose tolerance, which requires further study of this group of patients.

*Keywords:* diabetes mellitus, SARS-CoV-2 infection, post-Covid patients, impaired glucose tolerance, T cells, immune response

### Введение

Продолжающаяся пандемия новой коронавирусной инфекции (COVID-19) определяет актуальность анализа отдаленных последствий инфицирования SARS-CoV-2. Постковидный синдром объединяет множество неблагоприятных исходов

с часто возникающими впервые состояниями, включая сердечно-сосудистые, тромботические и цереброваскулярные заболевания, сахарный диабет (СД) 2-го типа [3, 5, 4]. Li J. и соавт. продемонстрировали, что увеличение численности субпопуляции циркулирующих моноцитов и

Т-лимфоцитов предсказывает повышенную восприимчивость к СД 2 типа [7]. Исследования, изучающие иммунную дисрегуляцию у людей с длительным течением COVID, обнаружили изменения Т-клеток, включая истощение Т-клеток, снижение числа CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> эффекторных клеток памяти [6]. М. Добрынина и соавт. в исследованиях на больных с постковидным синдромом показали более высокий относительный уровень Т-лимфоцитов и Т-хелперов при резком снижении количества НК-клеток [1]. В группе больных с нарушениями углеводного обмена (НУО) при сниженном количестве НК-клеток также определены значимо более высокие уровни Т-хелперов [8]. Актуальностью исследования являются недостаточные данные о Т-клеточном иммунитете у больных с гипергликемией после перенесенного COVID-19.

**Целью данного исследования** явилось выявление особенностей Т-клеточного иммунитета у лиц с постковидным синдромом и впервые выявленными нарушениями углеводного обмена в постковидном периоде.

## Материалы и методы

Настоящее исследование проводилось в период 2022–2023 гг. на базе ГАУЗ ОТКЗГКБ № 1 г. Челябинска, с одобрения Независимого локального этического комитета при ГАУЗ ОТКЗ «Городская клиническая больница № 1» г. Челябинска (протокол № 8 от 11.04.2022 года). Дизайн исследования – одномоментное поперечное. В исследование было включено 100 пациентов (32 мужчин и 68 женщин) в возрасте от 38 до 70 лет (средний возраст ( $M \pm m$ ) составил  $59,40 \pm 8,80$  года) с верифицированным состоянием после COVID-19. Диагноз «постковидный синдром» установлен на основании данных о SARS-CoV-2 инфекции, полученных методом полимеразной цепной реакции, наличия IgA, M, G к вирусу SARS-CoV-2 инфекции, данных компьютерной томографии о перенесенной пневмонии. Исследование проводилось не менее чем через 6 месяцев после перенесенной пневмонии, вызванной SARS-CoV-2 инфекцией. Критерии включения в исследование: наличие инфицирования SARS-CoV-2 в анамнезе с развитием постковидного синдрома и подписанное информированное добровольное согласие. Критерии исключения: острые нарушения мозгового и коронарного кровообращения в анамнезе, лимфопролиферативные заболевания, злокачественные новообразования. Все пациенты были распределены на три группы: группа 1 – пациенты, инфицированные SARS-CoV-2 в анамнезе с развитием постковидного синдрома и сопутствующей впервые выявленной нарушенной толерантностью к глюкозе в постковидном

периоде (до инфицирования SARS-CoV-2 повышения гликемии по данным первичной медицинской документации не было выявлено) ( $n = 30$ ), группа 2 – пациенты, инфицированные SARS-CoV-2 в анамнезе с развитием постковидного синдрома и сопутствующим впервые выявленным СД 2-го типа ( $n = 30$ ), группа 3 – пациенты, инфицированные SARS-CoV-2 в анамнезе с развитием постковидного синдрома без гипергликемии ( $n = 40$ ). Оценка иммунного статуса осуществлялась методом проточной цитометрии на цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter, США) по стандартизованной технологии оценки лимфоцитарного звена иммунитета [2]. В ходе исследования были определены следующие параметры: CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> (Т-лимфоциты), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> (хелперы индукторы), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> (цитотоксические Т-лимфоциты), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD127<sup>-</sup> (Т-регуляторные клетки), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> (Т-лимфоциты – ранняя активация), CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> (Т-лимфоциты – поздняя активация). Результаты обрабатывали с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics, version 19.0. Описание выборок представлено в формате « $M \pm m$ », где  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – ошибка среднего арифметического. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием критериев Манна–Уитни. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Показатели Т-клеточного звена иммунитета в зависимости от вида нарушений углеводного обмена в постковидном периоде представлены в таблице 1.

Современные данные показывают наличие устойчивого изменения лимфоцитов после перенесенного COVID-19 [9]. Согласно результатам нашего исследования, инфицирование SARS-CoV-2 с развитием в дальнейшем постковидного синдрома и стойкой гипергликемией (НТГ, СД 2 типа) в постковидном периоде сопровождалось более высоким уровнем общего числа Т-лимфоцитов. При исследовании популяции Т-лимфоцитов выявлены изменения субпопуляционного состава. В группе пациентов с НУО отмечено значимое повышение Т-цитотоксических, Т-регуляторных клеток. Более выраженные изменения субпопуляционного состава определены в группе больных с впервые выявленным СД 2-го типа в постковидном периоде – повышение относительного и абсолютного чисел Т-хелперов и Т-клеток поздней активации лимфоцитов. Данные изменения, вероятно, связаны с компенсаторным повышением Т-лимфоцитов и нарушением регуляции Т-клеточного звена иммун-

**ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ Т-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ЛИЦ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАРУШЕНИЙ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА**

TABLE 1. COMPARISON OF INDICATORS OF THE T CELL COMPONENT OF THE IMMUNE SYSTEM IN INDIVIDUALS WITH POST-COVID SYNDROME DEPENDING ON CARBOHYDRATE METABOLISM DISORDERS

Показатели иммунной системы Indicators of immune system	Группа 1 с НТГ в постковидном периоде Group 1 with IGT in the post-Covid period (n = 30) P1	Группа 2 с СД 2-го типа в постковидном периоде Group 2 with type 2 diabetes in the post-Covid period (n = 30) P2	Группа 3 без НУО в постковидном периоде Group 3 without NDO in the post- Covid period (n = 40) P3	p – уровень значимости p, significance level
Общее число Т-лимфоцитов (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> ), отн. (%) Total number of T lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> ) rel., %	70,72±1,66	75,99±0,70	67,37±0,84	p <sub>1,2</sub> = 0,042* p <sub>1,3</sub> = 0,041* p <sub>2,3</sub> = 0,000*
Общее число Т-лимфоцитов (CD46 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> ), абс. (10 <sup>6</sup> кл/л) Total number of T lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> ) abs., 10 <sup>6</sup> cells/L	1470,73±59,78	1761,20±105,62	1264,38±54,38	p <sub>1,2</sub> = 0,033* p <sub>1,3</sub> = 0,025* p <sub>2,3</sub> = 0,001*
Т-хелперы (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ), отн. (%) T helpers (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ) rel., %	49,01±1,45	55,11±1,06	48,40±0,93	p <sub>1,2</sub> = 0,039* p <sub>1,3</sub> = 0,652 p <sub>2,3</sub> = 0,000*
Т-хелперы (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ), абс. (10 <sup>6</sup> кл/л) T helpers (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ) abs., 10 <sup>6</sup> cells/L	982,60±45,83	1243,21±92,29	940,90±43,37	p <sub>1,2</sub> = 0,008* p <sub>1,3</sub> = 0,419 p <sub>2,3</sub> = 0,004*
Т-цитотоксические (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ), отн. (%) T cytotoxic (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ), rel. (%)	22,90±0,98	24,75±1,65	19,51±0,67	p <sub>1,2</sub> = 0,451 p <sub>1,3</sub> = 0,011* p <sub>2,3</sub> = 0,014*
Т-цитотоксические (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ), абс. (10 <sup>6</sup> кл/л) T cytotoxic (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ), abs., 10 <sup>6</sup> cells/L	491,46±18,33	521,21±40,50	403,16±20,89	p <sub>1,2</sub> = 0,446 p <sub>1,3</sub> = 0,027* p <sub>2,3</sub> = 0,049*
Т-лимфоциты (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ) ранняя активация, отн. % T lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ) early activation, rel. %	6,22±0,50	6,56±0,53	5,39±0,38	p <sub>1,2</sub> = 0,974 p <sub>1,3</sub> = 0,307 p <sub>2,3</sub> = 0,115
Т-лимфоциты (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ) ранняя активация, абс. (10 <sup>6</sup> кл/л) T lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ) early activation, abs. (10 <sup>6</sup> cell/L)	63,80±6,94	68,07±7,95	49,10±3,69	p <sub>1,2</sub> = 0,953 p <sub>1,3</sub> = 0,183 p <sub>2,3</sub> = 0,106
Т-лимфоциты (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> HLA DR <sup>+</sup> ) поздняя активация, отн. % T lymphocytes (CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> HLA DR <sup>+</sup> ) late activation, rel. %	3,65±0,34	4,96±0,50	3,59±0,34	p <sub>1,2</sub> = 0,071 p <sub>1,3</sub> = 0,569 p <sub>2,3</sub> = 0,043*



Таблица 1 (окончание)  
Table 1 (continued)

Показатели иммунной системы Indicators of immune system	Группа 1 с НТГ в постковидном периоде Group 1 with IGT in the post-Covid period (n = 30) P1	Группа 2 с СД 2-го типа в постковидном периоде Group 2 with type 2 diabetes in the post-Covid period (n = 30) P2	Группа 3 без НУО в постковидном периоде Group 3 without NDO in the post- Covid period (n = 40) P3	p – уровень значимости p, significance level
<b>Т-лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA DR<sup>+</sup>) поздняя активация, абс. (10<sup>6</sup> кл/л) T lymphocytes (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA DR<sup>+</sup>) late activation, abs. (10<sup>6</sup> cell/L)</b>	36,73±3,85	48,20±5,37	34,35±3,88	p <sub>1,2</sub> = 0,124 p <sub>1,3</sub> = 0,406 p <sub>2,3</sub> = 0,044*
<b>Т-регуляторные лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>), отн. % T regulatory lymphocytes (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) rel. %</b>	1,83±0,20	2,15±0,38	1,27±0,17	p <sub>1,2</sub> = 0,790 p <sub>1,3</sub> = 0,025* p <sub>2,3</sub> = 0,016*
<b>Т-регуляторные лимфоциты (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>), абс. (10<sup>6</sup> кл/л) T regulatory lymphocytes (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) (10<sup>6</sup> cell/L)</b>	22,00±3,22	26,47±4,12	13,24±1,69	p <sub>1,2</sub> = 0,944 p <sub>1,3</sub> = 0,040* p <sub>2,3</sub> = 0,013*

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

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

ной системы у данной категории больных. Также обнаружение повышенного уровня Т-клеток в группе больных с НУО позволяет предположить наличие продолжающейся хронической стимуляции иммунной системы.

## Выводы

1. Нарушения углеводного обмена, ассоциированные с COVID-19, сопровождаются

изменением субпопуляционного состава Т-лимфоцитов.

2. У лиц с впервые выявленным СД 2 типа в постковидном периоде выявлена гиперактивация Т-клеточного звена иммунной системы.

3. Неоднородные данные получены у лиц с впервые выявленной нарушенной толерантностью к глюкозе, что требует дальнейшего исследования указанной группы больных.

## Список литературы / References

1. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Комелькова М.В., Зурочка В.А., Праскурничий Е.А., Рябова Л.В., Сарапульцев А.П. Изменения врожденных факторов иммунной системы по данным изучения иммунной системы периферической крови у постковидных пациентов // Инфекция и иммунитет, 2023. Т. 13, № 5. С. 864-872. [Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Komelkova M.V., Zurochka V.A., Praskurnichiy E.A., Ryabova L.V., Sarapultsev A.P. Alteration in innate immune cues assessed by analyzing peripheral blood immune system in post-COVID patients. *Infectsiya i immunitet = Journal of Infection and Immunity*, 2023, Vol. 13, no. 5, pp. 864-872. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-AII-9641.

2. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshevnev V.A. Flow cytometry in biomedical research]. Ekaterinburg: RIO Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018. 720 p.

3. Сафронова Э.А., Рябова Л.В., Зурочка А.В. Клинико-иммунологическая характеристика пациентов с острым коронарным синдромом, перенесших Covid-19. [Электронный ресурс] // Вестник уральской ме-

дицинской академической науки, 2023. Т. 20, № 1-2. С. 31-39. [Safronova E.A., Ryabova L.V., Zurochka A.V. Clinical and immunological characteristics of patients with acute coronary syndrome who underwent COVID-19. [Electronic resource]. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2023, Vol. 20, no. 1-2, pp. 31-39. doi: 10.22138/2500-0918-2023-20-1-31-39.

4. Birabaharan M., Kaelber D.C., Pettus J.H., Smith D.M. Risk of new-onset type 2 diabetes in 600 055 people after COVID-19: A cohort study. *Diabetes Obes. Metab.*, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1176-1179.

5. Khunti K., Del Prato S., Mathieu C., Kahn S.E., Gabbay R.A., Buse J.B. COVID-19, hyperglycemia, and new-onset diabetes. *Diabetes Care*, 2021, Vol. 44, pp. 2645-2655.

6. Klein J., Wood J., Jaycox J., Lu P., Dhodapkar R.M., Gehlhausen J.R., Tabachnikova A., Tabacof L., Malik A.A., Kamath K., Greene K., Monteiro V.S., Peña-Hernandez M., Mao T., Bhattacharjee B., Takahashi T., Lucas C., Silva J., Mccarthy D., Breyman E., Tosto-Mancuso J., Dai Y., Perotti E., Akduman K., Tzeng T.J., Xu L., Yildirim I., Krumholz H.M., Shon J., Medzhitov R., Omer S.B., van Dijk D., Ring A.M., Putrino D., Iwasaki A. Distinguishing features of Long COVID identified through immune profiling. *medRxiv [Preprint]*, 2022. doi: 10.1101/2022.08.09.22278592.

7. Li J., Niu Q., Wu A., Zhang Y., Hong L., Wang H. Causal relationship between circulating immune cells and the risk of type 2 diabetes: a Mendelian randomization study. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2023, Vol. 14, 1210415. doi: 10.3389/fendo.2023.1210415

8. Savchuk K.S. Characteristics of T-cell immunity and level of the natural killer cells content in COVID-19 convalescents with carbohydrate metabolism disorders. *Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 797-802. doi: 10.15789/1563-0625-COT-2848.

9. Shuwa H.A., Shaw T.N., Knight S.B., Wemyss K., McClure F.A., Pearmain L., Prise I., Jagger C., Morgan D.J., Khan S., Brand O., Mann E.R., Ustianowski A., Bakerly N.D., Dark P., Brightling C.E., Brij S.; CIRCO; Felton T., Simpson A., Grainger J.R., Hussell T., Konkel J.E., Menon M. Alterations in T and B cell function persist in convalescent COVID-19 patients. *Med*, 2021, Vol. 2, no. 6, pp. 720-735.e4.

---

**Авторы:**

**Савчук К.С.** — врач-эксперт общества с ограниченной ответственностью «АльфаСтрахование-ОМС», г. Челябинск; диссертант ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

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

---

**Authors:**

**Savchuk K.S.**, Expert Doctor of the Limited Liability Company AlfaStrakhovanie-OMS, Chelyabinsk; Dissertation Candidate, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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

---

Поступила 31.03.2024

Отправлена на доработку 01.04.2024

Принята к печати 05.04.2024

---

Received 31.03.2024

Revision received 01.04.2024

Accepted 05.04.2024

## **АКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ АЛИМЕНТАРНО-ЗАВИСИМЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ (ОЖИРЕНИЕМ, САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА)**

**Трушина Э.Н.<sup>1</sup>, Мустафина О.К.<sup>1</sup>, Шарафетдинов Х.Х.<sup>1, 2, 3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Резюме.** Целью исследования является анализ показателей клеточного иммунитета у больных с ожирением (ОЖ) и сахарным диабетом 2-го типа (СД2). В исследование были включены 15 больных СД2 (группа СД2), индекс массы тела (ИМТ)  $37,36 \pm 1,12$  кг/м<sup>2</sup>, 12 пациентов с ОЖ (группа ОЖ), ИМТ –  $38,12 \pm 1,51$  кг/м<sup>2</sup> и 15 практически здоровых лиц (группа сравнения – ГС): ИМТ –  $23,5 \pm 0,15$  кг/м<sup>2</sup>. Исследование выполняли на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, США) с использованием двойных комбинаций моноклональных антител (Beckman Coulter – Immunotech SAS, Франция). Оценивали процентные показатели Т-клеточной популяции [общее количество Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), количество Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), естественных клеток-киллеров – НК-клеток (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), естественных клеток-киллеров, обладающих свойствами Т-лимфоцитов – НКТ-клеток (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) и В-клеточной популяции (CD19<sup>+</sup>) лимфоцитов, а также относительное содержание лимфоцитов, несущих маркеры активации (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), и маркерный антиген апоптоза CD45<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>]. Относительное содержание В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов в периферической крови обследованных лиц не имело статистически достоверных различий. У больных в группах СД2 и ОЖ отмечена тенденция ( $p < 0,1$ ) к повышению относительного содержания Т-хелперов и достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение процента Т-цитотоксических лимфоцитов относительно ГС. Это перераспределение субпопуляций лимфоцитов привело к достоверному ( $p < 0,05$ ) повышению величины ИРИ (условные единицы): СД2 –  $2,87 \pm 0,58$ ; ОЖ –  $2,30 \pm 0,33$  vs ГС –  $1,62 \pm 0,15$ . Относительное содержание в периферической крови обследованных лиц НК-клеток и НКТ-клеток не имело статистически достоверной разницы в величине показателей. Обнаружено статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение относительного

### **Адрес для переписки:**

Трушина Элеонора Николаевна  
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр  
питания, биотехнологии и безопасности пищи»  
109240, Россия, Москва, Устьинский проезд, 2/14.  
Тел.: 8 (495) 698-53-45, 8 (905) 729-12-01.  
E-mail: trushina@ion.ru

### **Address for correspondence:**

Eleonora N. Trushina  
Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology  
and Food Safety  
2/14 Ustinsky Passage  
Moscow  
109240 Russian Federation  
Phone: +7 (495) 698-53-45, +7 (905) 729-12-01.  
E-mail: trushina@ion.ru

### **Образец цитирования:**

Э.Н. Трушина, О.К. Мустафина, Х.Х. Шарафетдинов  
«Активность клеточного иммунитета у больных  
алиментарно-зависимыми заболеваниями (ожирением,  
сахарным диабетом 2-го типа)» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 357-362.  
doi: 10.46235/1028-7221-16616-AOC

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

### **For citation:**

E.N. Trushina, O.K. Mustafina, Kh.Kh. Sharafetdinov  
“Activity of cellular immunity in patients with nutrition-  
dependent diseases (obesity, type 2 diabetes)”, Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024,  
Vol. 27, no. 2, pp. 357-362.  
doi: 10.46235/1028-7221-16616-AOC

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16616-AOC

содержания Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер активации HLA-DR (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) у пациентов в группах СД2 и ОЖ относительно ГС [(%) СД2 – 7,95±0,81; ОЖ – 6,54±0,24; ГС – 4,01±0,91] и достоверное (p < 0,05) повышение процента CD45<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> лимфоцитов у больных с ОЖ и СД2 относительно ГС [(%) СД2 – 5,84±0,68; ОЖ – 5,16±0,89; ГС – 2,78±0,34]. Полученные результаты свидетельствуют о наличии метавоспаления у больных СД2 и ОЖ.

*Ключевые слова:* ожирение, сахарный диабет 2-го типа, клеточный иммунитет, маркеры активации лимфоцитов, метавоспаление

## ACTIVITY OF CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH NUTRITION-DEPENDENT DISEASES (OBESITY, TYPE 2 DIABETES)

Trushina E.N.<sup>a</sup>, Mustafina O.K.<sup>a</sup>, Sharafetdinov Kh.Kh.<sup>a, b, c</sup>

<sup>a</sup> Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The purpose of the study is to analyze the indicators of cellular immunity in patients with obesity (OB) and type 2 diabetes mellitus (DM2). The study included 15 patients with DM2 (DM2 group), body mass index (BMI) 37.36±1.12 kg/m<sup>2</sup>, 12 patients with OB (OB group), BMI – 38.12±1.51 kg/m<sup>2</sup> and 15 practically healthy individuals (comparison group – GC): BMI 23.5±0.15 kg/m<sup>2</sup>. The study was performed on a flow cytometer FC-500 (Beckman Coulter, USA) using double combinations of monoclonal antibodies (Beckman Coulter – Immunotech SAS, France). The percentage indicators of the T cell population were assessed, such as total number of T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>), number of T helper cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), cytotoxic T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), natural killer cells – NK cells (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), natural killer cells with the properties of T lymphocytes – NKT cells (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) and B cell population (CD19<sup>+</sup>) lymphocytes, as well as the relative content of lymphocytes carrying activation markers (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), and apoptosis marker antigen CD45<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>. The relative content of B lymphocytes and T lymphocytes in the peripheral blood of the examined individuals did not have statistically significant differences. In patients in the DM2 and OB groups, there was a tendency (p < 0.1) towards an increase in the relative content of T helper cells and a significant (p < 0.05) decrease in the percentage of T cytotoxic lymphocytes relative to GC. This redistribution of lymphocyte subpopulations led to a significant (p < 0.05) increase in the IRI value (arbitrary units): DM2 – 2.87±0.58; OB – 2.30±0.33 vs GC – 1.62±0.15. The relative content of NK cells and NKT cells in the peripheral blood of the examined individuals did not have a statistically significant difference in the magnitude of the indicators. A statistically significant (p < 0.05) increase in the relative content of T lymphocytes expressing the activation marker HLA-DR (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) was found in patients in the DM2 and OB groups relative to GC [(%) DM2 – 7.95±0.81; OB – 6.54±0.24; GC – 4.01±0.91] and a significant (p < 0.05) increase in the percentage of CD45<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> lymphocytes in patients with OB and DM2 relative to GC [(%) DM2 – 5.84±0.68; OB – 5.16±0.89; GC – 2.78±0.34]. The results obtained indicate the presence of meta-inflammation in patients with DM2 and OB.

*Keywords:* obesity, type 2 diabetes mellitus, cellular immunity, lymphocyte activation markers, meta-inflammation

### Введение

Алиментарно-зависимые заболевания, такие как ожирение (ОЖ) и сахарный диабет 2-го типа (СД2), занимают одно из ведущих мест в мире. ОЖ – это хроническое заболевание, развитие которого опосредовано как генетическими факторами, так и дисбалансом между потребляемой и расходуемой энергией. ОЖ характеризуется

увеличением объема жировой ткани, воспалительные процессы в которой являются основным патогенетическим фактором развития неинфекционных хронических заболеваний. Установлено, что у лиц с избыточной массой тела и ОЖ часто диагностируется метаболический синдром, инсулинорезистентность, СД2, неалкогольная жировая болезнь печени, сердечно-со-

судистая патология [3, 11, 15]. Метаболические нарушения, развивающиеся при ОЖ, являются основой развития хронического вялотекущего системного воспаления – метавоспаления, часто приводящего к иммунной дисфункции [4]. Взаимосвязь метаболизма и иммунитета на системном и клеточном уровнях в настоящее время активно изучается и определяется как иммунометаболизм [10]. Воспаление жировой ткани инициируется и поддерживается дисфункциональными адипоцитами, секретирующими провоспалительные адипокины, и инфильтрацией иммунными клетками, которые экспрессируют цитокины и хемокины [8]. При ОЖ повышенное накопление и воспалительная поляризация иммунных клеток происходят, помимо жировой ткани, в скелетных мышцах, печени, кишечнике, поджелудочной железе, мозге [13]. Наличие хронического вялотекущего системного воспаления при ОЖ доказывают обнаруженные корреляционные взаимосвязи между субпопуляциями лимфоцитов, метаболическими нарушениями и клиническими проявлениями [5]. Помимо лимфоцитов существенную роль в поддержании метавоспаления играет активация макрофагов, дендритных клеток, НК-клеток и других клеток, экспрессирующих медиаторы воспаления [9].

Одним из важных информативных методов оценки иммунной дисфункции при ОЖ является изучение субпопуляционного состава лимфоцитов, маркеров активации и функциональной способности клеток [12]. Метаболизм Т-лимфоцитов определяет их эффекторную функцию, поэтому ассоциированные с ОЖ изменения в биоэнергетике Т-лимфоцитов, приводят к функциональным изменениям на клеточном уровне, изменяют метаболизм и уровни цитокинов/хемокинов [6].

**Целью исследования** является анализ показателей клеточного иммунитета у больных алиментарно-зависимыми заболеваниями (ОЖ, СД2).

## Материалы и методы

Изучение параметров клеточного иммунитета проводили у 15 больных СД2 (группа СД2), индекс массы тела (ИМТ) которых составлял  $37,36 \pm 1,12$  кг/м<sup>2</sup>, возраст –  $52,7 \pm 4,3$  года, у 12 пациентов с диагнозом ожирение (группа ОЖ): ИМТ –  $38,12 \pm 1,51$  кг/м<sup>2</sup>, возраст –  $48,7 \pm 3,5$  года и 15 здоровых лиц (группа сравнения – ГС): ИМТ  $23,5 \pm 0,15$  кг/м<sup>2</sup>, возраст –  $46,7 \pm 3,6$  года без нарушений углеводного и липидного обмена. Во всех обследованных группах примерно четверть пациентов составляли женщины. В исследование не включали больных с онкопатологией, обострением сопутствующих заболеваний, заболеваниями щитовидной железы, хронической почечной недостаточностью. Больные находились

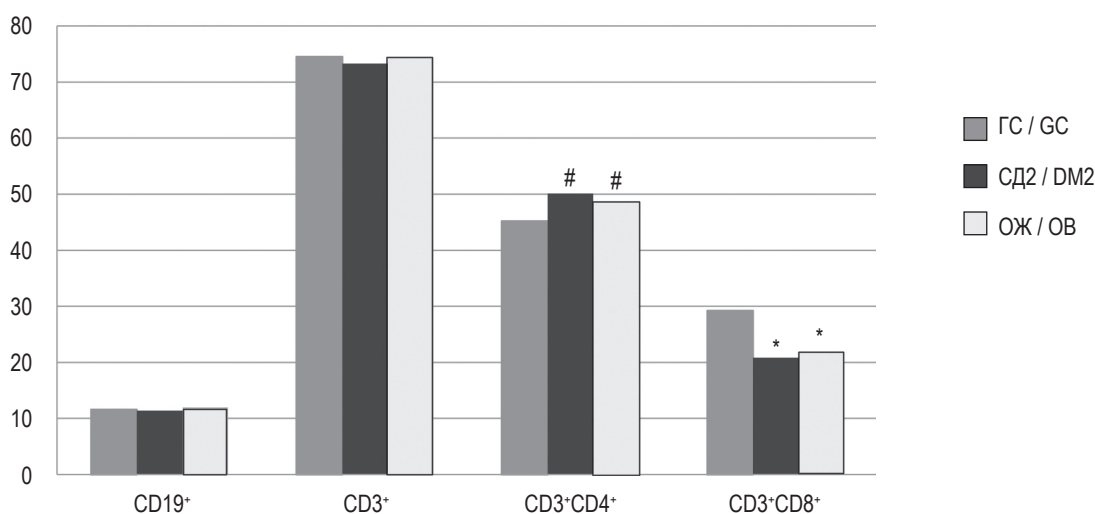
на стационарном лечении в Клинике лечебного питания ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» и наряду с лекарственной терапией получали специализированные низкокалорийные варианты диеты. Исследование одобрено локальным этическим комитетом при Клинике лечебного питания ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» и проведено в соответствии с этическими и нормативными документами Российской Федерации.

Материалом исследования служила венозная кровь обследованных лиц, взятая утром натощак из локтевой вены. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов выполняли на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, США) программе Cytomics CXP Software [1]. В работе применяли методы параметрической (критерий Стьюдента) и непараметрической (критерий Манна–Уитни) статистики. Результаты представлены в виде средних величин и их стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). Уровень значимости считали достоверным при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

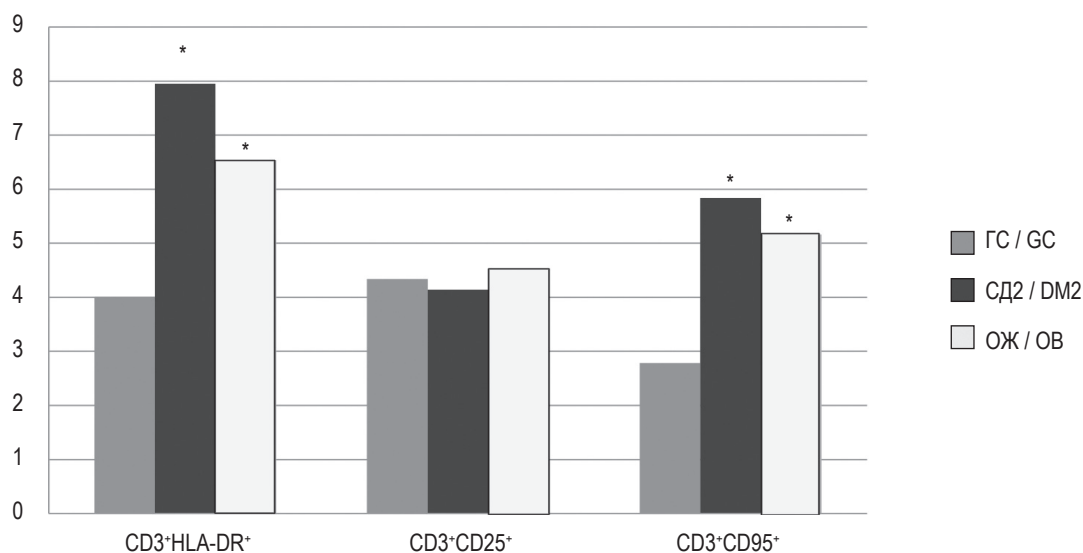
Показатели клеточного иммунитета у больных СД2, ОЖ и ГС представлены на рисунке 1. По относительному содержанию В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов не обнаружено достоверных различий. У больных в группах СД2 и ОЖ отмечена тенденция ( $p < 0,10$ ) к повышению процента Т-хелперов и достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение содержания Т-цитотоксических лимфоцитов относительно ГС. Это перераспределение субпопуляций лимфоцитов привело к достоверному ( $p < 0,05$ ) повышению величины ИРИ (условные единицы): СД2 –  $2,87 \pm 0,58$ ; ОЖ –  $2,30 \pm 0,33$  vs ГС –  $1,62 \pm 0,15$ . Повышение значения ИРИ выше 2 свидетельствует о наличии воспалительного процесса [2]. Достоверных различий исследованных показателей между группами больных с СД2 и ОЖ не обнаружено. Содержание в периферической крови НК-клеток [(%) СД2 –  $12,15 \pm 1,31$ ; ОЖ –  $12,93 \pm 2,50$ ; ГС –  $10,25 \pm 1,62$ ] и НКТ-клеток [(%) СД2 –  $5,75 \pm 1,23$ ; ОЖ –  $5,23 \pm 1,15$ ; ГС –  $7,65 \pm 3,35$ ] у обследованных лиц не имело значимой разницы в величине показателей.

Результаты исследования экспрессии активационных маркеров на Т-лимфоцитах периферической крови представлены на рисунке 2. Для подтверждения наличия метавоспаления у больных с СД2 и ОЖ исследован маркер ранней активации лимфоцитов, который оценивается по экспрессии гена CD25 – легкой ( $\alpha$ ) цепи рецептора к IL-2 [2]. Процентное содержание лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) у испытуемых не имели достоверной разницы (рис. 2).



**Рисунок 1. Относительное содержание субпопуляций лимфоцитов в периферической крови больных СД2, ОЖ и ГС**  
Примечание. \* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) от показателей ГС; # – различия на уровне тенденции ( $p < 0,10$ ) от показателей ГС. Обозначения: СД2 – сахарный диабет 2-го типа, ОЖ – ожирение, ГС – группа сравнения.

Figure 1. Relative content of lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of patients with DM2, OB and GC  
Note. \*, statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) from GC indicators; #, differences at the trend level ( $p < 0.10$ ) from GC indicators.  
Designations: DM2, type 2 diabetes mellitus; OB, obesity; GC, comparison group.



**Рисунок 2. Экспрессия активационных маркеров на лимфоцитах в периферической крови больных СД2, ОЖ и ГС**  
Примечание. \* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) от показателей ГС. Обозначения: СД2 – сахарный диабет 2-го типа; ОЖ – ожирение; ГС – группа сравнения.

Figure 2. Expression of activation markers on lymphocytes in the peripheral blood of patients with DM2, OB and GC  
Note. \*, statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) from GS indicators. Designations: DM2, type 2 diabetes mellitus; OB, obesity; GC, comparison group.

В результате исследования установлено у пациентов в группах СД2 и ОЖ относительно ГС (рис. 2) достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение процента Т-лимфоцитов, экспрессирующих поздний маркер активации HLA-DR ( $CD3^+HLA-DR^+$ ), что характерно для многих хронических воспалительных заболеваний [2]. Наличие CD95-антигена (APO-1, Fas-антиген) на активированных лимфоцитах свидетельствует об активации процесса апоптоза. Апоптоз – физиологический процесс генетически запрограммированной гибели клетки и является важным механизмом регуляции иммунного ответа [7]. В исследовании обнаружено достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение

процента лимфоцитов ( $CD45^+CD95^+$ ) в группах больных с ОЖ и СД2 относительно ГС (рис. 2). Апоптоз лимфоцитов у больных СД2 и ОЖ является активатором клеточной дисфункции, что приводит к снижению иммунитета и увеличению частоты инфекционных заболеваний [14].

## Заключение

На основании проведенного исследования у больных СД2 и ОЖ установлено наличие метаболического синдрома, которое характеризуется повышением величины ИРИ больше 2 усл. ед. и увеличением относительного содержания активированных лимфоцитов.

## Список литературы / References

1. Трушина Э.Н., Выборнов В.Д., Ригер Н.А., Мустафина О.К., Солнцева Т.Н., Тимонин А.Н., Зилова И.С., Раджабканиев Р.М. Иммуномодулирующие эффекты использования L-карнитина и коэнзима Q10 в питании спортсменов-юниоров // Вопросы питания. 2019. Т. 88, № 2. С. 40-49. [Trushina E.N., Vybornov V.D., Riger N.A., Mustafina O.K., Solntseva T.N., Timonin A.N., Zilova I.S., Radzhabkadev R.M. Immunomodulatory effects of using L-carnitine and coenzyme Q10 in the nutrition of junior athletes. *Voprosy pitaniia = Problems of Nutrition*, 2019, Vol. 88, no. 2. pp. 40-49. (In Russ.)]
2. Ярец Ю.И. Интерпретация результатов иммунограммы. Гомель: ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», 2020. 38 с. [Yarets Yu.I. Interpretation of immunogram results]. *Gomel: Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology*, 2020. 38 p.
3. Brunt E.M., Wong V.W., Nobili V., Day C.P., Sookoian S., Maher J.J., Bugianesi E., Sirlin Cl., Neuschwander-Tetri Br. A., Rinella M.E. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2015, no. 1, 15080. doi:10.1038/nrdp.2015.80.
4. Cable J., Rathmell J.C., Pearce E.L., Ho P.C., Haigis M.C., Mamedov M.R., Wu M.J., Kaech S.M., Lynch L., Febbraio M.A., Bapat S.P., Hong H.S., Zou W., Belkaid Y., Sullivan Z.A., Keller A., Wculek St.K., Green D.R., Postic C., Amit I., Benitah S.A., Jones R.G., Reina-Campos M., Torres S.V., Beyaz S., Brennan D., O'Neill L.A.J., Perry R.J., Brenner D. Immunometabolism at the crossroads of obesity and cancer—a Keystone Symposia report. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2023, Vol. 1523, no. 1, pp. 38-50.
5. Dunbar C.L., Aukema H.M., Calder P.C., Gibson D.L., Henrickson S.E., Khan S., Mailhot G., Panahi S., Tabung F.K., Tom M., Upton J.E.M., Winer D.A., Field C.J. Nutrition and immunity: perspectives on key issues and next steps. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 2023, Vol. 48, no. 7, pp. 484-497.
6. Eljaafari A., Pestel J., Le Magueresse-Battistoni B., Chanon S., Watson J., Robert M., Disse E., Vidal H. Adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells mediate PD-L1 overexpression in the white adipose tissue of obese individuals, resulting in T cell dysfunction. *Cells*, 2021, Vol. 10, no. 10, 2645. doi: 10.3390/cells10102645.
7. Granville D.J., Carthy C.M., Hunt D.W., McManus B.M. Apoptosis: Molecular aspects of cell death and disease. *Lab. Investig.*, 1998, Vol. 78, no. 8, pp. 893-913.
8. Kawai T., Autieri M.V., Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2021, Vol. 320, no. 3, pp. 375-391.
9. Li Y., Wang F., Imani S., Tao L., Deng Y., Cai Y. Natural killer cells: friend or foe in metabolic diseases? *Front. Immunol.*, 2021, no. 12, 614429. doi: 10.3389/fimmu.2021.614429.
10. Makowski L., Chaib M., Rathmell J.C. Immunometabolism: From basic mechanisms to translation. *Immunol. Rev.*, 2020, Vol. 295, no. 1, pp. 5-14.
11. Ortega F.B., Lavie C.J., Blair S.N. Obesity and cardiovascular disease. *Circ. Res.*, 2016, Vol. 118, no. 11, pp. 1752-1770.
12. Rivera-Carranza T., Nájera-Medina O., Bojalil-Parra R., Rodríguez-López C., Zúñiga-León E., León-Téllez Girón A., Azaola-Espinosa A. The link between lymphocyte subpopulations in peripheral blood and metabolic variables in patients with severe obesity. *Peer J.*, 2023, no. 11, e15465. doi: 10.7717/peerj.15465.
13. Wu H., Ballantyne C.M. Metabolic inflammation and insulin resistance in obesity. *Circ. Res.*, 2020, Vol. 126, no. 11, pp. 1549-1564.

14. Xu H., Chen Y., Li Y., Xia F., Han B., Zhang H., Zhai H., Wu H., Li Y., Lu Y. Mitochondrial apoptosis of lymphocyte is induced in type 2 diabetes. *Chin. Med. J. (Engl)*, 2014, Vol. 127, no. 2, pp. 213-217.
15. Zatterale F., Longo M., Naderi J., Raciti G.A., Desiderio A., Miele C., Beguinot F. Chronic adipose tissue inflammation linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Front. Physiol.*, 2020, no. 10, 1607. doi: 10.3389/fphys.2019.01607.

---

**Авторы:**

**Трушина Э.Н.** — к.м.н., заведующая лабораторией иммунологии ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия

**Мустафина О.К.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия

**Шарафетдинов Х.Х.** — д.м.н., заведующий отделением болезней обмена веществ и диетотерапии клиники лечебного питания ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»; профессор кафедры диетологии и нутрициологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры гигиены питания и токсикологии ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

---

**Authors:**

**Trushina E.N.**, PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunology, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russian Federation

**Mustafina O.K.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russian Federation

**Sharafetdinov Kh.Kh.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Metabolic Diseases and Diet Therapy of the Clinical Nutrition Clinic, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety; Professor, Department of Dietetics and Nutritionology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; Professor, Department of Food Hygiene and Toxicology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

---

Поступила 21.03.2024  
Отправлена на доработку 23.03.2024  
Принята к печати 25.03.2024

---

Received 21.03.2024  
Revision received 23.03.2024  
Accepted 25.03.2024



## СИСТЕМНЫЙ ДИСБАЛАНС ИЗОФОРМ TGF- $\beta$ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

Ручкин М.П.<sup>1,2</sup>, Маркелова Е.В.<sup>1</sup>, Федяшев Г.А.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> ООО «Приморский центр микрохирургии глаза», г. Владивосток, Россия

**Резюме.** Трансформирующий фактор роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) – это группа схожих по структуре многофункциональных регуляторных белков, проявляющих плеiotропность в различных тканях организма. Учитывая, что изоформы TGF- $\beta$  проявляют тропность к различным клеткам, а при диабетической ретинопатии одновременно могут реализовываться как нейродегенеративный процесс, так и повреждение микрососудов, считаем, что изучение содержания TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 у пациентов с различными проявлениями диабетической ретинопатии (ДР) является актуальным. Цель исследования – определить уровни TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 в сыворотке крови у пациентов с нейродегенеративными и сосудистыми проявлениями диабетической ретинопатии на фоне сахарного диабета 2-го типа. В исследовании приняли участие 80 пациентов с диагнозом сахарный диабет 2-го типа и 30 практически здоровых добровольцев. На основании офтальмоскопии и оптической когерентной томографии (ОКТ) пациенты с сахарным диабетом 2-го типа были разделены на 4 группы: 1-я группа (n = 12) – пациенты без сосудистых симптомов ДР на глазном дне и без ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки; 2-я группа (n = 28) – пациенты без сосудистых симптомов ДР на глазном дне и наличием ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки; 3-я группа (n = 10) – пациенты с сосудистыми симптомами непролиферативной ДР и без ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки; 4-я группа (n = 30) – пациенты с сосудистыми симптомами непролиферативной ДР и наличием ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки. Сывороточное содержание TGF- $\beta$ 1 во всех группах было в пределах референсных значений на протяжении всего исследования. Сывороточная концентрация TGF- $\beta$ 2 во всех группах была выше в сравнении с контрольной группой. Содержание TGF- $\beta$ 3 в сыворотке крови пациентов с нейродегенеративными проявлениями диабетической ретинопатии (2-я и 4-я группы) был достоверно ниже референсных значений. Более выраженный дефицит отмечался в 4-й группе, пациенты которой имели как сосудистые, так и нейродегенеративные признаки ДР. Представленное исследование показало наличие системного дисбаланса уровней TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3

### Адрес для переписки:

Ручкин Михаил Петрович  
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ  
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2.  
Тел.: 8 (924) 137-04-78.  
E-mail: michaelr-n@mail.ru

### Address for correspondence:

Mikhail P. Ruchkin  
Pacific State Medical University  
2 Ostryakov Ave  
Vladivostok  
690002 Russian Federation  
Phone: +7 (924) 137-04-78.  
E-mail: michaelr-n@mail.ru

### Образец цитирования:

М.П. Ручкин, Е.В. Маркелова, Г.А. Федяшев  
«Системный дисбаланс изоформ TGF- $\beta$  у пациентов с различными проявлениями диабетической ретинопатии» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 363-368.  
doi: 10.46235/1028-7221-16613-SIO

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

### For citation:

M.P. Ruchkin, E.V. Markelova, G.A. Fedyashev “Systemic imbalance of TGF- $\beta$  isoforms in patients with various manifestations of diabetic retinopathy”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 363-368.  
doi: 10.46235/1028-7221-16613-SIO

© Ruchkin M.P. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.46235/1028-7221-16613-SIO

при сосудистых и нейрональных проявлениях диабетической ретинопатии. Полученные результаты подтверждают данные о том, что изменение продукции цитокинов из семейства TGF- $\beta$  при одном патологическом процессе может иметь разнонаправленный характер.

*Ключевые слова:* трансформирующий фактор роста, диабетическая ретинопатия, сахарный диабет, нейродегенерация

## SYSTEMIC IMBALANCE OF TGF- $\beta$ ISOFORMS IN PATIENTS WITH VARIOUS MANIFESTATIONS OF DIABETIC RETINOPATHY

Ruchkin M.P.<sup>a, b</sup>, Markelova E.V.<sup>a</sup>, Fedyashev G.A.<sup>a, b</sup>

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

<sup>b</sup> Primorsky Eye Microsurgery Center, Vladivostok, Russian Federation

**Abstract.** Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a group of structurally similar multifunctional regulatory proteins that exhibit pleiotropy in various tissues of the body. Considering that TGF- $\beta$  isoforms show tropism to various cells, and in diabetic retinopathy both a neurodegenerative process and damage to microvessels can be simultaneously realized, we believe that the study of the content of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, and TGF- $\beta$ 3 in patients with various manifestations of diabetic retinopathy (DR) is relevant. The aim of the study was to determine the levels of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, and TGF- $\beta$ 3 in the blood serum in patients with neurodegenerative and vascular manifestations of diabetic retinopathy against the background of type 2 diabetes mellitus. The study involved 80 patients diagnosed with type 2 diabetes mellitus and 30 healthy volunteers. Based on ophthalmoscopy and optical coherence tomography (OCT), patients with type 2 diabetes mellitus were divided into 4 groups: Group 1 (n = 12) – patients without vascular symptoms of fundus DR and without OCT signs of retinal neurodegeneration; Group 2 (n = 28) – patients without vascular symptoms of fundus DR and the presence of OCT signs of retinal neurodegeneration; Group 3 (n = 10) – patients with vascular symptoms of non-proliferative DR and without OCT signs of retinal neurodegeneration; and Group 4 (n = 30) – patients with vascular symptoms of non-proliferative DR and the presence of OCT signs of retinal neurodegeneration. The serum content of TGF- $\beta$ 1 in all groups was within the reference values throughout the study. The serum concentration of TGF- $\beta$ 2 in all groups was higher in comparison with the control group. The content of TGF- $\beta$ 3 in the blood serum of patients with neurodegenerative manifestations of diabetic retinopathy (groups 2 and 4) was significantly lower than the reference values. A more pronounced deficiency was observed in group 4, whose patients had both vascular and neurodegenerative signs of DR. The presented study showed the presence of a systemic imbalance in the levels of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, and TGF- $\beta$ 3 in vascular and neuronal manifestations of diabetic retinopathy. The results obtained confirm the data that changes in the production of cytokines from the TGF- $\beta$  family in one pathological process can be multidirectional.

*Keywords:* transforming growth factor, diabetic retinopathy, diabetes mellitus, neurodegeneration

### Введение

Трансформирующий фактор роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) – это группа схожих по структуре многофункциональных регуляторных белков, проявляющих плеiotропность в различных тканях организма [8]. Среди основных функций TGF- $\beta$  можно выделить следующие: влияние на деление, дифференцировку и выживание клеток, участие в морфогенезе, ангиогенезе, ремоделировании

тканей и воспалении, поддержание гомеостаза [4]. Основными представителями суперсемейства TGF- $\beta$  являются три изоформы TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, которые, несмотря на схожую структуру, при различных патологических и физиологических процессах реализуют неодинаковые эффекты [8].

Диабетическая ретинопатия (ДР) – многокомпонентное, нейромикрососудистое, специфиче-

ское поражение сетчатки глазного яблока, возникающее у пациентов с сахарным диабетом [1]. Патогенез диабетического повреждения микрососудов и нервных клеток сетчатки является сложным и мультифакторным, в котором нарушение баланса между различными биологически активными молекулами играет ключевую роль [2].

Учитывая, что изоформы TGF-β проявляют тропность к различным клеткам, а при диабетической ретинопатии одновременно могут реализовываться как нейродегенеративный процесс, так и повреждение микрососудов, считаем, что изучение содержания TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 у пациентов с различными проявлениями диабетической ретинопатии является актуальным.

**Цель исследования** – определить уровни TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 в сыворотке крови у пациентов с нейродегенеративными и сосудистыми проявлениями диабетической ретинопатии на фоне сахарного диабета 2-го типа.

## Материалы и методы

В соответствии с запланированным дизайном (одобрен локальным этическим комитетом при ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, протокол № 4 от 16.12.2019) и критериями включения/исключения, в исследовании приняли участие 80 пациентов с диагнозом «сахарный диабет 2 типа» и 30 практически здоровых добровольцев. Лицам контрольной и основной групп был проведен стандартный офтальмологический осмотр и обследование на оптическом когерентном томографе RTvue-100 (Optovue, США). Средний возраст пациентов основной группы составил 60,8 (54-68) года, медиана длительности сахарного диабета равнялась 6,5 (3,25-10) года, все пациенты наблюдались у врача-эндокринолога, контроль гликемии осуществляли при помощи пероральных сахароснижающих препаратов. Клинико-инструментальное обследование контрольной группы не выявило патологических изменений органа зрения. На основании офтальмоскопии и оптической когерентной томографии (ОКТ) пациенты с сахарным диабетом 2-го типа были разделены на 4 группы: 1-я группа (n = 12) – пациенты без сосудистых симптомов ДР на глазном дне и без ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки; 2-я группа (n = 28) – пациенты без сосудистых симптомов ДР на глазном дне и наличием ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки; 3-я группа (n = 10) – пациенты с сосудистыми

ми симптомами непролиферативной ДР и без ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки; 4-я группа (n = 30) – пациенты с сосудистыми симптомами непролиферативной ДР и наличием ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки.

Всем участникам исследования при первичном осмотре проводился забор венозной крови с последующим центрифугированием для получения сыворотки. Определение концентрации TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 в сыворотке крови проводили при помощи ИФА-анализатора (Multiscan, Финляндия) и специфических реактивов компании R&D Diagnostics Inc. (США), значения выражали в нг/мл или пг/мл. По истечении 6 месяцев пациенты основной группы были приглашены на повторное клинико-инструментальное и лабораторное обследование.

Статистический анализ результатов проводили при помощи программы SPSS Statistics v. 23 (IBM, США). Результаты представляли в виде медиан (Me), нижнего (Q<sub>0,25</sub>) и верхнего (Q<sub>0,75</sub>) квартилей. Использовали непараметрические критерии, различия между группами считали значимыми при p < 0,05.

## Результаты и обсуждение

Показатели сывороточного уровня изоформ TGF-β представлены в таблице 1.

Сывороточное содержание TGF-β1 во всех группах было в пределах референсных значений на протяжении всего исследования. В экспериментальных исследованиях показано, что данная изоформа TGF-β принимает участие в эмбриогенезе, васкулогенезе, гематопозе и подавлении воспалительных реакций [8]. Однако существуют данные, показывающие роль TGF-β1 в модификации функциональной активности микроглии сетчатки, которая заключается в подавлении их трансформации в M1-фенотип [6]. Chen H. и соавт. (2020) в своей работе продемонстрировали способность TGF-β1 повышать резистентность ганглиозных клеток сетчатки в условиях гипергликемии [4]. Таким образом, TGF-β1, хотя и не является ведущей изоформой данного семейства в глазном яблоке, но, учитывая его свойства, можно предположить, что уровень TGF-β1, сравнимый с контролем, является недостаточным в условиях сахарного диабета, что может играть роль в развитии диабетической ретинопатии.

Сывороточная концентрация TGF-β2 во всех группах была выше в сравнении с контроль-

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ГРУПП 1-4 И У ЛИЦ КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ (TGF-β1- нг/мл, TGF-β2, TGF-β3- пг/мл), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

**TABLE 1. TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 IN THE SERUM OF PATIENTS OF GROUPS 1-4 AND IN CONTROL PATIENTS (TGF-β1- ng/mL, TGF-β2, TGF-β3- pg/mL), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

Изоформа TGF-β TGF-β Isoform	Контрольная группа Control group	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4
<b>TGF-β1 первично TGF-β1 primary</b>	36,81 (34,30-43,01)	35,2 (29,38-38,50)	36,19 (30,93-43,22)	36,12 (34,16-39,72)	36,36 (27,79-42,49)
<b>TGF-β1 через 6 месяцев TGF-β1 after 6 months</b>	—	34,5 (29,57-40,81)	36,44 (29,97-42,21)	35,89 (33,19-39,98)	36,45 (28,89-42,51)
<b>TGF-β2 первично TGF-β2 primary</b>	116,9 (103,87-150,41)	142,86 (127,06-185,34) <sup>a</sup>	142,75 (122,59-183,70) <sup>a</sup>	139,76 (120,55-175,43) <sup>a</sup>	141,25 (118,93-172,43) <sup>a</sup>
<b>TGF-β2 через 6 месяцев TGF-β2 after 6 months</b>	—	142,63 (124,96-181,31) <sup>a</sup>	144,02 (123,23-182,97) <sup>a</sup>	140,18 (125,68-177,31) <sup>a</sup>	137,21 (125,68-177,66) <sup>a</sup>
<b>TGF-β3 первично TGF-β3 primary</b>	119,49 (66,09-196,64)	132,24 (59,14-191,00)	69,8 (37,54-118,50) <sup>a, b</sup>	118,31 (64,73-188,45)	49,8 (35,68-71,87) <sup>a, c, d</sup>
<b>TGF-β3 через 6 месяцев TGF-β3 after 6 months</b>	—	123,33 (63,23-190,80)	75,89 (38,23-122,60) <sup>a, b</sup>	116,48 (64,21-186,43)	50,33 (34,13-76,34) <sup>a, c, d</sup>

Примечание. <sup>a</sup> – достоверная разница с контролем (p < 0,05); <sup>b</sup> – достоверная разница между группами 1 и 2 (p < 0,05); <sup>c</sup> – достоверная разница между группами 3 и 4 (p < 0,05); <sup>d</sup> – достоверная разница между группой 4 и группами 1-3 (p < 0,05).

Note. <sup>a</sup>, a significant difference with the control (p < 0.05); <sup>b</sup>, a significant difference between groups 1 and 2 (p < 0.05); <sup>c</sup>, a significant difference between groups 3 and 4 (p < 0.05); <sup>d</sup>, a significant difference between group 4 and groups 1-3 (p < 0.05).

ной группой. Эта изоформа TGF-β чаще других обнаруживается в нервной системе и органах чувств, как при физиологических состояниях, так и при патологических процессах [8]. Некоторые авторы зафиксировали высокие концентрации TGF-β2 в стекловидном теле у пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией, что, возможно, связано с его пролиферативной и фибринопластической активностью [3, 5]. Также показана важная способность этого ростового фактора стимулировать секрецию нейротро-

фических факторов, которые играют ключевую роль в поддержании жизнедеятельности нейронов [4]. Вероятно, повышение TGF-β2 у пациентов с сахарным диабетом можно расценивать как компенсаторный ответ на хроническое воспаление, однако перманентно высокий системный уровень данного цитокина способен приводить к гиперактивации иммунных клеток и усугублять течение диабетической ретинопатии.

Содержание TGF-β3 в сыворотке крови пациентов с нейродегенеративными проявлениями ди-

абетической ретинопатии (2-я и 4-я группы) был достоверно ниже референсных значений. Более выраженный дефицит отмечался в 4-й группе, пациенты которой имели как сосудистые, так и нейродегенеративные признаки ДР. Выявленную закономерность можно объяснить тем, что снижение уровня TGF-β3 может приводить к уменьшению секреции нейротрофических факторов, что стимулирует нейродегенеративный процесс [4]. Ранее была установлена способность этого цитокина предотвращать повреждение сосудистой стенки у больных сахарным диабетом через угнетение секреции плацентарного фактора роста и фактора роста эндотелия сосудов [8]. Таким образом, дефицит TGF-β3 может потенцировать развитие микрососудистых и нейрональных проявлений ДР.

## Выводы

Изучение вклада различных иммунных факторов в патогенез диабетической ретинопатии является неотъемлемой частью поиска фундаментальных основ сахарного диабета и его осложнений. Представленное исследование показало наличие системного дисбаланса уровней TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 при сосудистых и нейрональных проявлениях диабетической ретинопатии. Полученные результаты подтверждают данные о том, что изменение продукции цитокинов из семейства TGF-β при одном патологическом процессе может иметь разнонаправленный характер. Требуется изучение локальных уровней исследуемых ростовых факторов у пациентов с различными проявлениями диабетической ретинопатии на ранних и поздних стадиях.

## Список литературы / References

1. Дедов И.И., Шестакова М.В., Майоров А.Ю., Мокрышева Н.Г., Андреева Е.Н., Безлепкина О.Б., Петеркова В.А., Артемова Е.В., Бардюгов П.С., Бешлиева Д.Д., Бондаренко О.Н., Бурумкулова Ф.Ф., Викулова О.К., Волеводз Н.Н., Галстян Г.Р., Гомова И.С., Григорян О.Р., Джемилева З.Н., Ибрагимова Л.И., Калашников В.Ю., Кононенко И.В., Кураева Т.Л., Лаптев Д.Н., Липатов Д.В., Мельникова О.Г., Михина М.С., Мичурова М.С., Мотовилин О.Г., Никонова Т.В., Роживанов Р.В., Смирнова О.М., Старостина Е.Г., Суркова Е.В., Сухарева О.Ю., Тиселько А.В., Токмакова А.Ю., Шамхалова М.Ш., Шестакова Е.А., Ярек-Мартынова И.Я., Ярославцева М.В. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. 11-й выпуск // Сахарный диабет, 2023. Т. 26, № 2S. С. 1-157. [Dedov I.I., Shestakova M.V., Mayorov A.Yu., Mokrysheva N.G., Andreeva E.N., Bezlepkin O.B., Peterkova V.A., Artemova E.V., Bardiugov P.S., Beshlieva D.D., Bondarenko O.N., Burumkulova F.F., Vikulova O.K., Volevodz N.N., Galstyan G.R., Gomova I.S., Grigoryan O.R., Dzhemilova Z.N., Ibragimova L.I., Kalashnikov V.Yu., Kononenko I.V., Kuraeva T.L., Laptev D.N., Lipatov D.V., Melnikova O.G., Mikhina M.S., Michurova M.S., Motovilin O.G., Nikonova T.V., Rozhivanov R.V., Smirnova O.M., Starostina E.G., Surkova E.V., Sukhareva O.Yu., Tiselko A.V., Tokmakova A.Yu., Shamkhalova M. Sh., Shestakova E.A., Jarek-Martynova I.Ya., Yaroslavceva M.V. Standards of Specialized Diabetes Care. 11<sup>th</sup> Edition. *Sakharnyy diabet = Diabetes Mellitus*, 2023, Vol. 26, № 2S, pp. 1-157. (In Russ.)]
2. Ручкин М.П., Маркелова Е.В., Федяшев Г.А., Ющук В.Н. Роль цитокинов, нейропептидов и матриксных металлопротеиназ в иммунопатогенезе нейродегенерации сетчатки при диабетической ретинопатии // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 515-520. [Ruchkin M.P., Markelova E.V., Fedyashev G.A., Yushchuk V.N. Role of cytokines, neuropeptides and matrix metalloproteinases in the immunopathogenesis of retinal neurodegeneration in diabetic retinopathy. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 515-520. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1157-ROC.
3. Черных Д.В., Горбенко О.М., Шваюк А.П., Обухова О.О., Черных В.В. Трунов А.Н. Трансформирующий фактор роста бета и некоторые цитокины в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией // Медицина и образование в Сибири, 2015. № 1. С. 31. [Chernykh D.V., Gorbenko O.M., Shvayuk A.P., Obukhova O.O., Chernykh V.V., Trunov A.N. Transforming beta growth factor and some cytokinea in vitreous body of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Meditcina i obrazovaniye v Sibiri = Journal of Siberian Medical Sciences*, 2015, Vol. 1, p. 31. (In Russ.)]
4. Chen H., Ho Y., Chou H., Liao E., Tsai Y., Wei Y., Lin L., Lin M., Wang Y., Ko M., Chan H. The role of transforming growth factor-beta in retinal ganglion cells with hyperglycemia and oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 18, 6482. doi: 10.3390/ijms21186482.

5. Deuchler S., Schubert R., Singh P., Chedid A., Brui N., Kenikstul N. Vitreous expression of cytokines and growth factors in patients with diabetic retinopathy – An investigation of their expression based on clinical diabetic retinopathy grade. *PLoS One*, Vol. 16, no. 5, e02488439. doi: 10.1371/journal.pone.0248439.
6. Li X., Yu Z., Li H., Yuan Y., Gao X., Kuang H. Retinal microglia polarization in diabetic retinopathy. *Vis. Neurosci.*, 2021, Vol. 38, e006. doi: 10.1017/s0952523821000031.
7. Pan W., Lin F., Fort P. The innate immune system in diabetic retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2021, Vol. 84, 100940. doi: 10.1016/j.preteyeres.2021.100940.
8. Schlecht A., Vallon M., Wagner N., Ergun S., Braunger B. TGFβ-neurotrophin interactions in heart, retina and brain. *Biomolecules*, 2021, Vol. 11, 1360. doi: 10.3390/biom11091360.

---

**Авторы:**

**Ручкин М.П.** — ассистент кафедры офтальмологии и оториноларингологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач-офтальмолог ООО «Приморский Центр микрохирургии глаза»;

**Маркелова Е.В.** — д.м.н., профессор, проректор по научно-исследовательской деятельности, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

**Федяшев Г.А.** — д.м.н., профессор кафедры офтальмологии и оториноларингологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; главный врач ООО «Приморский центр микрохирургии глаза», г. Владивосток, Россия

**Authors:**

**Ruchkin M.P.**, Assistant Professor, the Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, Pacific State Medical University; Ophthalmologist of Primorsky Eye Microsurgery Center, Vladivostok, Russian Federation

**Markelova E.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Vice-rector for Research Activities, Head of Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

**Fedyashev G.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, Pacific State Medical University; Head Physician, Primorsky Eye Microsurgery Center, Vladivostok, Russian Federation

---

Поступила 21.03.2024  
Отправлена на доработку 23.03.2024  
Принята к печати 25.03.2024

---

Received 21.03.2024  
Revision received 23.03.2024  
Accepted 25.03.2024

## О СВЯЗИ МЕЖДУ УРОВНЯМИ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ КОМПЛЕМЕНТА

Бельтюков П.П.<sup>1</sup>, Токарев А.Ю.<sup>1</sup>, Смирнова А.С.<sup>1</sup>, Бельтюкова М.Е.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, Ленинградская обл., Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Мочевая кислота является конечным продуктом обмена пуриновых нуклеотидов и веществом, способствующим развитию хронического воспалительного процесса. Одним из механизмов развития воспаления, связанного с действием мочевой кислоты, является способность кристаллов ее солей, в основном мононатриевой соли, активировать инфламмосомы NLRP3. На этом основании мочевая кислота и кристаллы ее солей отнесены к молекулярным паттернам, связанным с повреждением (DAMP). К эффектам кристаллов солей мочевой кислоты, связанных с ответом иммунной системы, относится и их способность активировать систему комплемента. Результатом такой активации становится повышение концентраций C3a, C4a и C5a, а также избыточное расходование белков системы комплемента. Несмотря на то, что о способности мочевой кислоты активировать систему комплемента известно давно, сведения о связи гиперурикемии и функциональной активности комплемента, которую можно оценить по комплемент-опосредованному гемолизу в литературе отсутствуют. Поэтому обоснование предельной концентрации мочевой кислоты в крови, не приводящей к спонтанной активации системы комплемента, является актуальным вопросом. В настоящем исследовании предпринята попытка установить предельные концентрации мочевой кислоты, которые не оказывают эффекта на функциональную активность комплемента, оцененную по параметрам комплемент-опосредованного гемолиза. В ходе исследования оценены взаимосвязи между параметрами функциональной активности комплемента и некоторыми биохимическими показателями крови с концентрацией мочевой кислоты методами корреляционного анализа. В качестве показателей функциональной активности комплемента рассматривали скорость ( $V_{lys}$ ) и время 50%-

### Адрес для переписки:

Бельтюков Петр Петрович  
ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены,  
профпатологии и экологии человека» ФМБА России  
Россия, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский мкр-н,  
г. п. Кузьмолловский, ул. Заводская, зд. 6/2, корп. 93.  
Тел.: 8 (921) 341-21-22.  
Тел./факс: 8 (812) 449-61-68 (доб. 340).  
E-mail: biochem2005@rambler.ru

### Address for correspondence:

Petr P. Belyukov  
Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and  
Human Ecology of the Federal Medical-Biological Agency  
6/2 Zavodskaya St, Bldg 93  
g.p. Kuzmolovskii, Vsevolozhsky district, Leningrad Region  
188663 Russian Federation  
Phone: +7 (921) 341-21-22.  
Phone/fax: +7 (812) 449-61-68 (acc. 340).  
E-mail: biochem2005@rambler.ru

### Образец цитирования:

П.П. Бельтюков, А.Ю. Токарев, А.С. Смирнова,  
М.Е. Бельтюкова «О связи между уровнями мочевой  
кислоты в сыворотке крови и функциональной  
активностью комплемента» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 369-374.  
doi: 10.46235/1028-7221-16800-RBS

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

### For citation:

P.P. Belyukov, A.Yu. Tokarev, A.S. Smirnova,  
M.E. Belyukova "Relationship between serum uric acid  
levels and complement functional activity", Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024,  
Vol. 27, no. 2, pp. 369-374.  
doi: 10.46235/1028-7221-16800-RBS

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16800-RBS

ного гемолиза ( $T_{50}$ ). Взаимосвязи между исследованными показателями удалось продемонстрировать с использованием показательной функции  $y = a \cdot e^{[x]}$ , которая в данном случае принимает вид  $y = [MK] \cdot e^{[C3]}$ . Аргументом функции является концентрация C3, основание степени равно основанию натурального логарифма, а коэффициент пропорциональности равен концентрации мочевой кислоты. Как оказалось, значения данной функции находятся в обратной зависимости от соответствующих значений  $T_{50}$  ( $r = 0,83$ ,  $p < 0,0001$ ) в диапазоне концентрации мочевой кислоты, превышающей 370 мкМ. Это значение концентрации мочевой кислоты почти равно верхней границе нормы для женщин и находится в пределах диапазона нормы для мужчин. Таким образом, подход к оценке роли мочевой кислоты в активации комплемента с использованием анализа параметров комплемент-опосредованного гемолиза эффективен для демонстрации патогенетической функции мочевой кислоты в развитии воспалительного процесса без вовлечения инфламмосом путем прямого воздействия на процессы активации комплемента. По нашему мнению, этот эффект реализуется главным образом за счет альтернативного пути комплемента. Продемонстрированные связи позволяют говорить об условности верхних границ диапазона нормальных концентраций мочевой кислоты и вероятной целесообразности их пересмотра.

*Ключевые слова:* мочевая кислота, гиперурикемия, система комплемента, факторы комплемента, С-реактивный белок, IgM

## RELATIONSHIP BETWEEN SERUM URIC ACID LEVELS AND COMPLEMENT FUNCTIONAL ACTIVITY

Beltyukov P.P.<sup>a</sup>, Tokarev A.Yu.<sup>a</sup>, Smirnova A.S.<sup>a</sup>, Beltyukova M.E.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical-Biological Agency, Leningrad Region, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** Uric acid (UA) is the end product of purine metabolism and a substance that promotes a chronic inflammatory process. One of the mechanisms of inflammation associated with the UA is the ability of its crystals, mainly monosodium urate, to activate NLRP3 inflammasomes, classifying UA and its salt crystals as damage-related molecular patterns (DAMPs). These crystals also activate the complement system, leading to increase in C3a, C4a, and C5a concentrations and excessive consumption of complement system proteins. It has been known for a long time that UA is able to activate complement, but the relationship between hyperuricemia and complement system functional activity, which can be assessed by complement-mediated hemolysis, remains unclear. In this study, we have made an attempt to estimate the UA concentration that does not lead to spontaneous complement system activation. The study assessed the relationships between the parameters of complement functional activity and some blood biochemical data with UA concentration ([UA]) using correlation analysis. The rate ( $V_{lys}$ ) and time of 50% hemolysis ( $T_{50}$ ) were considered as indicators of complement functional activity, and their relationship was demonstrated using exponential functions  $y = a \cdot e^{[x]}$ , which takes the form  $y = [UA] \cdot e^{[C3]}$ . Concentration of C3 is the argument of the function, base of degree is the base of the natural logarithm, and the proportionality coefficient equal to the UA concentration. Correlation analysis showed the inverse dependent between function values and the corresponding values of  $T_{50}$  ( $r = -0.83$ ,  $p < 0.0001$ ) in the range of UA concentration exceeding 370  $\mu\text{mol/L}$ , which is near to the upper limit of the normal level for women and is within the normal range for men. Thus, the approach to assess the effect of UA on complement activation using the analysis of the complement hemolytic activity is effective to demonstrate the pathogenetic function of UA in the development of the inflammatory process without involving inflammasomes through the direct effects on complement activation processes. The relationships demonstrated suggest that the upper limits of the range of “normal” UA concentrations are arbitrary, and their revision is likely advisable.

*Keywords:* uric acid, hyperuricemia, complement system, complement factors, C-reactive protein, IgM



## Введение

К настоящему времени сложилось представление о том, что мочевая кислота (МК) является одним из молекулярных паттернов, связанных с повреждением (DAMP). Доказано, что кристаллы МК способны прямо активировать инфлам-масому NLRP3 [1]. Известно, что кристаллы солей МК способны активировать комплемент и способствуют увеличению уровней С4а, С3а и С5а [5]. Активация комплемента уратами *in vitro* может приводить к снижению содержания белков системы комплемента в крови [4]. Интерес к оценке роли МК в развитии воспаления устойчиво растет в последние десятилетия. Показано наличие связи между содержанием МК в сыворотке крови и уровнями ряда маркеров воспаления (CRP, TNF $\alpha$ , IL-6, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1) [3].

Вместе с тем до сих пор нет ясного представления о концентрационно-функциональных связях между МК, ключевыми белками комплемента и функциональными параметрами комплемент-опосредованного гемолиза. Считаем, что выявление и описание таких связей дает возможность обосновать концентрации МК, которые не стимулируют спонтанную активацию комплемента. Для установления взаимосвязей между концентрацией МК в крови и ее возможным влиянием на систему комплемента определены отдельные биохимические показатели крови и функциональные параметры комплемент-опосредованного гемолиза эритроцитов кролика при активации альтернативного пути (АПК) и при одновременной активации классического пути и АПК.

## Материалы и методы

Исследованы 62 сыворотки крови пациентов терапевтического профиля от 32 мужчин и 30 женщин в возрасте от 21 до 87 лет. Биохимические показатели сыворотки крови определены на анализаторе Sapphire 400 (Япония) с использованием наборов реактивов Randox (Великобритания). Во всех образцах определены: концентрации общего белка, альбумина, мочевой кислоты, С-реактивного белка (CRP), IgM и концентрации факторов С3 и С4.

Параметры функциональной активности комплемента исследовали при кинетической регистрации в планшетах для иммунологических реакций на фотометре Multiscan FC (Thermo Scientific, США) при 37 °С в режиме периодического встряхивания (5 Гц). Измерения экстинкции выполняли при  $\lambda = 620$  нм каждые 20 с.

При оценке АПК в составе смеси объемом 200 мкл присутствовали: 20 мкл сыворотки, буферный раствор (50 мкл, рН 7,3) с хелатирующим агентом ЭГТА и MgCl<sub>2</sub> (в концентрациях 2 мМ и

4,25 мМ соответственно), 80 мкл физиологического раствора (NaCl, 0,9%) и 50 мкл стандартной суспензии эритроцитов кролика в физиологическом растворе, которая обеспечивала начальное значение экстинкции в диапазоне от 0,85 до 0,95. Суспензию готовили из эритроцитов, стабилизированных в реактиве Олсвера в течение двух месяцев и троекратно отмытых физиологическим раствором непосредственно перед получением рабочей смеси. Эритроциты в планшет вносили последними, после смешивания всех остальных компонентов.

Регистрацию гемолиза в условиях одновременной активации классического и альтернативного путей комплемента проводили в таких же условиях, но без ЭГТА, в присутствии CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> в конечных концентрациях 1,275 мМ и 4,25 мМ соответственно. Образцом для анализа служила сыворотка, разбавленная физиологическим раствором в 2 раза. Остальные компоненты смеси были такими же, как и при регистрации активации АПК.

В ходе регистрации кинетики гемолиза измерены и использованы для анализа два параметра: максимальное значение скорости гемолиза ( $V_{lys}$ ), равное наибольшему изменению экстинкции ( $dE_{620}$ ) в интервале между двумя измерениями и время 50%-ного лизиса ( $T_{50}$ ) равное интервалу от стартового измерения до достижения экстинкции равной 50% от начального значения экстинкции. Анализировали различия в параметрах активации комплемента и их связи с концентрациями МК, CRP, IgM, С3 и С4. Оценены корреляционные связи между показателями и частота встречаемости образцов с различными уровнями  $V_{lys}$  и  $T_{50}$  в пределах групп, ранжированных по концентрациям МК.

В качестве граничных значений при разделении образцов по группам на основе измеренных концентраций МК выбраны значения 370 мкМ (6,22 мг/дл) и 270 мкМ (4,54 мг/дл). Основанием для такого выбора служат данные о растворимости МК при изотонических концентрациях NaCl (0,15 М), которые близки выбранному значению 370 мкМ [2]. Концентрации белка в смесях соответствовали 10% от общего белка в сыворотке ( $M \pm SD = 6,01 \pm 0,60$  г/л). Такая концентрация белка не может оказывать существенного влияния на растворимость МК. Кроме того, при 10-кратном разбавлении сыворотки крови конечная концентрация МК в смеси не могла способствовать образованию кристаллов уратов *in situ*. Таким образом, различия  $V_{lys}$  или  $T_{50}$ , связываемые с [МК], должны отражать влияние на систему комплемента кристаллов, или суммы кристаллов и растворенной МК в исследуемых образцах сыворотки крови.

## Результаты и обсуждение

Анализ показателей активности комплемента и биохимических параметров сывороток показал, что среди всех образцов с высокой активностью АПК ( $T_{50} < 600$  с) около 45% содержали мочевую кислоту в концентрациях  $> 370$  мкМ и лишь 12,5% образцов с такой же концентрацией мочевой кислоты продемонстрировали пониженную функциональную активность АПК ( $T_{50} > 600$  с). При оценке связи между  $V_{lys}$  и [МК] в рамках эксперимента в группе с высоким значением  $V_{lys}$  ( $dE_{620} > 0,042$ ) доля образцов с [МК]  $> 370$  мкМ составила 31% (14 из 45), а в образцах с низким значением  $V_{lys}$  ( $dE_{620} < 0,042$ ) доля таких же образцов равна 17,6% (3 из 17). Таким образом, можно говорить о наличии связи между частотой встречаемости образцов с высокими концентрациями МК и высокой функциональной активностью АПК.

В общей совокупности исследованных образцов не выявлено статистически значимой связи между [CRP] и функциональной активностью комплемента и не показано взаимного влияния МК и CRP на параметры активации комплемента. Однако при оценке влияния «фоновых» концентраций IgM на эффекты МК и CRP в отношении АПК оказалось, что при «низких» уровнях IgM ( $< 1$  г/л,  $n = 35$ ) наблюдается умеренная обратная корреляция между  $T_{50}$  и [CRP] ( $r = -0,5329$ ;  $p < 0,0005$ ).

При анализе полной выборки ( $n = 62$ ) не было выявлено статистически значимой корреляции между уровнями [МК],  $V_{lys}$  и  $T_{50}$  как для АПК, так и для суммарной активации комплемента. Анализ связей между [C3], [C4] и параметрами активации комплемента в образцах с уровнями [МК] = 100370 мкМ (I) и [МК]  $> 370$  мкМ (II) по-

казал, что они значительно отличаются. В группе I отсутствует корреляция между [C3] или [C4] в отношении  $V_{lys}$  для АПК, но есть негативная корреляция между [C3] и [C4] в отношении  $T_{50}$ , ( $r = -0,4361$ ,  $p = 0,0025$ ; и  $r = -0,4409$ ,  $p = 0,0022$  соответственно). Для группы II ( $n = 17$ ) показано, что как для [C3], так и [C4] отсутствует корреляция с  $T_{50}$ , но есть ожидаемая позитивная корреляция с  $V_{lys}$ . Для [C3] коэффициент  $r = 0,4638$ ,  $p = 0,0304$ , а для C4  $r = 0,5718$ ,  $p = 0,0082$ . Для этих показателей ожидание высоких уровней значимости и тесности связей маловероятно, поскольку между конечным результатом анализа гемолитической активности комплемента и абсолютными значениями концентраций C3 и C4 линейная зависимость возможна только при крайнем дефиците этих белков в анализируемых образцах. Кроме того, надо понимать, что корреляция между C4 и  $T_{50}$  для АПК отражает в большей степени не вклад C4 в активацию АПК, а наличие связи между [C3] и [C4]. Корреляция между [C3] и [C4] в нашей выборке сывороток была значительной ( $r = 0,8009$ ;  $p < 0,0001$ ). Кроме того, уровни альбумина в образцах также в значительной степени связаны, как с [C3] ( $r = 0,4174$ ;  $p = 0,0007$ ), так и с [C4] ( $r = 0,4586$ ;  $p < 0,0002$ ). Эти связи между C3, C4 и альбумином ожидаемы и обусловлены тем, что синтез этих белков протекает в клетках одного типа, в основном, в гепатоцитах.

В связи с необходимостью учета нелинейного характера связи между концентрацией C3 и показателями гемолиза ( $T_{50}$  или  $V_{lys}$ ) для оценки вклада МК в активацию комплемента выполнили корреляционный анализ с использованием значений двух функций, как характеристик C3 и МК: линейной функции  $y = [МК] * [C3]$ , и показательной функции  $y = [МК] * e^{[C3]}$ .

Из расчета исключили все образцы с [МК]  $< 100$  мкМ – такие уровни свидетельствуют о возможном разбавлении крови, например, при инфузионной терапии. При [МК] = 100-600 мкМ выявлена умеренная обратная корреляция между  $T_{50}$  vs [C3], [МК]\*[C3] и [МК]\* $e^{[C3]}$  ( $r = -0,439$ ,  $-0,4299$  и  $-0,5146$  соответственно). Для величины [МК]\* $e^{[C3]}$  уровень значимости составил  $p = 0,0002$ . Любопытно, что корреляция между  $V_{lys}$  и [МК]\*[C3] тоже оказалась существенной ( $r = 0,4510$ ,  $p = 0,0007$ ). Эти факты сами по себе не являются убедительным доказательством вклада МК в процессы активации АПК, поскольку коэффициенты корреляции невелики.

При оценке связи  $T_{50}$  vs [МК]\* $e^{[C3]}$  в образцах с [МК]  $> 270$  мкМ ( $n = 34$ ) получены значения  $r = -0,5453$  и  $p < 0,0004$ . В выборке для [МК]  $> 370$  мкМ ( $n = 16$ ), связь между  $T_{50}$  и [МК]\* $e^{[C3]}$  оказалась более существенной ( $r = -0,8262$  при

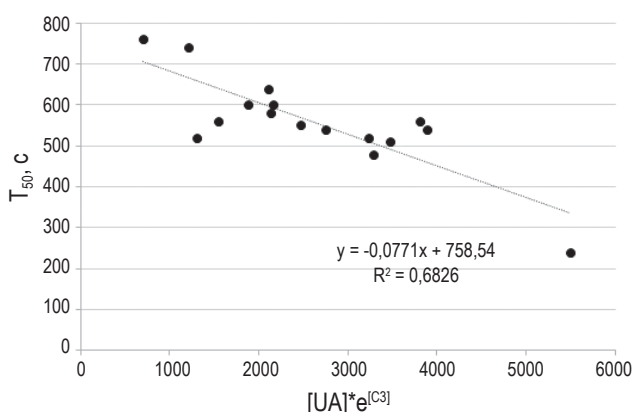


Рисунок 1. Зависимость  $T_{50}$  при активации АПК от величины  $[UA] * e^{[C3]}$

Figure 1. Dependence of  $T_{50}$  on the value of  $[UA] * e^{[C3]}$  upon alternative pathway of complement activation

$p < 0,0001$ ). Несмотря на то, что ведущей переменной, влияющей на  $V_{lys}$  и  $T_{50}$ , является величина  $e^{[C3]}$ , включение в формулу расчета значения [МК] в качестве множителя существенно повышает как коэффициент корреляции, так и уровень значимости анализируемой связи. Зависимость между  $T_{50}$  и величиной [МК]\* $e^{[C3]}$  при активации АПК представлена на рисунке 1.

На основании выявленных закономерностей, можно утверждать, что при [МК] > 370-400 мкМ, конечный метаболит пуринового обмена может вносить значительный вклад в спонтанную активацию системы комплемента. Следует отметить,

что в исследованных нами образцах сывороток крови с признаками гиперурикемии при оценке концентраций С3 и С4 турбидиметрическим методом не было выявлено признаков снижения концентрации этих белков.

## Заключение

Таким образом, наряду со способностью мочевой кислоты активировать инфламмосомы, ее влияние на процессы активации комплемента является самостоятельным фактором, способствующим поддержанию хронического воспалительного процесса.

## Список литературы / References

1. Braga T.T., Forni M.F., Correa-Costa M., Ramos R.N., Barbuto J.A., Branco P., Castoldi A., Hiyane M.I., Davanso M.R., Latz E., Franklin B.S., Kowaltowski A.J., Camara N.O. Soluble uric acid activates the NLRP3 Inflammasome. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, 39884. doi: 10.1038/srep39884.
2. Kippen I., Klinenberg J.R., Weinberger A., Wilcox W.R. Factors affecting urate solubility *in vitro*. *Ann. Rheum. Dis.*, 1974, Vol. 33, no. 4, pp. 313-317.
3. Lobo J.C., Lucas A.C., da Nóbrega A., Carraro-Eduardo J.C., Mafra D. Uric acid levels correlates with inflammatory markers and adhesion molecules in hemodialysis patients. *Kidney Res. Clin. Pract.*, 2012, Vol. 31, no. 2, A53. doi: 10.1016/j.krcp.2012.04.472.
4. Russell I.J., Papaioannou C., McDuffie F.C., MacIntyre S., Kushner I. Effect of IgG and C-reactive protein on complement depletion by monosodium urate crystals. *J. Rheumatol.*, 1983, Vol. 10, no. 3, pp. 425-433.
5. Wessig A.K., Hoffmeister L., Klingberg A., Alberts A., Pich A., Brand K., Witte T., Neumann K. Natural antibodies and CRP drive anaphylatoxin production by urate crystals. *Sci. Rep.*, 2022, Vol. 12, no. 1, 4483. doi: 10.1038/s41598-022-08311-z.

---

### Авторы:

**Бельтюков П.П.** — к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, Ленинградская обл., Россия

**Токарев А.Ю.** — научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, Ленинградская обл., Россия

### Authors:

**Belyukov P.P.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Toxicology and Experimental Therapy, Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical-Biological Agency, Leningrad Region, Russian Federation

**Tokarev A.Yu.**, Research Associate, Laboratory of Molecular Toxicology and Experimental Therapy, Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical-Biological Agency, Leningrad Region, Russian Federation

**Смирнова А.С.** — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, Ленинградская обл., Россия

**Smirnova A.S.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Toxicology and Experimental Therapy, Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical-Biological Agency, Leningrad Region, Russian Federation

**Бельтюкова М.Е.** — врач клинико-диагностической лаборатории лечебно-реабилитационного центра ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Beltyukova M.E.**, Clinical Laboratory Diagnostics Specialist, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

---

Поступила 31.03.2024

Отправлена на доработку 01.04.2024

Принята к печати 03.04.2024

Received 31.03.2024

Revision received 01.04.2024

Accepted 03.04.2024

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ПРИЗНАКОВ ОСТЕОПЕНИИ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Осиков М.В.<sup>1, 2</sup>, Коробкин Е.А.<sup>1, 2</sup>, Федосов А.А.<sup>3</sup>, Димов Г.П.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

**Резюме.** Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) является самым распространенным лейкозом среди взрослых в западных странах, характеризуется развитием ряда осложнений, в том числе остеопороза, что является предпосылкой для изучения его предикторов. Цель работы – исследовать взаимосвязь между показателями иммунофенотипирования лимфоцитов крови и показателями остеоденситометрии при ХЛЛ. Исследование проведено на 48 пациентах мужского пола с ХЛЛ в возрасте 50–70 лет со средней продолжительностью болезни 12 месяцев и 14 условно здоровых мужчинах соответствующего возраста (группа 1). В крови методом проточной цитофлуориметрии дифференцировали лимфоциты CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. Для оценки вероятности перелома использовали международный опросник FRAX. При остеоденситометрии оценивали минеральную плотность костной массы (МПК), T-показатель (стандартное отклонение, SD), Z-показатель (SD) в поясничном отделе позвоночника (ПОП), шейке проксимального отдела бедренной кости (ШПОБК), проксимальном отделе бедренной кости (ПОБК). Больные с ХЛЛ входили в группу 2 (n = 34) с МПК в пределах нормы (T- и Z-показатель > – 1,0 SD) или в группу 3 (n = 14) с признаками остеопении (ОП) (T- и Z-показатель от – 1,0 SD до – 2,5 SD). У больных с ХЛЛ в группе 3 по сравнению с больными ХЛЛ в группе 2 наблюдается значимое увеличение количества в крови лимфоцитов, экспрессирующих маркеры CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. У больных с ХЛЛ в группе 3 признаки ОП в ШПОБК нарастают по мере увеличения в крови лимфоцитов с фенотипом CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, признаки ОП в ПОБК нарастают по мере увеличения в крови лимфоцитов с фенотипом CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>; наиболее сильные связи обнаружены между количеством лимфоцитов в крови с маркерами CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>

### Адрес для переписки:

Осиков Михаил Владимирович  
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.  
Тел.: 8 (951) 240-20-20.  
E-mail: prof.osikov@yandex.ru

### Address for correspondence:

Mikhail V. Osikov  
South Ural State Medical University  
64 Vorovsky St  
Chelyabinsk  
454092 Russian Federation  
Phone: +7 (951) 240-20-20.  
E-mail: prof.osikov@yandex.ru

### Образец цитирования:

М.В. Осиков, Е.А. Коробкин, А.А. Федосов, Г.П. Димов  
«Взаимосвязь фенотипа лимфоцитов периферической  
крови и признаков остеопении у больных с хроническим  
лимфолейкозом» // Российский иммунологический  
журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 375–382.  
doi: 10.46235/1028-7221-16583-ROT

© Осиков М.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

M.V. Osikov, E.A. Korobkin, A.A. Fedosov, G.P. Dimov  
“Relationship of the phenotype of peripheral blood lymphocytes  
and signs of osteopenia in patients with chronic lymphocytic  
leukemia”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 375–382.  
doi: 10.46235/1028-7221-16583-ROT

© Osikov M.V. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16583-ROT

и Т-показателем, Z-показателем, МПК в ШПОБК. Полученные данные являются предпосылкой для дальнейшего изучения взаимодействия клона опухолевых лимфоцитов при ХЛЛ и клеток, участвующих в ремоделировании костной ткани для выявления механизма развития ОП, остеопороза и риска переломов костей, а изменение количественного состава фенотипа лимфоцитов в крови могут рассматриваться как потенциальные лабораторные предикторы снижения МПК.

*Ключевые слова:* хронический лимфолейкоз, остеоденситометрия, иммунофенотипирование лимфоцитов, минеральная плотность костей, остеопения, лимфома

## RELATIONSHIP OF THE PHENOTYPE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AND SIGNS OF OSTEOPENIA IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Osikov M.V.<sup>a, b</sup>, Korobkin E.A.<sup>a, b</sup>, Fedosov A.A.<sup>c</sup>, Dimov G.P.<sup>a</sup>

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

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

<sup>c</sup> Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia among adults in Western countries, characterized by the development of a number of complications, including osteoporosis, which is a prerequisite for studying its predictors. The purpose of the work is to investigate the relationship between immunophenotyping indicators of blood lymphocytes and osteodensitometry indicators in CLL. The study was conducted on 48 male patients with CLL aged 50-70 years with an average disease duration of 12 months and 14 apparently healthy men of the corresponding age (group 1). In the blood, CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, and CD200<sup>+</sup> lymphocytes were differentiated in the blood using flow cytometry. The international FRAX questionnaire was used to assess the probability of fracture. Osteodensitometry assessed bone mineral density (BMD), T-score (standard deviation, SD), Z-score (SD) in the lumbar spine (LS), proximal femoral neck (FNA), proximal femoral bone (PFB). Patients with CLL were included in group 2 (n = 34) with BMD within normal limits (T- and Z-score > - 1.0 SD) or group 3 (n = 14) with signs of osteopenia (OP) (T- and Z-score from - 1.0 SD up to - 2.5 SD). In patients with CLL in group 3, compared with patients with CLL in group 2, there is a significant increase in the number of lymphocytes in the blood expressing markers CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, and CD200<sup>+</sup>. In patients with CLL in group 3, signs of AP in the SPBC increase with the increase in lymphocytes with the CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> phenotype in the blood. Signs of AP in the PBC increase with the increase in lymphocytes with the CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup> phenotype in the blood. The strongest connections were found between the number of lymphocytes in the blood with the markers CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup> and the T-score, Z-score, and BMD in the FNA. The data obtained are a prerequisite for further study of the interaction between the clone of tumor lymphocytes in CLL and cells involved in bone tissue remodeling to identify the mechanism of development of OP, osteoporosis and the risk of bone fractures, and changes in the quantitative composition of the lymphocyte phenotype in the blood can be considered as potential laboratory predictors of a decrease in BMD.

*Keywords:* chronic lymphocytic leukemia, osteodensitometry, immunophenotyping of lymphocytes, bone mineral density, osteopenia, lymphoma

### Введение

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) — это злокачественная опухоль, возникающая из CD5<sup>+</sup> В-лимфоцитов, экспрессирующих низкие уровни одного типа легкой цепи

поверхностного мембранного иммуноглобулина, со значительным лимфоцитозом ( $\geq 5 \times 10^9$ /л моноклональных В-лимфоцитов). В России заболеваемость ХЛЛ в последние 5 лет составляет около 2,5 на 100 тыс., медиана возраста

на момент установления диагноза — 68 лет [2]. В Челябинской области заболеваемость ХЛЛ в 2020 г. составила 3,01 на 100 тыс., в 2021 г. — 3,03. Клинические последствия клонального роста CD5<sup>+</sup>В-лимфоцитов очень разнообразны: некоторые пациенты умирают в течение 2–3 лет после постановки диагноза в связи с тяжестью течения самого ХЛЛ, осложнениями, а большинство живут десятилетиями от момента постановки диагноза, это заболевание стареющих взрослых, что делает его самым распространенным лейкозом среди взрослых в западных странах. ХЛЛ характеризуется развитием ряда осложнений и коморбидностью, к числу основных относят инфекционные, сердечно-сосудистые заболевания, нарушение функции щитовидной железы, язвенную болезнь желудка и/или двенадцатиперстной кишки и остеодеструктивный синдром, в том числе остеопороз [13]. Потеря костной массы выявляется у 49% пациентов с ХЛЛ, время от постановки диагноза ХЛЛ до выявления составляет в среднем 3,5 года. Риск возникновения остеопороза у пациентов ХЛЛ составляет 67% у всех возрастных групп, остеопороз составляет 14,7%, а остеопения — 10,2% [6, 12].

Исследования иммунологических аспектов ХЛЛ показали, что взаимодействия между стромальными и лейкоэмическими клетками способствуют выживанию и экспансии неопластического клона и одновременно влияют на функции клеток микроокружения, что может иметь значение в патогенезе снижения минеральной плотности костной массы (МПК) [14].

**Цель работы** — исследовать взаимосвязь между показателями иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови и показателями остеоденситометрии при ХЛЛ.

## Материалы и методы

Исследование проведено на базе ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России и ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница». Под наблюдением находились 48 пациентов мужского пола с ХЛЛ в возрасте 50–70 лет, в том числе по классификации Binet [3]: 14 пациентов (29%) со стадией А, 24 пациента (50%) со стадией В, 10 пациентов (21%) со стадией С. Средняя продолжительность болезни составила 10,5 месяцев. Диагноз верифицировали методом иммунофенотипирования опухолевого клона лимфоцитов. На проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (BD Biosciences, США) с помощью тест-системы VECTON Dickinson and

Company (США) в периферической крови дифференцировали опухолевые лимфоциты по наличию экспрессии CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>. Для оценки вероятности перелома использован международный опросник FRAX (Fracture Risk Assessment Tool) [1]. Остеоденситометрия проведена на денситометре DEXXUM 3 (OsteoSys Co, Южная Корея) с оценкой МПК (г/см<sup>2</sup>), Т-показателя (стандартное отклонение, SD), Z-показателя (SD) в поясничном отделе позвоночника (ПОП), шейке проксимального отдела бедренной кости (ШПОБК), проксимальном отделе бедренной кости (ПОБК). В зависимости от показателей остеоденситометрии пациентов разделили на две группы: группу 2 (n = 34), которые не имели отклонений МПК (Т- и Z-показатель > – 1,0 SD) и группу 3 (n = 14) с признаками ОП (Т- и Z-показатель от – 1,0 SD до – 2,5 SD). Возраст пациентов в группе 2 (61,0 (59,0–65,0) года) и в группе 3 (62,0 (57,0–66,0) года) был сопоставим (p > 0,05). Группа 1 (n = 14) — условно здоровые мужчины, сопоставимые по возрасту с группами 2 и 3, медиана возраста составила 59,0 (54,7–61,5) года. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного пакета IBM SPSS Statistics v. 23 (SPSS: An IBM Company, США). Характеристика выборок представлена в формате Me (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>), где Me — медиана, Q<sub>0,25</sub> и Q<sub>0,75</sub> — значения нижнего и верхнего квартилей соответственно. Для оценки распределения непрерывных переменных использован тест Шапиро–Уилка. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Для выявления связи между показателями использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Отличия считали статистически значимыми при p ≤ 0,05.

## Результаты и обсуждение

Оценка костной ткани методом остеоденситометрии у больных ХЛЛ позволила сформировать 2 группы и выявить признаки остеопении у части больных на основании оценки Т-показателя как минимум в одной из исследуемых областей костной ткани (табл. 1).

Как известно, Т-показатель представляет стандартизированное отклонение МПК по сравнению со средним значением для того возраста, в котором МПК в данном участке скелета достигает максимума, т. е. сравнение с нормальной пиковой костной массой. Z-показатель представляет среднее значение МПК для данного возраст-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ОСТЕОДЕНСИТОМЕТРИИ У БОЛЬНЫХ С ХЛЛ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

TABLE 1. OSTEODENSITOMETRY INDICES IN PATIENTS WITH CLL, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Показатели Indicators	Группа 1 Group 1 (n = 14)	Группа 2 Group 2 (n = 34)	Группа 3 Group 3 (n = 14)
<b>Т-кр. ПОП, SD</b> T-sc. LS, SD	0,70 (-1,30-1,20)	1,00 (-0,10-2,60)	-0,30 (-1,30-1,00) <sup>#</sup>
<b>Z-кр. ПОП, SD</b> Z-sc. LS, SD	0,90 (-1,00-1,70)	1,30 (0,40-2,90)	0,25 (-1,10-1,40) <sup>#</sup>
<b>МПК ПОП, г/см<sup>2</sup></b> BMD LS, g/cm <sup>2</sup>	1,304 (1,068-1,368)	1,373 (1,214-1,518)	1,188 (1,064-1,346) <sup>#</sup>
<b>Т-кр. ШПОБК, SD</b> T-sc. PFN, SD	-0,15 (-1,40-0,20)	-0,20 (-0,60-0,10)	-1,65 (-2,90 – -1,20) <sup>* #</sup>
<b>Z-кр. ШПОБК, SD</b> Z-sc. PFN, SD	0,50 (-0,60-1,00)	0,70 (0,40-1,00)	-0,80 (-1,00 – -0,40) <sup>* #</sup>
<b>МПК ШПОБК, г/см<sup>2</sup></b> BMD PFN, g/cm <sup>2</sup>	1,051 (0,885-1,101)	1,045 (0,997-1,081)	0,888 (0,806-0,930) <sup>* #</sup>
<b>Т-кр. ПОБК, SD</b> T-sc. PFB, SD	-0,10 (-1,60-0,20)	0 (-0,40-0,55)	-1,60 (-2,00 – -0,80) <sup>* #</sup>
<b>Z-кр. ПОБК, SD</b> Z-sc. PFB, SD	0,40 (-1,00 – 0,80)	0,70 (0,30-1,30)	-0,65 (-1,30 – -0,10) <sup>* #</sup>
<b>МПК ПОБК, г/см<sup>2</sup></b> BMD PFB, g/cm <sup>2</sup>	1,076 (0,885-1,120)	1,093 (1,056-1,143)	0,980 (0,833-1,018) <sup>#</sup>

Примечание. \* – статистически значимые (p < 0,05) различия с группой 1; # – с группой 2.

Note. \*, statistically significant (p < 0.05) differences with group 1; #, with group 2.

та и пола, т. е. данные больного сравниваются с возрастной нормой. Согласно рекомендациям ВОЗ, у мужчин старше 50 лет для выявления снижения МПК должен использоваться преимущественно Т-показатель [1]. Отметим, что в группе 2 у больных ХЛЛ отсутствовали значимые изменения показателей остеоденситометрии по сравнению с контрольной группой здоровых лиц в ПОП, ШПОБК, ПОБК. В группе 3 наблюдается статистически значимое снижение МПК, Т- и Z-показателей в ПОП, ШПОБК, ПОБК. Кроме этого, в группе 3 по сравнению с контрольной группой здоровых лиц снижается МПК, Т- и Z-показатели в ПОП, ШПОБК, а также Т- и Z-показатели в ПОБК. Нами не обнаружено статистически значимых изменений (p > 0,05) показателя FRAX (%) в группах 2 (28,0 (26,5-30,5)) и 3 (28,7 (23,0-30,1)) по сравнению с группой 1 (28,5 (25,6-30,0)), а также между группой 2 и группой 3, что позволяет сделать вывод о том, что признаки остеопении в обеих группах не влияют на вероятность возникновения переломов костей. При исследовании популяционного состава лимфоцитов периферической крови нами обнаружены статистически значимые отличия всех показателей между группами 2 и 3 (табл. 2).

Так, абсолютное количество CD5<sup>+</sup> увеличилось по медиане в 3,6 раза, CD19<sup>+</sup> – в 3,3 раза, CD20<sup>+</sup> – в 4,2 раза, CD22<sup>+</sup> – в 3,6 раза, CD23<sup>+</sup> – в 3,4 раза, CD43<sup>+</sup> – в 3,5 раза, CD200<sup>+</sup> – в 4,2 раза. Наибольший прирост отмечен в отношении CD20<sup>+</sup> и CD200<sup>+</sup> клеток. Кроме того, необходимо отметить, что исследуемые количественные показатели популяционного состава лимфоцитов периферической крови в группе 2 (больные ХЛЛ без признаков остеопении) также возрастали по сравнению с референсными значениями для данной тест-системы и калибровки прибора. На следующем этапе в группе больных с ХЛЛ и признаками остеопении проведен корреляционный анализ между показателями иммунофенотипирования лимфоцитов и показателями остеоденситометрии двух областей скелета, в которых обнаружены признаки остеопении на основании оценки Т-показателя: ШПОБК, ПОБК. Результаты представлены в таблице 3.

Статистически значимые связи отсутствовали между количеством всех исследуемых популяций лимфоцитов и МПК в ПОБК, между CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup> и Z-показателем в ПОБК, между CD22<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> и Т-показателем в ПОБК, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup> и МПК в ШПОБК. Высокой силы обратная связь по шкале Чеддока обнаружена между



ТАБЛИЦА 2. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ХЛЛ, Ме ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

TABLE 2. POPULATION COMPOSITION OF LYMPHOCYTES IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH CLL, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Показатели, $\times 10^9/\text{л}$ Indicators, $\times 10^9/\text{L}$	Группа 2 Group 2 (n = 34)	Группа 3 Group 3 (n = 14)
CD5 <sup>+</sup>	34,620 (16,720-79,100)	122,100 (57,664-151,670)*
CD19 <sup>+</sup>	34,596 (14,009-74,195)	114,529 (45,241-139,840)*
CD20 <sup>+</sup>	23,820 (15,912-53,940)	100,557 (52,926-119,232)*
CD22 <sup>+</sup>	20,313 (12,974-39,391)	73,365 (66,734-94,357)*
CD23 <sup>+</sup>	27,791 (16,653-65,811)	91,331 (55,815-144,238)*
CD43 <sup>+</sup>	35,371 (17,534-83,891)	120,879 (55,064-150,911)*
CD200 <sup>+</sup>	31,885 (19,166-89,315)	133,317 (89,641-150,760)*

Примечание. \* – статистически значимые ( $p < 0,05$ ) различия с группой 2.

Note. \*, statistically significant ( $p < 0.05$ ) differences with group 2.

CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> и T-показателем, Z-показателем, МПК в ШПОБК; CD20<sup>+</sup> и Z-показателем в ШПОБК; CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup> и T-показателем, Z-показателем в ШПОБК. Обратная связь средней силы зафиксирована между CD20<sup>+</sup> и T-показателем, МПК в ШПОБК; CD22<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> и T-показателем, Z-показателем, МПК в

ШПОБК; CD43<sup>+</sup> и Z-показателем в ПОБК. Слабой силы обратная связь отмечена между CD5<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup> и T-показателем, Z-показателем в ПОБК; CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup> и T-показателем в ПОБК; CD200<sup>+</sup> и Z-показателем в ПОБК. Принимая во внимание факт, что при оценке остеопении у данной категории больных с ХЛЛ необходимо ори-

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ОСТЕОПЕНИИ И ПОПУЛЯЦИОННЫМ СОСТАВОМ ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ХЛЛ

TABLE 3. CORRELATION BETWEEN INDICATORS OF OSTEOPENIA AND THE POPULATION COMPOSITION OF LYMPHOCYTES IN THE BLOOD IN PATIENTS WITH CLL

Показатели Indicators	T-пок. ШПОБК T-sc. PFN	Z-пок. ШПОБК Z-sc. PFN	МПК ШПОБК BMD PFN	T-пок. ПОБК T-sc. PFB	Z-пок. ПОБК Z-sc. PFB	МПК ПОБК BMD PFB
CD5 <sup>+</sup>	<b>R = -0,75</b>	<b>R = -0,77</b>	<b>R = -0,75</b>	<b>R = -0,37</b>	<b>R = -0,49</b>	R = -0,14
CD19 <sup>+</sup>	<b>R = -0,78</b>	<b>R = -0,82</b>	<b>R = -0,78</b>	<b>R = -0,37</b>	R = -0,28	R = -0,03
CD20 <sup>+</sup>	<b>R = -0,67</b>	<b>R = -0,71</b>	<b>R = -0,67</b>	<b>R = -0,37</b>	R = -0,05	R = -0,25
CD22 <sup>+</sup>	<b>R = -0,60</b>	<b>R = -0,60</b>	<b>R = -0,44</b>	R = -0,30	R = -0,21	R = -0,31
CD23 <sup>+</sup>	<b>R = -0,75</b>	<b>R = -0,77</b>	R = -0,30	<b>R = -0,37</b>	<b>R = -0,49</b>	R = -0,14
CD43 <sup>+</sup>	<b>R = -0,75</b>	<b>R = -0,77</b>	<b>R = -0,16</b>	<b>R = -0,45</b>	<b>R = -0,58</b>	R = -0,14
CD200 <sup>+</sup>	<b>R = -0,60</b>	<b>R = -0,60</b>	<b>R = -0,60</b>	R = -0,21	<b>R = -0,49</b>	R = -0,25

Примечание. R – коэффициент корреляции Спирмена, полужирным шрифтом отмечены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) связи.

Note. R, Spearman correlation coefficient; statistically significant ( $p < 0.05$ ) relationships are indicated in bold.

ентироваться преимущественно на Т-показатель, можно пренебречь связью между CD200<sup>+</sup> и Z-показателем в ПОБК. Как видно, наибольшее количество и наиболее сильные связи выявлены между количеством в крови CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup> и Т-показателем, Z-показателем, МПК в ШПОБК.

Обнаруженные нами взаимосвязи между популяционным спектром лимфоцитов и показателями остеоденситометрии у больных ХЛЛ с признаками остеопении могут быть связаны с изменением функциональной активности опухолевых клеток, что отражается экспрессией соответствующих рецепторов, CD-маркеров, а также их достаточно сложным взаимодействием с клетками микроокружения, в том числе клетками костной ткани. Так, экспрессия CD19<sup>+</sup> высококонсервативна в большинстве В-клеточных опухолей и ассоциирована с выработкой аутоантител, текущей вирусной или недавней бактериальной инфекцией, лимфаденопатией. По данным ряда исследований, у больных остеопорозом зафиксировано увеличение экспрессии CD19<sup>+</sup> на лимфоцитах крови, селезенки и костного мозга [7]. Наряду с традиционными маркерами В-лимфоцитов (CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>) для диагностики ХЛЛ в пограничных случаях Международной рабочей группой по ХЛЛ и европейским консенсусом рекомендуется использовать CD43<sup>+</sup>, в частности для дифференциации между ХЛЛ и мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой [11]. CD43<sup>+</sup> – крупный сиалогликопротеин, экспрессируемый на поверхности большинства гемопоэтических клеток, участвует в реализации межклеточных контактов, передаче сигналов, адгезии и взаимодействии с микробами и паразитами в ходе воспалительного процесса, в регуляции синтеза активных форм кислорода, IFN и TNF $\alpha$  [5]. Провоспалительные цитокины IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11, TNF $\alpha$ , простагландин E2, высвобождаемые клетками ХЛЛ, увеличивают количество преостеокластов и резорбцию костей [9]. IL-1 $\beta$  индуцирует остеокластогенез, повышая экспрессию RANKL остеобластами, уровень склеростина, опосредует остеокластогенез, вызванный TNF $\alpha$  [10]. TNF $\alpha$  ингибирует экспрессию фактора дифференцировки остеобластов, связанного с Runt-доменом (RUNX2), дифференцировку остеобластов через ингибирование синтеза компонентов внеклеточного матрикса или снижение экспрессии остеокальцина и щелочной фосфатазы, увеличение уровня мРНК остеопонтина [9]. TNF $\alpha$ , высвобождаемый лейкоэмическими клетками, стимулирует остеокластогенез и дифференцировку остеокла-

стов независимо от системы RANKL/RANK, последовательно активируя транскрипционные факторы NF- $\kappa$ B, c-Fos и NFATc1 [15]. Другие цитокины из клеток ХЛЛ, такие как IL-6 и IL-11, могут способствовать дифференцировке моноцитов и участвовать в избыточной стимуляции остеокластогенеза в отсутствие предварительной стимуляции RANKL.

В то же время дифференцированные остеокласты или их предшественники защищают лейкоэмические В-клетки от апоптоза и стимулируют их пролиферацию, тем самым активно взаимодействуя между собой. Установлена прямая корреляция между уровнем экспрессии RANKL на клетках ХЛЛ и степенью разрушения костной ткани у пациентов с ХЛЛ и в эксперименте на линии мышей с гиперэкспрессией RANK в лимфоцитах, полученных от людей с ХЛЛ [4]. Клетки ХЛЛ могут экспрессировать RANK, который в свою очередь повышает экспрессию RANKL на остеобластах, что приводит к дифференцировке многоядерных остеокластов из миелоидных предшественников, как следствие зрелые остеокласты резорбируют костный матрикс, позволяя опухолевым клеткам расти и мигрировать в тканях [8]. Взаимодействие RANKL-RANK активирует синтез остеокластами факторов роста, таких как инсулиноподобный фактор роста 1, которые стимулируют синтез пептидов паратиреоидного гормона, способствуют росту опухоли, а само взаимодействие между опухолевыми клетками и клетками костной ткани приводит к формированию порочного круга разрушения костей и роста опухоли.

## Выводы

1. У больных с ХЛЛ при наличии признаков остеопении по показателям остеоденситометрии в ПОП, ШПОБК, ПОБК по сравнению с больными ХЛЛ без признаков остеопении наблюдается увеличение количества в крови лимфоцитов с фенотипом CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>.

2. У больных с ХЛЛ признаки остеопении в ШПОБК нарастают по мере увеличения в крови CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, признаки остеопении в ПОБК нарастают по мере увеличения в крови CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>; наиболее сильные связи обнаружены между количеством в крови CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup> и Т-показателем, Z-показателем, МПК в ШПОБК.

## Список литературы / References

1. Белая Ж.Е., Белова К.Ю., Бирюкова Е.В., Дедов И.И., Дзеранова Л.К., Драпкина О.М., Древал А.В., Дубовицкая Т.А., Дудинская Е.Н., Ершова О.Б., Загородний Н.В., Илюхина О.Б., Канис Дж.А., Крюкова И.В., Лесняк О.М., Мамедова Е.О., Марченкова Л.А., Мельниченко Г.А., Никанкина Л.В., Никитинская О.А., Петряйкин А.В., Пигарова Е.А., Родионова С.С., Рожинская Л.Я., Скрипникова И.А., Тарбаева Н.В., Ткачева О.Н., Торопцова Н.В., Фарба Л.Я., Цориев Т.Т., Чернова Т.О., Юренева С.В., Якушевская О.В. Федеральные клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике остеопороза // Остеопороз и остеопатии, 2021. Т. 24, № 2. С. 4-47. [Belaya Zh.E., Belova K.Yu., Biryukova E.V., Dedov I.I., Dzeranova L.K., Drapkina O.M., Dreval A.V., Dubovitskaya T.A., Dudinskaya E.N., Ershova O.B., Zagorodniy N.V., Ilyukhina O.B., Kanis J.A., Kryukova I.V., Lesnyak O.M., Mamedova E.O., Marchenkova L.A., Melnichenko G.A., Nikankina L.V., Nikitinskaya O.A., Petryaykin A.V., Pigarova E.A., Rodionova S.S., Rozhinskaya L.Ya., Skripnikova I.A., Tarbaeva N.V., Tkacheva O.N., Toroptsova N.V., Farba L.Ya., Tsoriev T.T., Chernova T.O., Yureneva S.V., Yakushevskaya O.V. Federal clinical guidelines for diagnosis, treatment and prevention of osteoporosis. *Osteoporoz i osteopatii = Osteoporosis and Bone Diseases*, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 4-47. (In Russ.)]
2. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с. [Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Ed. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Shahzadova A.O.] Moscow: P. HerzenMoscow Research Oncology Institute, National Medical Research Radiological Centre of the Ministry Of Health of the Russian Federation, 2021. 252 p.
3. Никитин Е.А., Бялик Т.Е., Зарицкий А.Ю., Исебер Л., Капланов К.Д., Лопаткина Т.Н., Луговская С.А., Мухортова О.В., Османов Е.А., Поддубная И.В., Самойлова О.С., Стадник Е.А., Фалалеева Н.А., Байков В.В., Ковригина А.М., Невольских А.А., Иванов С.А., Хайлова Ж.В., Геворкян Т.Г. Хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов. Клинические рекомендации // Современная онкология, 2020. № 22 (3). С. 24-44. [Nikitin E.A., Bialik T.E., Zaritsky A.Y., Iseber L., Kaplanov K.D., Lopatkina T.N., Lugovskaya S.A., Mukhortova O.V., Osmanov E.A., Poddubnaya I.V., Samoilova O.S., Stadnik E.A., Falaleeva N.A., Baykov V.V., Kovrigina A.M., Nevolskikh A.A., Ivanov S.A., Khailova Zh.V., Gevorkyan T.G. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocyte lymphoma. Clinical recommendations. *Sovremennaya onkologiya = Modern Oncology*, 2020, no. 22 (3), pp. 24-44. (In Russ.)]
4. Alankus B., Ecker V., Vahl N., Braun M., Weichert W., Macher-Göppinger S., Gehring T., Neumayer T., Zenz T., Buchner M., Ruland J. Pathological RANK signaling in B cells drives autoimmunity and chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.*, 2021, Vol. 218, no. 2, e20200517. doi: 10.1084/jem.20200517.
5. Alisson-Silva F., Mantuano N.R., Lopes A.L., Vasconcelos-Dos-Santos A., Vale A.M., Costa M.M., Cannon J.L., Oliveira A.C., Todeschini A.R. CD43 sialoglycoprotein modulates cardiac inflammation and murine susceptibility to Trypanosoma cruzi infection. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, 8628. doi: 10.1038/s41598-019-45138-7.
6. Brander D.M., Oeffinger K.C., Greiner M.A., Dinan M.A. Prevalence, screening, treatment, and complications of osteoporosis and osteopenia in Medicare patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *J. Clin. Oncol.*, 2020, Vol. 38, no. 15 suppl., e24050. doi: 10.1200/JCO.2020.38.15\_suppl.e24050.
7. Čamernik K., Mihelič A., Mihalič R., Haring G., Herman S., Marolt Presen D., Janež A., Trebše R., Marc J., Zupan J. Comprehensive analysis of skeletal muscle- and bone-derived mesenchymal stem/stromal cells in patients with osteoarthritis and femoral neck fracture. *Stem Cell Res. Ther.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 146. doi: 10.1186/s13287-020-01657-z.
8. El-Gazzar A., Högl W. Mechanisms of bone fragility: from osteogenesis imperfecta to secondary osteoporosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 2, 625. doi: 10.3390/ijms22020625.
9. Giannoni P., Marini C., Cutrona G., Todoerti K., Neri A., Ibatici A., Sambuceti G., Pigozzi S., Mora M., Ferrarini M., Fais F., de Totero D. A high percentage of CD16<sup>+</sup> monocytes correlates with the extent of bone erosion in chronic lymphocytic leukemia patients: the impact of leukemic b cells in monocyte differentiation and osteoclast maturation. *Cancers (Basel)*, 2022, Vol. 14, no. 23, 5979. doi: 10.3390/cancers14235979.

10. Jiang Z., Jin L., Jiang C., Yan Z., Cao Y. IL-1 $\beta$  contributes to the secretion of sclerostin by osteocytes and targeting sclerostin promotes spinal fusion at early stages. *J. Orthop. Surg. Res.*, 2023, Vol. 18, no. 1, 162. doi: 10.1186/s13018-023-03657-0.
11. Li Y., Tong X., Huang L., Li L., Wang C., He C., Liu S., Wang Z., Xiao M., Mao X., Zhang D. A new score including CD43 and CD180: Increased diagnostic value for atypical chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Med.*, 2021, Vol. 10, no. 13, pp. 4387-4396.
12. Petty L., Stephens D., Sharma A. ODP090 fragility fractures and osteoporosis screening in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J. Endocr. Soc.*, 2022, Vol. 6, Iss. suppl. 1, pp. A162-A163.
13. Rotbain E.C., Gordon M.J., Vainer N., Frederiksen H., Hjalgrim H., Danilov A.V., Niemann C.U. The CLL comorbidity index in a population-based cohort: a tool for clinical care and research. *Blood Adv.*, 2022, Vol. 6, no. 8, pp. 2701-2706.
14. Valderrábano R.J., Wu J.Y. Bone and blood interactions in human health and disease. *Bone*, 2019, Vol. 119, pp. 65-70.
15. Yao Z., Getting S.J., Locke I.C. Regulation of TNF-induced osteoclast differentiation. *Cells*, 2021, Vol. 11, no. 1, 132. doi: 10.3390/cells11010132.

---

**Авторы:**

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

**Коробкин Е.А.** — ассистент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач-гематолог ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

**Федосов А.А.** — к.м.н., доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

**Димов Г.П.** — к.м.н., научный сотрудник, заведующий отделением забора, заготовки и хранения гемопоэтических клеток и костного мозга ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

**Authors:**

**Osikov M.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Pathophysiology Department, South Ural State Medical University; Head, Scientific Department, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

**Korobkin E.A.**, Assistant Professor, Pathophysiology Department, South Ural State Medical University; Hematologist, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

**Fedosov A.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

**Dimov G.P.**, PhD (Medicine), Research Associate, Head, Department of Collection, Procurement and Storage of Hematopoietic Cells and Bone Marrow, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

## ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ФАКТОРА РОСТА ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ НЕМЕТАСТАТИЧЕСКОМ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Богомолова И.А.<sup>1</sup>, Долгова Д.Р.<sup>2</sup>, Антонеева И.И.<sup>2,3</sup>, Абакумова Т.В.<sup>2</sup>, Генинг Т.П.<sup>2</sup>, Удалов Ю.Д.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр медицинской радиологии и онкологии Федерального медико-биологического агентства России», г. Дмитровград, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

<sup>3</sup> ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск, Россия

**Резюме.** Фактор роста гепатоцитов (HGF) – продуцируется мезенхимальными клетками и является лигандом к тирозинкиназному рецептору с-MET, действует как цитокин на клетки эпителиального происхождения. В опухолевых клетках стимулирует митогенез и ангиогенез. HGF обнаружен во многих органах, включая молочные железы, легкие, почки и печень. Опухолевые клетки некоторых солидных опухолей, в частности клетки аденокарциномы поджелудочной железы, в отличие от стромальных звездчатых клеток железы, не секретируют HGF. Целью исследования была оценка прогностической значимости экспрессии HGF в опухолевой ткани при колоректальном раке. В ретроспективное исследование были включены 50 пациентов с колоректальным раком II-III стадии. Всем пациентам проведено радиакальное оперативное лечение, с последующей адъювантной химиотерапией по схеме FOLFOX/XELOX. В образцах первичной опухоли, полученных интраоперационно, методом количественной ПЦР оценивали уровень экспрессии HGF. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием ПО STATISTICA 13.0 (StatSoft Inc., США), BioStat v.7.1., Jamovi 1.6.8. Исследование направлено на изучение нового маркера, носит поисковый характер. Сравнение признаков в случае ненормального распределения проводилось с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Для анализа выживаемости без прогрессирования использовались критерии линейной регрессии Кокса и Каплана–Майера. При обсуждении результатов были использованы полученные нами ранее данные по уровню экспрессии TGF- $\beta$ , CXCL8 в опухолевой ткани пациентов с колоректальным раком. В результате проведенных исследований установлено, что в 60% исследованных образцов опухоли изученный маркер не экспрессировался, но при этом

### Адрес для переписки:

Богомолова Ирина Александровна  
ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр  
медицинской радиологии и онкологии Федерального  
медико-биологического агентства России»  
433507, Россия, г. Дмитровград, ул. Курчатова, 5в.  
Тел./факс: 8 (908) 482-41-26.  
E-mail: 73bogomolova@gmail.com

### Address for correspondence:

Irina A. Bogomolova  
Federal Scientific Clinical Centre for Medical Radiology  
and Oncology  
5v Kurchatov St  
Dimitrovgrad  
433507 Russian Federation  
Phone/fax: +7 (908) 482-41-26.  
E-mail: 73bogomolova@gmail.com

### Образец цитирования:

И.А. Богомолова, Д.Р. Долгова, И.И. Антонеева,  
Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, Ю.Д. Удалов  
«Прогностическая значимость фактора роста  
гепатоцитов при неметастатическом колоректальном  
раке» // Российский иммунологический журнал, 2024.  
Т. 27, № 2. С. 383-390.  
doi: 10.46235/1028-7221-16652-PSO

© Богомолова И.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

I.A. Bogomolova, D.R. Dolgova, I.I. Antoneeva,  
T.V. Abakumova, T.P. Gening, Yu.D. Udalov “Prognostic  
significance of hepatocyte growth factor in non-metastatic  
colorectal cancer”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 383-390.  
doi: 10.46235/1028-7221-16652-PSO

© Bogomolova I.A. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16652-PSO

был значимо выше, чем в образцах линии резекции. Анализ безрецидивной выживаемости по Каплану–Майеру у пациентов с колоректальным раком по уровню экспрессии HGF (спрогнозированный уровень по оценке пропорциональных рисков – 0,7) показал, что медиана дожития в 1 (экспрессия HGF более 0,7) и 2 (экспрессия HGF менее 0,7) группах составила 23,3 и 62,9 месяцев соответственно (лонг-ранговый критерий  $p = 0,215$ ). Таким образом, установлено, что уровень мРНК HGF в опухоли пациентов с колоректальным раком не зависит от возраста, стадии заболевания и чувствительности к химиотерапии по схеме FOLFOX/XELOX. Значимо снижен уровень экспрессии в опухолях с KRAS-мутацией и повышен в опухолях с BRAF-мутацией EGFR-сигнального пути и при низкой дифференцировки опухоли. Таким образом, использование уровня экспрессии HGF в опухолевой ткани пациентов с неметастатическим колоректальным раком до начала химиотерапии для оценки прогноза безрецидивного периода возможно только в совокупности с показателями экспрессии TGF- $\beta$ , CXCL8 в ткани и уровня РЭА в крови этих больных.

*Ключевые слова:* фактор роста гепатоцитов, колоректальный рак, химиотерапия, KRAS, NRAS, BRAF

## PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR IN NON-METASTATIC COLORECTAL CANCER

Bogomolova I.A.<sup>a</sup>, Dolgova D.R.<sup>b</sup>, Antoneeva I.I.<sup>b,c</sup>, Abakumova T.V.<sup>b</sup>, Gening T.P.<sup>b</sup>, Udalov Yu.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal Scientific Clinical Centre for Medical Radiology and Oncology, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Dimitrovgrad, Russian Federation

<sup>b</sup> Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Regional Clinical Oncology Center, Ulyanovsk, Russian Federation

**Abstract.** Hepatocyte growth factor (HGF), produced by mesenchymal cells, stimulates mitogenesis and angiogenesis in tumor cells. Tumor cells of some solid tumors do not secrete HGF. The aim of the study was to evaluate the prognostic significance of HGF expression in tumor tissue in colorectal cancer (CRC). The study included 50 patients with stage II-III colorectal cancer; they underwent radical surgical treatment, followed by adjuvant chemotherapy according to the FOLFOX/XELOX regimen. In primary tumor samples, quantitative PCR was used to assess the level of HGF expression. Statistical processing of the obtained data was carried out using STATISTICA 13.0, BioStat v.7.1., and Jamovi 1.6.8 software. The study aims to study a new marker. Comparison of characteristics in the case of non-normal distribution was carried out using the nonparametric Mann–Whitney U test. Cox and Kaplan–Meier linear regression tests were used to analyze progression-free survival. When discussing the results, we used our previously obtained data on the level of expression of TGF- $\beta$  and CXCL8 in the tumor tissue. As a result of the studies, it was found that in 60% of tumor samples HGF was not expressed, but it was significantly higher than in the resection line samples. Analysis of relapse-free survival in patients with CRC according to the level of HGF expression (predicted level by proportional hazards assessment – 0.7) showed that the median survival in groups 1 (HGF expression more than 0.7) and 2 (HGF expression less than 0.7) was 23.3 and 62.9 months, respectively (long rank test  $p = 0.215$ ). It was shown that the level of HGF mRNA in CRC tumors does not depend on age, stage of the disease, and sensitivity to FOLFOX/XELOX chemotherapy. The expression level is significantly reduced in tumors with a KRAS mutation and increased in those with a BRAF mutation, in poorly differentiated tumors. Using the level of HGF expression in the tumor tissue of patients with non-metastatic CRC before the start of chemotherapy to assess the prognosis of the relapse-free period is only possible in conjunction with the expression of TGF- $\beta$ , CXCL8 in the tissue and the level of CEA in the blood of these patients.

*Keywords:* hepatocyte growth factor, colorectal cancer, chemotherapy, KRAS, NRAS, BRAF

## Введение

Ось фактор роста гепатоцитов (HGF) / рецептор с-MET участвует в передаче сигналов в базовых биологических процессах, таких как стимуляция движения эпителиальных клеток, трехмерный морфогенез и регулирование апоптоза [11]. Недавние исследования показали, что aberrantная передача сигналов HGF/с-MET может приводить к неконтролируемой пролиферации опухолевых клеток, их повышенной подвижности, способности к инвазии и ангиогенезу, играя существенную роль в развитии рака, включая рак желудка [13], рак молочной железы [7], колоректальный рак [10].

HGF продуцируется мезенхимальными клетками и является лигандом к тирозинкиназному рецептору с-MET, действует как цитокин на клетки эпителиального происхождения, стимулируя митогенез и ангиогенез [5].

Фактор роста гепатоцитов обнаружен во многих органах, включая молочные железы, легкие, почки и печень. Неоднозначной является информация о том, что опухолевые клетки некоторых солидных опухолей, в частности клетки аденокарциномы поджелудочной железы, в отличие от стромальных звездчатых клеток железы, не секретируют HGF [15]. Показано, что в опухолевых клетках HGF играет важную роль в пролиферации и ангиогенезе и способствует росту опухолевых клеток, инфильтрации в окружающие ткани и метастазированию [4].

В то же время в литературе представлены данные, подтверждающие, что более высокая экспрессия как HGF, так и его рецептора с-MET была связана с лучшим прогнозом [8].

Колоректальный рак является одной из наиболее распространенных опухолей, как у мужчин, так и у женщин и второй по значимости причиной смертности от рака во всем мире [12]. Современный подход к лечению предполагает использование различных схем химиотерапии, таргетной или иммунотерапии в зависимости от клинической ситуации и молекулярно-генетического подтипа опухоли. Механизмы возникновения резистентности опухоли к проводимой терапии при этом до конца не изучены. Одной из причин резистентности к антиангиогенной терапии может быть переключение на альтернативный путь ангиогенеза — формирование сосудов из предшествующих, инвагинация, васкулогенез, сосудистая мимикрия, дифференцировка опухолевых клеток в эндотелиоциты, рост опухоли вдоль сосудов, в том числе и переключении с VEGF-A на альтернативный проангиогенный фактор. Гипоксия, с одной стороны, приводит к клональному отбору опухолевых клеток с высоким инвазивным потенциалом [9]. С другой

стороны, гипоксия активирует инвазивную программу роста, управляемую HGF. Последний позволяет избежать опухолевым клеткам действия антиангиогенной терапии [6].

**Цель исследования** — оценка прогностической значимости экспрессии HGF в опухолевой ткани при неметастатическом колоректальном раке (КРР).

## Материалы и методы

Ретроспективное исследование выполнено на базе научно-исследовательского медико-биологического центра Ульяновского государственного университета (УлГУ). В качестве биоматериала были использованы гистологические срезы опухолей, содержащих не менее 80% опухолевых клеток и срезы с блоков линий резекции этих же образцов опухолей, полученных интраоперационно у пациентов с КРР, получавших лечение на базе ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер» г. Ульяновска в период с 2014 по 2020 гг. Протокол исследования одобрен этическим комитетом Института медицины, экологии и физической культуры УлГУ (№ 9 от 15.09.2014). В клиническое исследование включено 50 пациентов с неметастатическим КРР. Характеристика клинических наблюдений представлена в таблице 1.

Обследование пациентов проводили каждые 2 мес. химиотерапии (ХТ) и после ее завершения. При этом оценивали общеклинический, биохимический анализ крови, общий анализ мочи, кровь на раковый эмбриональный антиген (РЭА), СА 19/9. Проводились инструментальные методы обследования: рентгенография органов грудной клетки в двух проекциях, УЗИ органов брюшной полости, малого таза, забрюшинного пространства, фиброколоноскопия (по показаниям). При сомнительных результатах стандартных методов обследования выполнялась мультиспиральная компьютерная томография или магнитно-резонансная томография органов грудной клетки, брюшной полости, малого таза с внутривенным контрастированием. По окончании лечения пациенты находились под динамическим наблюдением врача-онколога, с периодическим контрольным обследованием в соответствии с клиническими рекомендациями.

Для проведения экспрессионного анализа в исследовании использовали FFPE-образцы опухоли. Выделение РНК из парафиновых блоков (FFPE) проводили из срезов опухоли толщиной 10-15 мкм (общей площадью не менее 2 см<sup>2</sup>) с использованием магнитных частиц SileksMagNA (набор KIRFFPE0100, ООО «Силекс», Москва, Россия) согласно протоколу производителя. Сразу же после выделения ДНК проводили поста-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКИХ НАБЛЮДЕНИЙ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF CLINICAL OBSERVATIONS

Показатель Parameter	Количество пациентов Number of patients (n = 50)
<b>Пол / sex:</b> – мужской / male – женский / female	24 (48%) 26 (52%)
<b>Возраст (лет) / Age (years):</b> – меньше / less 55 – больше / more 55	21 (42%) 29 (58%)
<b>Стадия заболевания / Disease stage:</b> – II – III	14 (28%) 36 (72%)
<b>Оценка распространенности первичной опухоли / Estimation of the extent of the primary tumor:</b> – T2 – T3 – T4	2 (4%) 34 (68%) 14 (28%)
<b>Оценка метастатического поражения регионарных лимфоузлов (N) / Metastatic lesions of regional lymph nodes:</b> – N0 – N1 – N2	17 (34%) 27 (54%) 6 (12%)
<b>Степень дифференцировки / Differentiation:</b> – низкодифференцированная / poorly differentiated – умереннодифференцированная / moderately differentiated – высокодифференцированная / well differentiated	6 (12%) 31 (62%) 13 (26%)
<b>Расположение опухоли (сторона) / Tumor location (side):</b> – левосторонняя / left-handed – правосторонняя / right-handed	35 (70%) 15 (30%)
<b>Наличие мутаций генов EGFR-сигнального пути / Presence of mutations in EGFR signaling pathway genes:</b> – NRAS – KRAS – BRAF – «Дикий тип» / «Wild Type»	5 (10%) 18 (36%) 4 (8%) 23 (46%)
<b>Наследственность / Heredity:</b> – Отягощена / Burdened – Не отягощена / Not burdened – Неизвестно / Unknown	10 (20%) 35 (70%) 5 (10%)
<b>Уровень РЭА в крови / CEA level in blood:</b> – Ниже уровня 23 нг/мл / Below the level of 23 ng/mL – Выше уровня 23 нг/мл / Above the level of 23 ng/mL	41 (82%) 9 (18%)

новку реакции обратной транскрипции (ОТ). Для получения к ДНК на матрице РНК использовали случайный гексануклеотидный (random-primer) праймер и компоненты набора MMLVRT Kit (ООО «ЕврогенЛаб», Москва, Россия). Затем проводили количественную ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя Sybr. Праймеры для ПЦР, специфические к HGF1 (Forward: GTAAATGGGATTCCAACACGAACA

Reverse: TGTCGTGCAGTAAGAACCCCAACTC) синтезированы на базе ООО «ЕврогенЛаб» (Москва, Россия). В качестве гена-рефери (house-keeping) использовали ген GAPDH. Реакционная смесь для ПЦР содержала 5 мкл PCRMix (набор «Готовая смесь для ПЦР qPCRMix-HSSYBR»), смесь прямого и обратного праймеров в конечной концентрации 0,4 мкМ, к ДНК 5-8 мкл (50 нг на реакцию), стерильная вода в объеме, необхо-



димом до 25 мкл реакции. ПЦР проводилась в триплетах на амплификаторе CFX-96 Bio-Rad (США). Расчет нормализованной экспрессии исследованного гена относительно гена-рефери проводили с использованием ПО CFX Manager Bio-Rad Laboratories.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием ПО STATISTICA 13.0 (StatSoft, США), BioStat v. 7.1, Jamovi 1.6.8. Исследование направлено на изучение нового маркера, носит поисковый характер. Сравнение признаков в случае ненормального распределения проводилось с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Для анализа выживаемости без прогрессирования использовались критерии линейной регрессии Кокса и Каплана–Майера. При обсуждении результатов были использованы полученные нами ранее данные по уровню экспрессии TGF-β, CXCL8 в опухолевой ткани пациентов с КРР [1].

## Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что в 60% исследованных образцов опухоли изученный маркер не экспрессировался, в остальных случаях – уровень мРНК HGF в опухоли у пациентов с КРР не зависел от возраста, не отличался достоверно на II и III стадиях заболевания, но при этом был значимо выше, чем в образцах линии резекции. При наличии в опухоли BRAF-мутации EGFR-сигнального пути уровень мРНК HGF значимо превышает таковой в опухо-

лях «дикого типа», в опухолевой ткани с NRAS- и KRAS-мутациями. Выраженные отличия по уровню мРНК HGF выявлены в низкодифференцированной первичной опухоли по сравнению с умеренно- и высокодифференцированной (табл. 2).

Нами ранее установлена зависящая гиперэкспрессия трансформирующего фактора роста TGF-β и интерлейкина-8 (CXCL8), которые характеризуют определенный фенотип опухоли КРР с высоким метастатическим потенциалом [1]. В мультивариантном варианте регрессии Кокса установлено, что зависимыми прогностическими факторами в возникновении рецидива у пациентов при II-III стадиях КРР являются правосторонняя локализация, повышение в крови уровня РЭА (HR 23,04 CI 95% 1,95-272,74, p = 0,013), повышенная коэкспрессия HGF (HR 0,64 CI 95% 0,42-0,98, p = 0,039), TGF-β (HR 0,17 CI 95% 0,04-0,72, p = 0,017), CXCL8 (HR 3,51 CI 95% 1,16-10,56, p = 0,026) в первичной опухоли (p < 0,05).

Анализ безрецидивной выживаемости по Каплану–Майеру у пациентов КРР по уровню экспрессии HGF (спрогнозированный уровень по оценке пропорциональных рисков – 0,7) показал, что медиана дожития в 1 (экспрессия HGF более 0,7) и 2 (экспрессия HGF менее 0,7) группах составила 23,3 и 62,9 месяцев соответственно (лонг-ранговый критерий p = 0,215) (рис. 1).

В качестве факторов прогноза при КРР сегодня используется наличие мутаций генов KRAS,

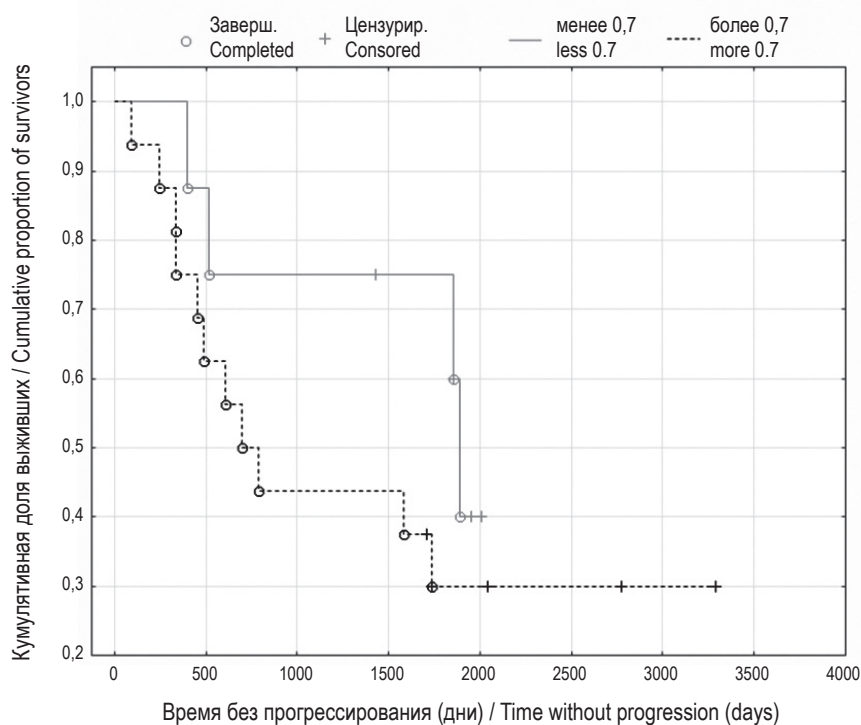
ТАБЛИЦА 2. НОРМАЛИЗОВАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ HGF В ОБРАЗЦАХ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ КРР

TABLE 2. NORMALIZED HGF EXPRESSION IN PRIMARY CRC TUMOR SAMPLES

Группы Groups	Линия резекции Resection line (n = 8)	Опухолевая ткань КРР Tumor tissue of colorectal cancer								
		Мутации генов EGFR-сигнального пути Mutations of EGFR signaling pathway genes				Стадии Stages		Дифференцировка опухоли Tumor differentiation		
		«Дикий тип» "Wild Type" n = 8	NRAS n = 6	KRAS n = 6	BRAF n = 3	II (n = 7)	III (n = 13)	Низкая Low (n = 8)	Умеренная Moderate (n = 12)	Высокая High (n = 8)
Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	0,074 (0,000-0,409)	3,420 (1,330-5,950)	1,550 (1,025-3,107)	0,942 (0,065-1,830)	9,64 (8,425-10,233)	1,829 (0,171-7,947)	1,696 (1,450-4,405)	4,405 (3,667-11,779)	1,670 (1,508-5,230)	1,185 (0,147-1,985)
p		p <sub>1</sub> = 0,010	p <sub>1</sub> = 0,006	p <sub>1</sub> = 0,003		p <sub>1</sub> < 0,0001*	p <sub>1</sub> < 0,0001; p <sub>2</sub> = 0,562 *		p <sub>1</sub> = 0,008	p <sub>1</sub> = 0,003

Примечание. \* p<sub>1</sub> – в сравнении с линией резекции; p<sub>2</sub> – в сравнении с предыдущей стадией.

Note. \* p<sub>1</sub>, in comparison with the resection line; p<sub>2</sub>, in comparison with the previous stage.



**Рисунок 1. Кривая времени без прогрессирования пациентов с колоректальным раком в зависимости от экспрессии HGF в опухоли**

Figure 1. Progression-free time curve of patients with colorectal cancer depending on HGF expression in the tumor

NRAS, BRAF. Показано, что мутации гена KRAS имеют место в 30-50% случаев КРР [2]. На сегодня установлено, что мутации KRAS ухудшают прогноз при раке правой половины ободочной кишки. Однако статистически значимой зависимости прогрессирования заболевания от статуса KRAS не выявлено [3]. Нами установлены более низкие значения мРНК HGF в опухоли с KRAS-мутацией.

Онкоген BRAF играет важную роль в митоген-активируемом сигнальном протеиназном пути. Около 10% пациентов с КРР имеют мутацию гена BRAF, что определяет усиленную клеточную пролиферацию и, соответственно, рост опухоли [14]. В наших исследованиях мы определили, что в опухолях с BRAF-мутацией EGFR-сигнального пути уровень мРНК HGF значимо выше такового по сравнению с опухолями «дикого типа» и опухолевой ткани с NRAS- и KRAS-мутациями. Такая резкая активация HGF/c-MET сигнального пути позволяет приблизиться к расшифровке механизмов, определяющих, в данном случае, высокую агрессивность опухоли.

Мы не установили значимых различий уровней мРНК HGF в опухолях пациентов с нематастатическим КРР с различной чувствительностью к ХТ, что согласуется с данными, полученными

при наблюдении за пациентами с раком молочной железы. В то же время Oliveres H. и соавт. (2020) была показана положительная корреляция уровня экспрессии HGF со степенью дифференцировки. При оценке первичных опухолей пациентов с КРР мы установили значимо более высокие уровни мРНК HGF в низкодифференцированных по сравнению с умеренно- и высокодифференцированными опухолями.

## Заключение

Использование уровня экспрессии HGF в опухолевой ткани пациентов с нематастатическим колоректальным раком до лечения для оценки прогноза безрецидивного периода возможно только в совокупности с показателями экспрессии TGF- $\beta$ , CXCL8 в ткани и уровня РЭА в крови этих больных.

### Участие авторов

Концепция и дизайн исследования: Богомолова И.А., Генинг Т.П., Удалов Ю.Д. Сбор и обработка материалов: Богомолова И.А., Долгова Д.Р. Статистическая обработка: Богомолова И.А., Долгова Д.Р. Написание текста: Генинг Т.П., Богомолова И.А. Редактирование: Генинг Т.П., Антонеева А.И., Абакумова Т.В.

## Список литературы / References

1. Богомолова И.А., Долгова Д.Р., Антонева И.И., Абакумова Т.В., Мягдиева И.Р., Песков А.Б., Генинг Т.П. Предикивная значимость регуляторов воспаления TGFb1 и CXCL8 в опухолевой ткани при колоректальном раке // Бюллетень сибирской медицины, 2023. Т. 22, № 1. С. 7-13. [Bogomolova I.A., Dolgova D.R., Antoneeva I.I., Abakumova T.V., Myagdieva I.R., Peskov A.B., Gening T.P. Predictive value of inflammatory regulators TGFb1 and CXCL8 in tumor tissue in colorectal cancer. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2023, Vol. 22, no. 1, pp. 7-13. (In Russ.)]
2. Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Водолажский Д.И. Частота и спектр мутаций гена *kras* при распространенном колоректальном раке. Клинико-морфологические особенности // Молекулярная медицина, 2015. № 5. С. 26-29. [Kit O.I., Gevorkyan Yu.A., Soldatkina N.V., Vodolazhsky D.I. Frequency and spectrum of *kras* gene mutations in advanced colorectal cancer. Clinical and morphological characteristics. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2015, no. 5, pp. 26-29. (In Russ.)]
3. Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Тимошкина Н.Н., Харарезов Д.А., Каймакчи Д.О., Полуэктов С.И., Дашков А.В., Гудцкова Т.Н. Современные прогностические факторы при колоректальном раке // Колопроктология, 2021. Т. 20, № 2. С. 42-49. [Kit O.I., Gevorkyan Yu.A., Soldatkina N.V., Timoshkina N.N., Kharagezov D.A., Kaymakchi D.O., Poluektov S.I., Dashkov A.V., Gudtskova T.N. Prognostic factors in colorectal cancer. *Koloproktologiya = Coloproctology*, 2021, Vol. 20, no. 2, pp. 42-49. (In Russ.)]
4. Birchmeier C., Birchmeier W., Gherardi E., Woude G.F.V. Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, Vol. 4, no. 12, pp. 915-925.
5. Bottaro D.P., Rubin J.S., Faletto D.L., Chan A.M., Kmieciak T.E., Woude G.F.V., Aaronson S.A. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the *c-met* proto-oncogene product. *Science*, 1991, Vol. 251, no. 4995, 802-804.
6. Jahangiri A., de Lay M., Miller L.M., Carbonell W.S., Hu Y.-L., Lu K., Tom M.W., Paquette J., Tokuyasu T.A., Tsao S., Marshall R., Perry A., Bjorgan K.M., Chaumeil M.M., Ronen S.M., Bergers G., Aghi M.K. Gene expression profile identifies tyrosine kinase *c-Met* as a targetable mediator of antiangiogenic therapy resistance. *Clin. Cancer Res.*, 2013, Vol. 19, no. 7, pp. 1773-1783.
7. Jones G.S., Hoadley K.A., Olsson L.T., Hamilton A.M., Bhattacharya A., Kirk E.L., Tipaldos H.J., Fleming J.M., Love M.I., Nichols H.B., Olshan A.F., Troester M.A. Hepatocyte growth factor pathway expression in breast cancer by race and subtype. *Breast Cancer Res.*, 2021, Vol. 23, no. 1, 80. doi: 10.1186/s13058-021-01460-5.
8. Qiu S.Q., van Rooijen J., Nienhuis H.H., van der Vegt B., Timmer-Bosscha H., van Leeuwen-Stok E., Walenkamp A.M.E., van Deurzen C.H.M., de Bock G.H., de Vries E.G.E., Schröder C.P. High hepatocyte growth factor expression in primary tumor predicts better overall survival in male breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2020, Vol. 22, no. 1, 30. doi: 10.1186/s13058-020-01266-x.
9. Rapisarda A., Melillo G. Role of the hypoxic tumor microenvironment in the resistance to anti-angiogenic therapies. *Drug Resist. Updat.*, 2009, Vol. 12, no. 3, pp. 74-80.
10. Seneviratne D., Ma J., Tan X., Kwon Y.-K., Muhammad E., Melhem M., DeFrances M.C., Zarnegar R. Genomic instability causes HGF gene activation in colon cancer cells, promoting their resistance to necroptosis. *Gastroenterology*, 2015, Vol. 148, no. 1, pp. 181-191.e17.
11. Trusolino L., Bertotti A., Comoglio P.M. MET signalling: Principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, Vol. 11, pp. 834-848.
12. Viale P.H. The American Cancer Society's Facts & Figures: 2020 Edition. *J. Adv. Pract. Oncol.*, 2020, Vol. 11, no. 2, pp. 135-136.
13. Wang C., Xi W., Ji J., Cai Q., Zhao Q., Jiang J., Zhou C., Shi M., Zhang H., Zhu Z., Zhang J. The prognostic value of HGF-c-MET signaling pathway in Gastric Cancer: a study based on TCGA and GEO databases. *Int. J. Med. Sci.*, 2020, Vol. 17, no. 13, pp. 1946-1955.
14. Wang J., Shen J., Huang C., Cao M., Shen L. Clinicopathological significance of BRAFV600E mutation in colorectal cancer: an updated meta-analysis. *J. Cancer*, 2019, Vol. 10, no. 10, pp. 2332-2341.
15. Xu Z., Pang T.C.Y., Liu A.C., Pothula S.P., Mekapogu A.R., Perera C.J., Murakami T., Goldstein D., Pirola R.C., Wilson J.S., Apte M.V. Targeting the HGF/c-MET pathway in advanced pancreatic cancer: a key element of treatment that limits primary tumour growth and eliminates metastasis. *Br. J. Cancer*, 2020, Vol. 122, no. 10, pp. 1486-1495.

### Авторы:

**Богомолова И.А.** — заведующая отделением противоопухолевой лекарственной терапии стационара ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр медицинской радиологии и онкологии Федерального медико-биологического агентства России», г. Димитровград, Россия

### Authors:

**Bogomolova I.A.**, Head, Department of Antitumor Drug Therapy of the Hospital, Federal Scientific Clinical Centre for Medical Radiology and Oncology, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Dimitrovgrad, Russian Federation

**Долгова Д.Р.** — к.б.н., доцент кафедры физиологии и патофизиологии, директор Научно-исследовательского медико-биологического центра ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

**Антонеева И.И.** — д.м.н., профессор кафедры онкологии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; заведующий отделением онкогинекологии ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск, Россия

**Абакумова Т.В.** — д.б.н., доцент, профессор кафедры физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

**Генинг Т.П.** — д.б.н., профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

**Удалов Ю.Д.** — д.м.н., доцент, главный внештатный специалист ФМБА России по медицинской радиологии, генеральный директор ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр медицинской радиологии и онкологии Федерального медико-биологического агентства России», г. Димитровград, Россия

**Dolgova D.R.**, PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Director of the Medical and Biological Research Center, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

**Antoneeva I.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Oncology and Radiology, Ulyanovsk State University; Head, Department of Oncogynecology, Regional Clinical Oncology Center, Ulyanovsk, Russian Federation

**Abakumova T.V.**, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

**Gening T.P.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

**Udalov Yu.D.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, External Expert of the FMBA of Russia in Medical Radiology, General Manager, Federal Scientific Clinical Centre for Medical Radiology and Oncology, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Dimitrovgrad, Russian Federation

---

Поступила 27.03.2024

Отправлена на доработку 30.03.2024

Принята к печати 09.04.2024

---

Received 27.03.2024

Revision received 30.03.2024

Accepted 09.04.2024

## **ЗУБОЧЕЛЮСТНЫЕ АНОМАЛИИ ПРИ ВРОЖДЕННЫХ ОШИБКАХ ИММУНИТЕТА**

**Саркисян Н.Г.<sup>1,2</sup>, Тузанкина Н.А.<sup>2</sup>, Катаева Н.Н.<sup>1</sup>,  
Меликян А.Г.<sup>1</sup>, Осипова И.М.<sup>1</sup>**

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

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

**Резюме.** Нарушения развития и болезни зубов, тканей пародонта и всей челюстно-лицевой области составляют значительную часть комплекса симптомов, часто встречающихся при врожденных ошибках иммунитета. Цель исследования — выявить частоту встречаемости различных зубочелюстных аномалий у пациентов с диагностированными иммунодефицитами.

В процесс исследования были вовлечены 64 пациента Свердловской областной клинической больницы № 1 и Областной детской клинической больницы (г. Екатеринбург) с различными диагнозами из 6 подгрупп в соответствии с классификацией врожденных ошибок иммунитета: комбинированные иммунодефициты, антительные дефекты, аутовоспалительные нарушения, дефекты числа и функций фагоцитов, дефекты иммунной дисрегуляции, дефекты комплемента, неверифицированный диагноз с признаками иммунодефицитов. У всех пациентов проводился осмотр полости рта, регистрировалось состояние твердых тканей зубов, пародонта и костной ткани челюсти.

Выяснили, что аномалия размеров челюсти характерна для всех исследуемых групп пациентов, кроме группы с дефектами комплемента. Наряду с этим, такая патология, как количественное и качественное изменение зубов выявлена в четырех классификационных группах: у «комбинированных иммунодефицитов» (25% случаев из подгруппы), «антительных дефектов» (31% случаев из подгруппы), «дефектов фагоцитов» (10% случаев из подгруппы), «дефектов иммунной дисрегуляции» (50% случаев из подгруппы). Такая же частота встречаемости дефектов репарации ткани: у «комбинированных иммунодефицитов» (16,6% случаев из подгруппы), «аутовоспалительных нарушений» (26,7% случаев из подгруппы), «дефектов фагоцитов» (10% случаев из подгруппы), у «неверифицированных диагнозах» (20% случаев из подгруппы).

Самый высокий процент количественного проявления таких аномалий, как размер челюсти (26% случаев из всей исследуемой группы) и лицевой дисморфизм (27% случаев из всей исследуемой группы).

У пациентов с «комбинированными иммунодефицитами» были выявлены все описанные в работе зубочелюстные аномалии. При этом самый высокий процент людей из этой группы имели задержку прорезывания зубов (33,3%) и лицевой дисморфизм (33%). У единственного пациента с диагнозом

### **Адрес для переписки:**

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

### **Address for correspondence:**

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

### **Образец цитирования:**

Н.Г. Саркисян, Н.А. Тузанкина, Н.Н. Катаева, А.Г. Меликян, И.М. Осипова «Зубочелюстные аномалии при врожденных ошибках иммунитета» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 391-396. doi: 10.46235/1028-7221-16812-DAI

© Саркисян Н.Г. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

N.G. Sarkisyan, I.A. Tuzankina, N.N. Kataeva, A.H. Melikyan, I.M. Osipova "Dental anomalies in congenital error of immunity", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 391-396. doi: 10.46235/1028-7221-16812-DAI

© Sarkisyan N.G. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16812-DAI

«дефекты комплимента» зубочелюстных аномалий не обнаружено. Минимальное число проявлений исследуемых аномалий у групп с «дефектами антител» и «дефектами иммунной дисрегуляции».

Накопленный опыт по описанию различных стоматологических диагнозов, характера их проявлений на фоне врожденных ошибок иммунитета, в дальнейшем, будет способствовать созданию стоматологических критериев для диагностики первичных иммунодефицитов у пациентов с ранее не установленным диагнозом, что позволит осуществлять более эффективный, т. е. комплексный подход к лечению совместно с врачами-иммунологами.

*Ключевые слова:* первичные иммунодефициты, аномалии зубов, задержка прорезывания зубов, аномалия размера челюсти, лицевой дисморфизм, расщелина верхней челюсти

## DENTAL ANOMALIES IN CONGENITAL ERROR OF IMMUNITY

Sarkisyan N.G.<sup>a,b</sup>, Tuzankina I.A.<sup>b</sup>, Kataeva N.N.<sup>a</sup>, Melikyan A.H.<sup>a</sup>,  
Osipova I.M.<sup>a</sup>

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

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

**Abstract.** Developmental disorders of the teeth and maxillofacial region are part of a symptoms complex that often occur with inborn errors of the immune system. The purpose of the study is to identify the frequency of various dentofacial anomalies occurrence in patients with diagnosed immunodeficiencies.

The study involved 64 patients of the Sverdlovsk Regional Clinical Hospital No. 1 and the Regional Children's Clinical Hospital (Ekaterinburg) with various diagnoses: combined immunodeficiencies, antibody defects, autoinflammatory disorders, defects in the number and functions of phagocytes, defects in immune dysregulation, complement defects, and unverified diagnosis with signs of immunodeficiency. All patients underwent examination of the oral cavity, hard dental tissues, periodontal tissue and jaw bone tissue.

It was found that an anomaly in jaw size is characteristic of all studied patient groups, except for the group with complement defects. Along with this, such pathology as quantitative and qualitative changes in teeth was identified in four classification groups: "combined immunodeficiencies" (25% of cases from the subgroup), "antibody defects" (31% of cases from the subgroup), "phagocyte defects" (10% of cases from the subgroup), and "immune dysregulation defects" (50% of cases from the subgroup). The same frequency of occurrence of tissue repair defects: in "combined immunodeficiencies" (16.6% of cases from the subgroup), "autoinflammatory disorders" (26.7% of cases from the subgroup), "phagocyte defects" (10% of cases from the subgroup), in "unverified diagnoses" (20% of cases from the subgroup). The highest percentage of quantitative manifestations of such anomalies as jaw size (26% of cases from the entire study group) and facial dysmorphism (27% of cases from the entire study group). In patients with "combined immunodeficiencies", all the dental anomalies described in the work were identified. However, the highest percentage of people in this group had delayed teething (33.3%) and facial dysmorphism (33%). The only patient diagnosed with "complement defects" had no dental anomalies. The minimum number of manifestations of the studied anomalies was observed in groups with "antibody defects" and "immune dysregulation defects".

The accumulated experience in describing various dental diagnoses will contribute to the creation of dental criteria for the diagnosis of primary immunodeficiencies.

*Keywords:* primary immunodeficiencies, dental anomalies, delayed teething, anomaly of jaw size, facial dysmorphism, cleft maxilla

## Введение

Примерно до 40% людей имеют по крайней мере одну зубочелюстную аномалию, часто связанную с генетическими факторами и факторами окружающей среды [8]. Влияния первичных иммунодефицитов на проявление тех или иных заболеваний вызывает интерес у научного сообщества и практикующих врачей узких специ-

альностей [4, 5]. Нарушения развития и болезни зубов, тканей пародонта и всей челюстно-лицевой области составляют значительную часть комплекса симптомов, часто встречающихся при врожденных ошибках иммунитета [2, 3].

Аномалии зубов включают целый ряд отклонений от их нормального развития, проявляющиеся в изменении количества, размера, фор-

мы и положения зубов. Например, гиподентия (отсутствие зубов), гипердентия (лишние зубы), слияние и геминация зубов, это влияет не только на эстетику, но и на функцию зубочелюстной системы [1, 8]. Патологии челюстно-лицевой области могут быть связаны с орофациальными расщелинами, влияющими на развитие и выравнивание зубов. Распространенность зубных аномалий различается на верхней и нижней челюстях, причем верхняя челюсть поражается чаще из-за ее сложного развития [7, 9].

При иммунодефицитах патология в полости рта имеет специфический характер [6] и в большинстве случаев не поддается традиционной терапии, что приводит к необходимости междисциплинарного подхода и совместной работы с врачами-иммунологами. Понимание этиологии этих отклонений имеет решающее значение для правильной диагностики и лечения, направленного на решение как эстетических, так и функциональных проблем стоматологического характера.

**Цель исследования** – выявить частоту встречаемости различных зубочелюстных аномалий у пациентов с диагностированными иммунодефицитами.

## Материалы и методы

В процесс исследования были вовлечены 64 пациента Свердловской областной клинической больницы № 1 и Областной детской клинической больницы (г. Екатеринбург) с различными диагнозами из 6 подгрупп в соответствии с классификацией врожденных ошибок иммунитета: комбинированные иммунодефициты (24 человека), антительные дефекты (13 человек), аутовоспалительные нарушения (15 человек), дефекты числа и функций фагоцитов (10 человек), дефекты иммунной дисрегуляции (2 человека), дефекты комплемента (1 человек). Седьмая подгруппа была выделена для пациентов с неверифицированными диагнозами, имеющими признаки иммунодефицитов (5 человек). Возраст группы от 3 до 70 лет, среди которых от 3 до 7 лет – 21 пациент, в возрасте от 7 до 12 лет – 21 пациент, в возрасте от 12 до 18 – 14 пациентов и 8 взрослых старше 18. У всех пациентов проводился осмотр полости рта, регистрировалось состояние твердых тканей зубов, пародонта и костной ткани челюсти. Для осуществления осмотра было подписано индивидуальное информированное согласие на проведение медицинского вмешательства пациентами или родителями пациентов.

Все диагнозы были поставлены согласно международной классификации болезней (МКБ-10). При необходимости уточнения диагноза проводилась дифференциальная диагностика с ис-

пользованием дополнительных диагностических методов (конусно-лучевая компьютерная томограмма, рентгеновские снимки). Наиболее сложные случаи обсуждались врачебной комиссией.

Статистическая обработка данных проводилась параметрическими и непараметрическими методами с использованием пакета прикладных программ IBM® SPSS Statistics® 20.

## Результаты и обсуждение

По результатам диагностики у пациентов были обнаружены следующие зубочелюстные аномалии: количественное и качественное изменение зубов, задержка прорезывания зубов, аномалии размеров челюстей, лицевой дисморфизм, дефекты репарации тканей, расщелина верхней челюсти.

В общей группе 64 пациентов с первичными иммунодефицитами симптом «количественные и качественные изменения зубов» проявлялся в 20% случаев. В подгруппе «комбинированные иммунодефициты» частота встречаемости составила 25%, в подгруппе «антительные дефекты» 31%, в подгруппе «дефекты иммунной дисрегуляции» в 50%, в подгруппе «дефекты фагоцитоза» в 10%. В классификационных подгруппах «аутовоспалительные нарушения», «неверифицированные иммунодефициты», «дефекты комплемента» данный симптом обнаружен не был. Медиана симптома «количественные и качественные изменения зубов» среди пациентов каждой из подгрупп составила: 3,5 (14,6%) в «комбинированных иммунодефицитах», 2,5 (19,2%) в «дефектах антителообразования», 1 (50%) в «дефектах иммунной дисрегуляции» и 1 (50%) в «дефектах фагоцитоза». Среднеквадратичное отклонение в подгруппе «комбинированные иммунодефициты» составило 0,71 (2,9%), в подгруппе «дефекты антителообразования» 1,15 (8,84%), в подгруппе «дефекты иммунной дисрегуляции» 0,71 (35,5%), в подгруппе «дефекты фагоцитоза» 0,5 (5%).

Симптом «задержка прорезывания зубов» в группе 64 пациентов с ПИД проявился в 23% случаев. В подгруппе «комбинированные иммунодефициты» частота встречаемости была 33,3%, в подгруппе «дефекты антител» данный симптом отсутствовал, в подгруппе «дефекты иммунной дисрегуляции» данный симптом отсутствовал, в подгруппе «аутовоспалительные нарушения» задержка прорезывания зубов проявлялась в 20% случаев, в подгруппе «дефекты комплемента» данный симптом отсутствовал, в подгруппе «неверифицированные иммунодефициты» симптом проявился в 40% случаев. Медиана значений группы «комбинированные иммунодефициты» составила 4,5 (18,75%), «дефекты фагоцитоза» – 2 (8,3%), «аутовоспалительные нарушения»

2 (20%), «неверифицированные иммунодефициты» 1,5 (30%). Среднеквадратичное отклонение составило 1,05 в «комбинированных иммунодефицитах», 1,5 в «дефектах фагоцитоза», 0,5 в «аутовоспалительных нарушениях».

Аномалии размеров челюстей встречались в 26% случаев среди всех пациентов с врожденными ошибками иммунитета. В подгруппе «комбинированные иммунодефициты» процент встречаемости составил 29%, у пациентов с «дефектами антител» в 7,7%, у пациентов подгруппы «дефекты иммунной дисрегуляции» в 50%, среди «дефектов фагоцитоза» в 40%, у пациентов с «аутовоспалительными нарушениями» в 23%, среди «неверифицированных иммунодефицитов» в 40%, в подгруппе «дефекты комплемента» данного симптома обнаружено не было. Медиана симптома «задержка роста костей лицевого скелета» в подгруппе «комбинированные иммунодефициты» составила 4 (29%), 1 (7,7%) в подгруппе «антительные дефекты», 1 (50%) в группе «дефекты иммунной дисрегуляции», 1 (10%) в группе «дефекты фагоцитоза», 3,5 (23%) в группе «аутовоспалительные нарушения». Среднеквадратичное отклонение в подгруппе «комбинированные иммунодефициты» составило 1,39 (5,8%), в подгруппе «дефекты антител» 0,58 (4,4%), в подгруппе «дефекты иммунной дисрегуляции» 0,71 (35,5%), в подгруппе «дефекты фагоцитоза» 2 (20%), в подгруппе «аутовоспалительные нарушения» 0,96 (6,4%).

Симптом «лицевой дисморфизм» встречался у пациентов с ПИД в 27% случаев. В подгруппе «комбинированные иммунодефициты» данный симптом встречался у 33%. В остальных подгруппах данного симптома обнаружено не было. Медиана симптома «лицевой дисморфизм» в подгруппе «комбинированные иммунодефициты» составила 4,5 (18,75%). Среднеквадратичное отклонение в подгруппе «комбинированные иммунодефициты» составило 0,88 (3,7%).

Симптом «дефекты репарации тканей» встречался в 14,2%. Среди пациентов «комбинированные иммунодефициты» симптом встречался в 16,6% случаев, среди пациентов с «дефектами фагоцитоза» в 10%, при «аутовоспалительных» нарушениях в 26,7%, в подгруппе «неверифицированные иммунодефициты» в 20%. В подгруппах «дефекты комплемента», «дефекты иммунной дисрегуляции» и «дефекты антител» данного симптома обнаружено не было. Медиана симптома «дефекты репарации» в подгруппе «комбинированные иммунодефициты» составила 2,5 (10,4%), 1 (10%) в группе «дефекты фагоцитоза», 4 (16,7%) в группе «аутовоспалительные нарушения». Среднеквадратичное отклонение в подгруппе «комбинированные иммунодефици-

ты» составило 0,73 (3%), в подгруппе «дефекты фагоцитоза» 0,5 (5%), в подгруппе «аутовоспалительные нарушения» 0,82 (5,4%).

Симптом «расщелина верхней челюсти» встречался среди пациентов с первичными иммунодефицитами в 6% случаев. В группе «комбинированные иммунодефициты» – в 16%.

## Заключение

Клинические проявления стоматологического профиля при врожденных ошибках иммунитета разнообразны. Для некоторых синдромов существуют патогномичные признаки, что делает диагностику «очевидной» при знании данных признаков. В некоторых случаях «иммунодефицит» возможно заподозрить при сочетанном проявлении симптомокомплекса в полости рта и общих заболеваний.

В результате проведенного исследования различных аномалий зубов и челюстно-лицевой области у пациентов с первичными иммунодефицитами по Свердловской области, можно проследить наиболее часто встречающиеся патологии у людей с диагнозами из разных классификационных групп. Выяснили, что аномалия размеров челюсти характерна для всех пациентов исследуемых групп, кроме группы с дефектами комплемента. Наряду с этим такие патологии, как количественное и качественное изменение зубов и дефекты репарации ткани, встречались в четырех из шести исследуемых группах с разными врожденными ошибками иммунитета. Самый высокий процент количественного проявления таких аномалий, как размер челюсти и лицевой дисморфизм.

У пациентов с «комбинированными иммунодефицитами» были выявлены все описанные в работе зубочелюстные аномалии. При этом самый высокий процент людей из этой группы имели задержку прорезывания зубов и лицевой дисморфизм. У единственного пациента с диагнозом «дефекты комплемента» зубочелюстных аномалий не обнаружено. Минимальное число проявлений исследуемых аномалий у групп с «дефектами антител и иммунной дисрегуляции».

Накопленный опыт по описанию различных стоматологических диагнозов, характера их проявлений на фоне врожденных ошибок иммунитета, в дальнейшем, будет способствовать созданию стоматологических критериев для диагностики первичных иммунодефицитов у пациентов с ранее не установленным диагнозом, что позволит осуществлять более эффективный, т. е. комплексный подход к лечению совместно с врачами-иммунологами.



## Список литературы / References

1. Бимбас Е.С., Сайпеева М.М. Обзор литературных данных по вопросу первичной профилактики ретенции верхних постоянных клыков // Уральский медицинский журнал, 2016. № 7 (140). С. 32-37. [Bimbass E.S., Saypееva M.M. A report of primary prophylaxis of the impaction of the maxillary canines. *Uralskiy meditsinskiy zurnal = Ural Medical Journal*, 2016, no. 7 (140), pp. 32-37. (In Russ.)]
2. Долгих М.А., Болков М.А., Тузанкина И.А., Саркисян Н.Г., Овсепян Н.А. Стоматологические проявления первичных иммунодефицитов // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 3. С. 144-154. [Dolgikh M.A., Bolkov M.A., Tuzankina I.A., Sarkisyan N.G., Ovsepyan N.A. Oral manifestations of primary immunodeficiencies. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 3, pp. 144-154. (In Russ.)]
3. Долгих М.А., Тузанкина И.А., Саркисян Н.Г., Овсепян Н.А., Болков М.А. Проявления первичных иммунодефицитов в полости рта и челюстно-лицевой области // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 2 (20). С. 291-294. [Dolgikh M.A., Tuzankina I.A., Sarkisyan N.G., Ovsepyan N.A., Bolkov M.A. Manifestations of primary immunodeficiencies in the region of the mouth and the maximum-face region. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 2 (20), pp. 291-294. (In Russ.)]
4. Кузьменко Н.Б., Щербина А.Ю. Классификация первичных иммунодефицитов как отражение современных представлений об их патогенезе и терапевтических подходах // Российский журнал детской гематологии и онкологии, 2017. № 3. С. 51-57. [Kuzmenko N.B., Shcherbina A.Yu. Classification of primary immunodeficiencies as a reflection of modern ideas about their pathogenesis and therapeutic approaches. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 2017, no. 3, pp. 51-57. (In Russ.)]
5. Латышева Т.В., Сетдикова Н.Х., Латышева Е.А., Дмитриева А.В., Уренкова А.А. Первичные иммунодефициты у взрослых: проблемы диагностики и лечения. Опыт применения оригинального препарата внутривенного иммуноглобулина Интратекта // Российский аллергологический журнал, 2011. № 6. С. 58-67. [Latysheva T.V., Setdikova N.Ch., Latysheva E.A., Dmitrieva A.V., Urenkova A.A. Primary immunodeficiencies in adults. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2011, no. 6, pp. 58-67. (In Russ.)]
6. Мягкова Н.В. Особенности строения лицевого скелета и изменения в результате лечения различными методами пациентов с гнатической формой мезиального прикуса // Уральский медицинский журнал, 2010. № 8 (73). С. 52-55. [Myagkova N.V. Structural characteristic's facial skeleton and changes resulting from treatment with different methods in patients with skeletal mesial bite. *Uralskiy meditsinskiy zurnal = Ural Medical Journal*, 2010, no. 8 (73), pp. 52-55. (In Russ.)]
7. Семенцова Е.А., Мандра Ю.В., Базарный В.В., Григорьев С.С., Полушина Л.Г., Береснева О.Ю., Жегалина Н.М., Светлакова Е.Н., Сорокоумова Д.В., Димитрова Ю.В., Мандра Е.В. Клинико-лабораторные особенности стоматологического статуса пациентов старших возрастных групп // Уральский медицинский журнал, 2020. № 9 (192). С. 52-57. [Sementsova E.A., Mandra Yu.V., Bazarnyi V.V., Grigoryev S.S., Polushina L.G., Beresneva O.Yu., Ghegalina N.M., Svetlakova E.N., Sorokoumova D.V., Dimitrova J.V., Mandra E.V. Clinical and laboratory features of the old patients dental status. *Uralskiy meditsinskiy zurnal = Ural Medical Journal*, 2020, no.9(192), pp. 52-57. (In Russ.)]
8. Jahanimoghadam F. Dental anomalies: an update. *Adv. Hum. Biol.*, 2016, Vol. 6, no. 3, pp. 112-118.
9. Sander A.K. Dental anomalies and their therapeutic implications: Retrospective assessment of a frequent finding in patients with cleft lip and palate. *BMC Oral Health*, 2022, Vol. 22, no. 1, 553. doi: 10.1186/s12903-022-02606-3.

---

### Авторы:

**Саркисян Н.Г.** — д.м.н., профессор отдела аспирантуры ИИФ УрО РАН, доцент кафедры терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

**Тузанкина И.А.** — д.м.н., заслуженный деятель науки, профессор, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

### Authors:

**Sarkisyan N.G.**, PhD, MD (Medicine), Professor of Postgraduate Department, Associate Professor of the Department of Therapeutic Dentistry and Propedeutics of Dental Diseases, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

**Tuzankina I.A.**, PhD, MD (Medicine), Honored Worker of Science, Professor, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

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

**Меликян А.Г.** — студент 5-го курса  
стоматологического факультета ФГБОУ ВО  
«Уральский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Екатеринбург, Россия

**Осипова И.М.** — студентка 5-го курса  
стоматологического факультета ФГБОУ ВО  
«Уральский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Екатеринбург, Россия

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

**Melikyan A.H.**, 5<sup>th</sup> year Student of the Dental Faculty, Ural  
State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

**Osipova I.M.**, 5<sup>th</sup> year Student of the Dental Faculty, Ural State  
Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

---

Поступила 31.03.2024  
Принята к печати 01.04.2024

---

Received 31.03.2024  
Accepted 01.04.2024

## ИММУНОЛОГИЯ В МИРЕ ИДЕЙ И В МИРЕ ВЕЩЕЙ: ЭВОЛЮЦИОННЫЙ СПУСК И ПРОБЛЕМЫ СКОНСТРУИРОВАННОЙ РЕАЛЬНОСТИ

Головизнин М.В.<sup>1</sup>, Моисеев В.И.<sup>1</sup>, Тимофеев В.Т.<sup>2</sup>, Лахонина Н.С.<sup>1</sup>,  
Булдакова Ю.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Российский Университет медицины» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»  
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Резюме.** Термин «иммунитет» появился в медицине благодаря трудам И.И. Мечникова как французская интерпретация слова «невосприимчивость». Однако концепт невосприимчивости к болезням существовал в европейской культуре задолго до Мечникова в виде так называемой жизненной силы. С позиций холистической методологии историю науки об иммунитете можно разделить на три неравных периода: 1) виталистический – с античности до открытий Мечникова и Эрлиха; 2) «мечниковский» (1890-е годы – 1916 г.); 3) постмечниковский (1916 г. – настоящее время). Существование представлений о «жизненной силе» позволили во втором десятилетии XVIII века адаптировать в Европе вариоляцию, в основе которой лежали средневековые магиго-мистические представления об инфекции. Без обобщения опыта вариоляции Э. Дженнер вряд ли бы смог разработать метод вакцинации. Научные открытия И.И. Мечникова не были категорическим отрицанием предыдущего периода иммунологии. Ему в течение почти 20 лет пришлось самому отражать обвинения в телеологии и витализме со стороны некоторых биологов и медиков, отрицавших возможность подвижных клеток действовать целесообразно. Подтвердить правоту «научной интуиции» Мечникову помогла аналогия – феномен внутриклеточного пищеварения у одноклеточных микроорганизмов типа амёб или инфузорий, который он глубоко изучил. Кроме того, он экспериментально показал, на какой стадии эволюции живых существ у них появились подвижные клетки-фагоциты, затем он подтвердил, что фагоцитоз – не панацея и инфекции вполне могут с ним бороться. Тем не менее в своих работах Мечников также обращался к категории «целебных сил организма». Иммунология за последнее столетие столкнулась с рядом теоретических противоречий и методологических сложностей, связанных с доминированием редукционистской парадигмы, а именно с «разрывом» между миром «иммунологических объектов» – рецепторов иммунных клеток, антител, цитокинов и пр. и «субъектностью» базовых категорий иммунологии – «свое-чужое», «иммунная агрессия», «иммунная защита». Это противоречие в иммунологии пытался преодолеть И.И. Мечников при обосновании фагоцитоза

### Адрес для переписки:

Головизнин Марк Васильевич  
ФГБОУ ВО «Российский Университет медицины»  
Министерства здравоохранения РФ  
127006, Россия, Москва, ул. Долгоруковская, 4.  
Тел.: 8 (916) 412-73-65.  
E-mail: mvasilef@mail.ru

### Address for correspondence:

Mark V. Goloviznin  
Russian University of Medicine  
4 Dolgorukovskaya St  
Moscow  
127006 Russian Federation  
Phone: +7 (916) 412-73-65.  
E-mail: mvasilef@mail.ru

### Образец цитирования:

М.В. Головизнин, В.И. Моисеев, В.Т. Тимофеев,  
Н.С. Лахонина, Ю.Р. Булдакова «Иммунология в мире  
идей и в мире вещей: эволюционный спуск и проблемы  
сконструированной реальности» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 397-402.  
doi: 10.46235/1028-7221-16874-IOT

© Головизнин М.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

M.V. Goloviznin, V.I. Moiseev, V.T. Timofeev,  
N.S. Lakhonina, Yu.R. Buldakova "Immunology  
of the "sensible world" and of the 'intelligible world':  
the evolutionary decline and the 'constructed reality' ",  
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii  
Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 397-402.  
doi: 10.46235/1028-7221-16874-IOT

© Goloviznin M.V. et al., 2024

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

DOI: 10.46235/1028-7221-16874-IOT

как функциональной системы, обладающей ценностными характеристиками. В современной иммунологии преодоление этих противоречий может быть начато с помощью холистических субъектно-объектных моделей, как, например, симбионтной модели, уже применяемой в иммунологии растений.

*Ключевые слова:* иммунитет, сконструированная реальность, субъектные модели в иммунологии, эволюционный спуск, холизм, редукционизм, иммунитет растений, симбиоз

## IMMUNOLOGY OF THE “SENSIBLE WORLD” AND OF THE “INTELLIGIBLE WORLD”: THE EVOLUTIONARY DECLINE AND THE “CONSTRUCTED REALITY”

Goloviznin M.V.<sup>a</sup>, Moiseev V.I.<sup>a</sup>, Timofeev V.T.<sup>b</sup>, Lakhonina N.S.<sup>a</sup>, Buldakova Yu.R.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Russian University of Medicine, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The term “immunity” was introduced in medicine due to Ilya Mechnikov. However, the concept of infection resistance existed in European culture long before Mechnikov in the form of s.c. “vital force”. According to holistic methodology, the history of immunology can be divided into three unequal periods: 1) vitalistic – from antiquity to the discoveries of Mechnikov and Ehrlich; 2) “Mechnikov time” (1890s – 1916); and 3) a post-Mechnikov period (1916 – present). At the beginning of 18<sup>th</sup> century, the existence of “vital force” ideas created the possibility to adapt variolation in Europe, which was based on medieval magical-mystical concepts. Without generalizing of variolation experience, Edward Jenner would hardly have been able to discover vaccination. Scientific ideas of Mechnikov were not a categorical denial of the previous period of immunology. For almost 20 years, he himself had to fend off teleological and vitalistic accusations from the side of those biologists who denied the possibility of phagocytes to act expediently. An analogy helped Mechnikov to confirm his intuition was the phenomenon of intracellular digestion of amoebas or ciliates. Besides, he experimentally proved that phagocytosis was the product of evolution and not a “god gift”. However, in his works, Mechnikov also addressed to the category of “healing forces of the body.” Modern immunology now faces a number of theoretical contradictions and methodological difficulties related to reductionists paradigm: as far as the “split” between the world of “immune objects” (immune cells receptors, antibodies, cytokines, etc.) and “subjectness” of its basic categories “self-nonsel”, “immune aggression, “immune defence”, etc., Ilya Mechnikov tried to overcome this contradiction substantiating the phenomenon of phagocytosis as functional system acting in accordance with defense purpose. The construction of “holistic” subject-object models of immunity (such as the symbiosis model of plant immunity) could be a way of overcoming the aforementioned contradictions.

*Keywords:* immunity, constructed reality, subjective models in immunology, evolutionary descent, holism, reductionism, plant immunity, symbiosis

История иммунологии, как она преподается студентам, начинает отсчет от двух знаковых дат: нобелевской премией И.И. Мечникова и П. Эрлиха в 1908 году, открывшей признание иммунологии как науки, и от практического открытия Э. Дженнером в 1796 году оспопрививания, сделавшего невозможной восприимчивость к инфекциям рукотворным деянием. Термин «иммунитет» по-

явился в медицине благодаря трудам И.И. Мечникова как французская интерпретация слова «невосприимчивость». Однако концепт невозприимчивости к болезням существовал в европейской культуре (и не только в ней) задолго до Мечникова в виде так называемой жизненной силы (*vis vitalis*), который в силу господствующей в науке редукционистской парадигмы относится

к области витализма, в лучшем случае признается «протонаукой», а чаще отвергается как нечто противоположное научному знанию. Вместе с тем отход от редукционистской парадигмы и применение к иммунологии холистических познавательных моделей дают иную картину — как в ее истории, так и в современном весьма противоречивом состоянии.

Материалом исследования стали в первую очередь научные статьи И.И. Мечникова и его полемика с коллегами как поддерживавшими его концепцию защитных сил организма, так и возражавшими против нее. Методы исследования: в предлагаемой статье философские проблемы иммунологии анализируются с помощью системного метода, подразумевающего структурность, взаимосвязь объектов исследования и многовариантность методов.

С позиций холистической методологии историю науки об иммунитете можно разделить на три неравных периода: 1) виталистический — с античности до открытий Мечникова и Эрлиха; 2) «мечниковский» (1890-е годы — 1916 г.); 3) постмечниковский (1916 г. — настоящее время).

В задачи настоящего сообщения не входит изложение древних взглядов на сопротивляемость болезням. В Новое время гносеология античной и средневековой науки стала уже отходить от умозрительности и «иррационального холизма». Однако все еще существовавшие представления о «*vis vitalis*» позволили во втором десятилетии XVIII века адаптировать в Европе вариоляцию — «профилактику» оспы, практиковавшуюся в течение столетий на Ближнем и Дальнем Востоке, основой которой были древние магико-мистические представления об инфекции. На наш взгляд, без учета более чем полувекового опыта оспопрививания с использованием биоматериала, взятого от больных натуральной оспой, Эдуард Дженнер вряд ли смог разработать метод вакцинации, который стал дальнейшим этапом практического познания защитных сил организма. Добавим, что вакцинация получила научное объяснение благодаря открытиям Мечникова и Эрлиха спустя почти два века после первых опытов вариоляции. Как свидетельствуют факты, научные открытия И.И. Мечникова не были категорическим отрицанием предыдущего периода иммунологии. Сам феномен фагоцитоза был известен, но интерпретировался как пассивный процесс распространения инфекции по организму. «Ценностные» защитные функции подвижных клеток Мечников постулировал не в малой степени под влиянием научной интуиции. В академическом собрании сочинений И.И. Мечникова представлен

его «тернистый путь» к Нобелевской премии, на котором он вел полемику с натуралистами, утверждавшими, что феномен защиты — есть прерогатива организмов с высокоорганизованными поведенческими функциями, а приписывание аксиологии подвижным клеткам — во-первых, недоказуемо научным методом, во-вторых, имеет «виталистический привкус». Подтвердить правоту «научной интуиции» Мечникову помогла аналогия — феномен внутриклеточного пищеварения у одноклеточных микроорганизмов типа амёб или инфузорий, который он глубоко изучил. Кроме того, он экспериментально показал, на какой стадии эволюции живых существ у них появились подвижные клетки-фагоциты, затем он подтвердил, что фагоцитоз — не панацея и инфекты вполне могут с ним бороться.

Ранее мы обсуждали материализм Мечникова как биолога-эволюциониста на Всероссийском философском конгрессе, утверждая, что это был «холистический» материализм. В 1909 году Мечников, уже лауреат Нобелевской премии, публикует в престижном журнале «Вестник Европы» статью «О целебных силах организма» [4, с. 389-409]. В основу ее был взят доклад, прочитанный им в 1883 году на конференции русских врачей. Ведя диалог с медиками, Мечников говорил, что врач вмешивается в болезнь, когда «целебные силы» больного нуждаются в помощи. Он считал возможным апеллировать к Парацельсу, «который ссылается на полное заживление запущенных ран без всякого участия врача», и Тертуллиану, утверждавшему, что злые духи болезни «легки и подвижны, как птицы, ... они живут в воздухе». В ходе развития науки, — заключает автор, — оказалось, что «летающие в воздухе тертуллиановские духи могут быть видимы под микроскопом». [3, с. 23-25]. Рассуждая о «целебных силах организма», Мечников, безусловно, имел в виду вполне материальные подвижные клетки и белковые молекулы, но постулаты древних авторов ему импонировали больше, чем физико-химический редукционизм коллег. Причиной тому, как нам представляется, был все тот же мечниковский холизм — он считал главным, что клетки фагоциты есть живые организмы, которые действуют целесообразно. Кроме этого Мечников интуитивно постулировал иммунитет как организованную систему, он назвал ее «системой целебного пищеварения». «Можно высказать в виде предположения, в виде дедуктивного вывода, что центральным органом целебной пищеварительной системы является селезенка. С давних пор известно, что орган этот служит главным центром, к которому устремляются бесцветные кровяные

тела, обремененные неудобоваримой или трудноваримой пищей», — писал он. [3, с. 29] «Ошибка» Мечникова была на тот момент фактической, концептуально он оказался прав. Центральные органы иммунитета были открыты через полвека после его смерти. В этом отношении интересна полемика Мечникова с Рудольфом Вирховым. Автор «целлюлярной патологии» в целом благожелательно относился к трудам русского ученого, но считал носителем и «венцом целебных сил» клетку, Мечников «дедуктивным выводом» постулировал, что фагоциты кем-то и как-то организованы, а процесс воспаления, в котором они участвуют, есть не только локальный очаг, но системная реакция.

После Мечникова иммунология обогатилась рядом открытий (лимфоциты — иммунные клетки, обладающие «памятью», феномены трансплантационного и аутоиммунитета), но парадигма научного мышления стала вновь смещаться в сторону вирховианства, ставя клетку в центр иммунных реакций. По всей видимости, многолетняя идея поиска иммунных клеток, которые бы оптимально нас защищали, явилась стимулом открытия множества субпопуляций лимфоцитов, нейтрофилов, их продуктов, а также различных субклеточных структур и генов. В настоящий момент известно около трехсот рецепторов лимфоцитов (CD-маркеров), и новые мембранные молекулы открываются ежегодно, причем, найти в этом процессе систему не просто. Кроме того, иммунология XX столетия как минимум три-четыре раза полностью обновила свой исследовательский аппарат. На смену морфологическим методам оценки иммунных клеток пришло «розеткообразование» — адгезия между клетками красной и белой крови, затем исследование мембранных молекул, сначала визуальное — с помощью флуоресцентного микроскопа, затем цитометрическое. При этом огромные объемы данных, накопленные на предыдущем этапе, формально не отвергаясь как ошибочные, как бы уходили в «научное бессознательное». «Эволюционный спуск» с клеточного на молекулярно-генетический уровень породил очень противоречивую ситуацию в иммунологии: чем больше мы знаем фактов, тем более сложными кажутся закономерности, тем меньше мы способны их объяснить [1, с. 1008-1010].

Современная иммунология существует как бы в двух разных мирах: в «мире объектов», который представляет собой все увеличивающийся пул иммунных клеток, их мембранных рецепторов, цитокинов, хемокинов, а также генов, кодирующих эти белковые молекулы, и в «мире

идей», таких как «свое-чужое», «иммунная защита», «иммунная агрессия», «иммунологическая толерантность» — сконструированной реальности, которая не всегда выводится из результатов экспериментов [1, с. 1009]. Некоторые из этих конструктов существовали еще в виталистическую эпоху. Иммунологический «мир идей» стал в настоящее время предметом изучения ученых-гуманитариев. Американский антрополог Е. Martin, изучавшая мировоззрение современных ученых-иммунологов и представления об иммунитете традиционных целителей, нашла немало общего. Исследовательница делает вывод, что иммунология сможет сыграть роль моста между современной и традиционной медициной [6, с. 82-90], Существует точка зрения, что источником «иммунологических идей» явилась также политическая реальность XX столетия. Мировые войны актуализировали «милитаристскую модель» иммунитета [7], а сетевая теория иммунологической регуляции Нильса Эрне появилась в период «разрядки» и аналогична моделям «социальных сетей». Отечественным аналогом «иммунных сетей» стали «иммунологические мобили» Р.В. Петрова, о которых он написал в монографии «Я или не я» [5, с. 245-250].

Преодоление разрыва между «миром идей» и «миром объектов» в современной иммунологии может быть достигнуто путем новой системы научного моделирования — разграничением высокого уровня «иммунных субъектов» (гештальтов), обладающих аксиологией, и более низкого уровня «иммунных объектов». Аксиология со времен Мечникова сопровождает иммунологию на всем протяжении ее истории. При этом она «незримо» присутствует как бы рядом с наукой, проявляясь более всего в популярной литературе. Однако субъектная модель иммунитета уже используется при анализе иммунитета растений. У растений нет антител или подвижных клеток — лимфоцитов или фагоцитов, которые могли бы «гоняться» за патогенами, но иммунные процессы в растительном мире осуществляются, в том числе за счет защитных симбиозов. Микросимбионты, покрывая поверхность корней, листьев растений, обеспечивают путем выделения антибиотиков их защиту от патогенов. С другой стороны, растение-«хозяин» обеспечивает энергетические и потребности микросимбионтов [2, с. 32-34]. Как нам представляется, модель симбиоза для построения новой, холистической иммунологии растений, животных и человека является перспективной: она снимает с повестки дня скептицизм о целесообразности иммунных процессов.

Виды симбиоза (мутуализм, комменсализм, паразитизм) есть разные типы целесообразности. С этих позиций, например, аутоиммунитет может рассматриваться как переход комменсализма в паразитизм. Симбиотная модель вполне укрепилась в биологии, даже среди жестких редуccionистов. Кроме того, симбиоз описан как

фактор иммунитета растений и может оказаться перспективным в оценке роли сапрофитной микрофлоры (кишечника) у человека. В то же время эта модель ставит на повестку дня вопрос, каким образом иммунный субъект (лимфоцит-киллер, или лимфоцит-помощник) распознает строго индивидуальную цель, или партнера.

## Список литературы / References

1. Головизнин М.В., Моисеев В.И., Тимофеев В.Т., Лакхонина Н.С., Булдакова Ю.Р. Проблема сконструированной реальности в иммунологии. История и современность // Восьмой Российский философский конгресс. Философия в полицентричном мире. Круглые столы. Сборник научных статей. М., 2021, 1250 с. [Goloviznin M.V., Moiseev V.I., Timofeev V.T., Lakhonina N.S., Buldakova Yu.R. The problem of "constructed reality" in immunology. History and Modernity. The Eight's Russia Philosophy Congress. Philosophy in the Polycentric World. Round tables. Collected works]. Moscow, 2021. 1250 p.
2. Головизнин М.В., Тимофеев В.Т. Симбиоз как перспективная аксиологическая модель работы иммунной системы (на примере иммунитета растений) // Философские проблемы биологии и медицины. Выпуск 16. М., 2022. 214 с. [Goloviznin M.V., Timofeev V.T. Simbyosis as prospective axiological model of immune system activity (using the example of plant immunity). Philosophical Problems of Biology and Medicine, Vol. 16]. Moscow, 2022. 214 p.
3. Мечников И.И. О целебных силах организма. Акад. собр. соч. М.: Медгиз, 1950. Т. 6. 368 с. [Mechnikov I.I. On the healing powers of the body. Collected works]. Moscow: Medgiz, 1950. Vol. 6. 368 p.
4. Мечников И.И. О целебных силах организма. Акад. собр. соч. М.: Медгиз, 1952. Т. 7. 564 с. [Mechnikov I.I. On the healing powers of the body. Collected works]. Moscow: Medgiz, 1952. Vol. 7. 564 p.
5. Петров Р.В. «Я или не я» (Иммунологические мобили). М.: Молодая гвардия, 1983. 273 с. [Petrov R.V. "Me or not me" (immune mobilities). Moscow: Molodaya gvardiya, 1983. 273 p.
6. Martin E. Flexible Bodies: Tracking Immunity in American Culture. From the Days of Polio to the Age of AIDS. Beacon Press; 1994, 319 p.
7. Turney J. Beyond cell wars; 2016. Available at: <https://aeon.co/essays/why-we-should-guard-against-military-notions-of-immunity> (Date of the application March 15, 2024).

---

### Авторы:

**Головизнин М.В.** — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней стоматологического факультета ФГБОУ ВО «Российский Университет медицины» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Моисеев В.И.** — д.филос.н., профессор, заведующий кафедрой философии, биоэтики и гуманитарных наук ФГБОУ ВО «Российский Университет медицины» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

### Authors:

**Goloviznin M.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Diseases, Dental Faculty, Russian University of Medicine, Moscow, Russian Federation

**Moiseev V.I.**, PhD, MD (Philosophy), Professor, Head, Department of Philosophy, Bioethics and Humanities, Russian University of Medicine, Moscow, Russian Federation

**Тимофеев В.Т.** — д.м.н., главный научный сотрудник кафедры факультетской терапии имени академика А.И. Нестерова лечебного факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Лахонина Н.С.** — ассистент кафедры внутренних болезней стоматологического факультета ФГБОУ ВО «Российский Университет медицины» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Булдакова Ю.Р.** — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней стоматологического факультета ФГБОУ ВО «Российский Университет медицины» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Timofeev V.T.**, PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, A. Nesterov Department of Faculty Therapy, Medical Faculty, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

**Lakhonina N.S.**, Assistant Professor, Department of Internal Diseases, Dental Faculty, Russian University of Medicine, Moscow, Russian Federation

**Buldakova Yu.R.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Diseases, Dental Faculty, Russian University of Medicine, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 02.04.2024  
Отправлена на доработку 03.04.2024  
Принята к печати 04.04.2024

---

Received 02.04.2024  
Revision received 03.04.2024  
Accepted 04.04.2024

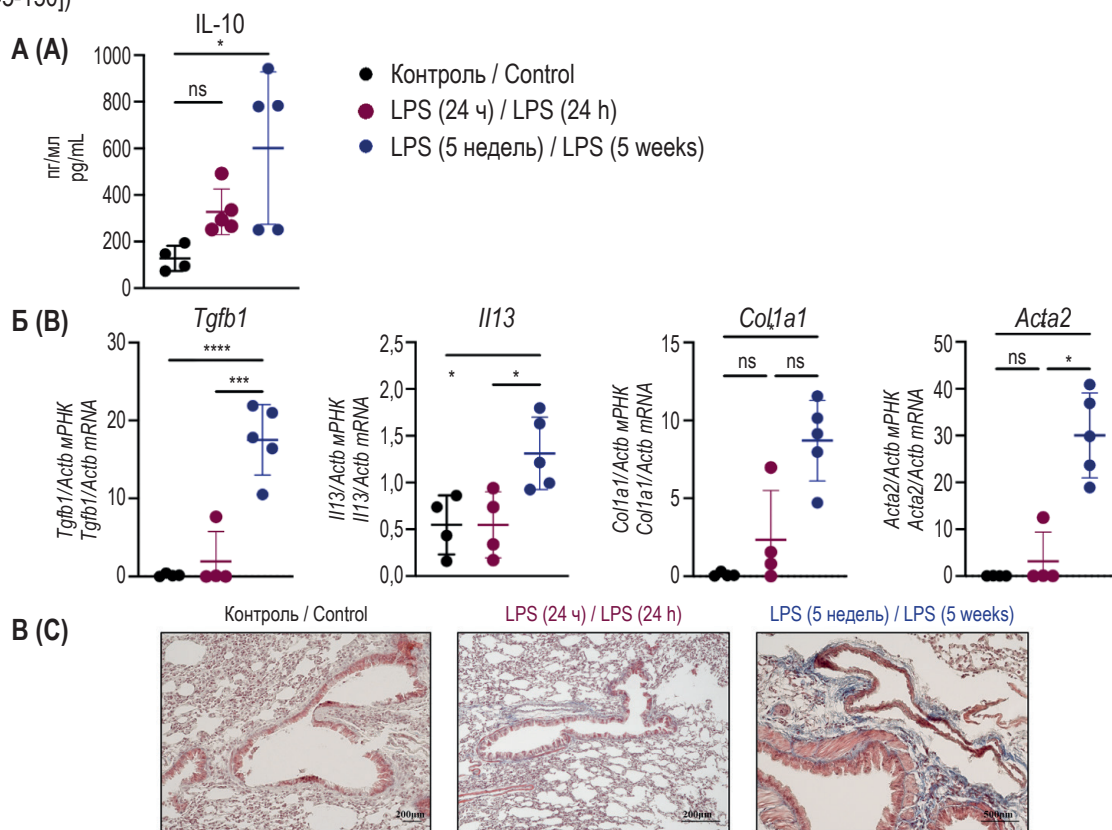


Абазова З.Х. ....	273	Кадочникова Я.А. ....	197	Рахматуллина Э.Н. ....	151
Абакумова Т.В. ....	383	Камалов З.С. ....	281	Ручкин М.П. ....	363
Аблаева Р.Н. ....	323	Караулова Е.П. ....	167	Рымаренко Н.В. ....	323
Авдеева Е.Ю. ....	187	Каримова Г.Р. ....	151	Рябова Л.В. ....	351
Агеева Е.С. ....	323	Катаева Н.Н. ....	161, 391	Рябченко П.Е. ....	243
Альтман Д.Ш. ....	343	Кипкеева Т.Б. ....	273	Савчук К.С. ....	351
Андреянов О.Н. ....	175	Кириченко Т.В. ....	259	Саркисян Н.Г. ....	161, 391
Андрущишина Т.Б. ....	259	Киселева Д.Г. ....	253	Сафронова Э.А. ....	267
Антонеева И.И. ....	383	Кньш С.В. ....	317	Сергеева В.Е. ....	157
Арипова Т.У. ....	281	Княжева М.А. ....	335	Смирнова А.С. ....	369
Ашагре С.М. ....	273	Ковалева С.В. ....	307	Смирнова Н.В. ....	157
Бариев У.А. ....	187	Кологривова И.В. ....	243	Смольникова М.В. ....	237
Беккер Р.А. ....	329	Коновалова М.В. ....	219	Смородченко А.Т. ....	157
Белоглазов В.А. ....	323	Коробкин Е.А. ....	375	Соколова В.В. ....	299
Белоусов М.В. ....	187	Королевская Л.Б. ....	207	Соколова Т.Ф. ....	231
Бельтюкова М.Е. ....	369	Костоломова Е.Г. ....	181	Соколов Е.Ю. ....	231
Бельтюков П.П. ....	369	Кошельская О.А. ....	243	Старосветская А.А. ....	187
Богомолова И.А. ....	383	Крапивина А.С. ....	243	Суслова Т.Е. ....	243
Богуш В.В. ....	299	Кубекина М.В. ....	139	Сухова М.М. ....	133
Борукаева И.Х. ....	273	Куготов А.М. ....	273	Терещенко С.Ю. ....	237
Бресский А.Г. ....	293	Кузнецова М.Г. ....	151	Тимофеев В.Т. ....	397
Буддакова Ю.Р. ....	397	Куклина Е.М. ....	203	Тимохина Т.Х. ....	181
Быкова А.Ю. ....	329	Куранова Н.Н. ....	307	Токарев А.Ю. ....	369
Быков Ю.В. ....	329	Лахонина Н.С. ....	397	Трусова Л.М. ....	299
Бязрова М.Г. ....	133	Лебедев С.В. ....	317	Трушина Э.Н. ....	357
Величинский Р.А. ....	219	Лигидова Д.Р. ....	273	Тузанкина Н.А. ....	391
Верхова С.С. ....	139	Лимарева Л.В. ....	299	Тхабисимова И.К. ....	273
Выросткова А.И. ....	243	Литвинова Л.С. ....	187	Тюмина О.В. ....	299
Гейн С.В. ....	197	Лозова П.Б. ....	181	Тюмин И.В. ....	299
Генинг Т.П. ....	383	Лукина М.В. ....	259	Удалов Ю.Д. ....	383
Головизнин М.В. ....	397	Лысенко О.В. ....	293	Уракова К.В. ....	151
Горбачева Н.Н. ....	237	Мамбеткаримов Г.А. ....	281	Уракова М.А. ....	151
Гордова В.С. ....	157	Маркелова Е.В. ....	363	Фаттахова Г.В. ....	219
Горохова А.В. ....	187	Маркин А.М. ....	253	Федосов А.А. ....	375
Григорьева Е.А. ....	157	Маркина Ю.В. ....	259	Федяшев Г.А. ....	363
Грищенко Т.А. ....	299	Маркова Е.В. ....	335	Филатов А.В. ....	133
Губернаторова Е.О. ....	145	Мартусевич А.К. ....	175	Фотин Д.П. ....	253
Гусарова Е.А. ....	299	Меликян А.Г. ....	161, 391	Харитоновна О.А. ....	243
Давыдкин И.Л. ....	299	Михайлов А.А. ....	133	Харченко А.А. ....	317
Давыдова Е.В. ....	343	Моисеев В.И. ....	397	Хлусов И.А. ....	187
Димов Г.П. ....	375	Молов А.А. ....	273	Хохрякова Д.А. ....	161
Дмитрюков А.А. ....	243	Мустаев В.Р. ....	151	Часовских О.В. ....	175
Долгова Д.Р. ....	383	Мустафина О.К. ....	357	Чепурнова Н.С. ....	317
Долматова Л.С. ....	167	Намаканова О.А. ....	145	Чибашова А.В. ....	299
Друцкая М.С. ....	145	Нарыжная Н.В. ....	243	Чичерина Н.Р. ....	145
Евтушенко В.В. ....	243	Насибов Т.Ф. ....	187	Чудаков Д.Б. ....	219
Емельянов Ю.В. ....	231	Нестерова И.В. ....	307	Чулкова А.М. ....	307
Жданова О.Б. ....	175	Носов В.Е. ....	187	Шаваева Ф.В. ....	273
Живодерников И.В. ....	259	Огризко И.Н. ....	293	Шарафетдинов Х.Х. ....	357
Жиёмуратова Г.К. ....	281	Оленева С.А. ....	151	Шашкова Е.Ю. ....	287
Жукова А.А. ....	323	Осиков М.В. ....	375	Шмагель К.В. ....	207
Журавлев А.Д. ....	139	Осипова И.М. ....	161, 391	Шокуева А.Г. ....	273
Журавлева Ю.А. ....	213	Паромова Я.И. ....	181	Шустова О.А. ....	219
Зварцев Р.В. ....	145	Пашнин С.Л. ....	343	Шхагумов К.Ю. ....	273
Зиганшин Р.Х. ....	253	Пиктурно С.Н. ....	307	Щеглова Е.Л. ....	231
Зотова Н.В. ....	213	Пирогова А.И. ....	307	Щёголева Л.С. ....	287
Иванов А.Б. ....	273	Поеджаев Е.А. ....	307	Юдина И.Ю. ....	259
Иванова И.С. ....	227	Полянских Е.Д. ....	181	Ющук В.Н. ....	317
Иванова О.Н. ....	227	Порохова Е.Д. ....	187	Яцков И.А. ....	323
Каббани М.С. ....	287	Прилипов А.Г. ....	133		

авидин-позитивные клетки .....	157	мелатонин .....	203	стенотирование коронарных артерий .....	268
азоксимера бромид .....	176	мембранный потенциал митохондрий .....	207	структуры головного мозга .....	336
активация лейкоцитов .....	214	метавоспаление .....	358	субпопуляции лимфоцитов .....	244
активные формы кислорода .....	168	методы ИФА .....	232	субъектные модели в иммунологии .....	398
аллергические заболевания .....	232	минеральная плотность костей .....	376	суицидальное поведение .....	330
аллергия .....	227	митофагия .....	140	сурфактант легких .....	152
аномалии зубов .....	392	митохондрии .....	140	терминально-дифференцированные	
аномалия размера челюсти .....	392	множественная миелома .....	300	элементы .....	207
анти-NMDA-рецепторные антитела .....	330	модель аллергии на мышах .....	220	тимус .....	244
антифосфолипидный синдром .....	152	модифицированный естественный цикл ..	294	толерантность врожденного иммунитета ..	140
атеросклероз .....	244, 254, 260	модулированные иммунокомпетентные		тонкий эндометрий .....	294
аутоиммунный энцефалит .....	330	клетки .....	336	травматизация кости .....	162
безопасность .....	300	моноциты .....	260	трансформирующий фактор роста .....	364
белки .....	168	мочевая кислота .....	370	тучные клетки .....	157
бензо(а)пирен .....	220	MT1 .....	203	условно здоровые мужчины и женщин ..	318
биомаркеры .....	238	MT2 .....	203	устойчивость .....	176
боевой стресс .....	344	мышы .....	188	фагоциты .....	168
бронхиальная астма .....	238	мышинная модель воспаления легких ..	146	фактор роста гепатоцитов .....	384
бытовые аллергены .....	232	наивные В-клетки .....	134	факторы комплемента .....	370
возраст .....	318	наивные клетки .....	207	фиброз легких .....	146
воспаление .....	238, 260	нарушенная толерантность к глюкозе ..	352	фосфорно-кальциевое соотношение ..	162
вспомогательные репродуктивные		натуральные киллеры .....	300	химиотерапия .....	384
технологии .....	294	нейродегенерация .....	364	холизм .....	398
гексапептид .....	308	нейротрофический фактор головного		хромато-масс-спектрометрия .....	254
гены-мишени .....	188	мозга .....	336	хронические воспалительные заболевания	
гены .....	318	нематодозы .....	176	генитального тракта .....	308
гепарин .....	157	неудачи имплантации .....	294	хронический лимфолейкоз .....	376
гипертоническая болезнь .....	274	низкомолекулярные фармакологические		хронический эндометрит .....	294
гиперурикемия .....	370	ингибиторы .....	220	хроническое воспаление .....	140
глюкоза .....	197	новая коронавирусная инфекция .....	323	целомическая жидкость .....	168
голотурии .....	168	ожирение .....	358	гибриды .....	140
гормоны стресса .....	344	опиоидные рецепторы .....	197	цикл с заместительной гормональной	
депрессивно-подобное состояние .....	336	остеоденситометрия .....	376	терапией .....	294
дети .....	232, 238, 323	остеопения .....	376	цитокины .....	140, 146, 182, 260, 308, 336, 344
дефицит селена .....	162	остеопороз .....	162	часто болеющие дети .....	282
диабетическая ретинопатия .....	364	острые респираторные заболевания ..	282	эволюционный спуск .....	398
железододефицитная анемия .....	282	острый коронарный синдром .....	268	эксперимент .....	176
задержка прорезывания зубов .....	392	пародонтит .....	162	эктопический тест .....	188
завивление ран .....	168	патогенез .....	238	элементный состав кости челюсти .....	162
иммунитет .....	227, 398	патология .....	227	эндоморфины .....	197
иммунитет растений .....	398	пациентка .....	227	эндотелиальная дисфункция .....	274
иммунная система .....	268	первичные иммунодефициты .....	392	эпикардальная жировая ткань .....	244
иммунные индексы .....	288	перенос размороженных эмбрионов ..	294	В-клетки памяти .....	134
иммунные показатели .....	282	печень .....	157, 182	Vcl-6 .....	134
иммунный ответ .....	352	пирамидные нейроны .....	336	Vcl-XL .....	134
иммунный статус .....	274	пищевые аллергены .....	232	<i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	182
иммуноглобулин Е .....	232	плазматические клетки .....	134	BRAF .....	384
иммунодефицит .....	227	площадь корстного мозга .....	188	C-589T IL4 .....	323
иммунокомпрометированность .....	308	поверхностная активность легких .....	152	C-реактивный белок .....	370
иммунопатологическое неспецифическое		полиморфизм .....	323	CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> лимфоциты .....	268
воспаление .....	274	постковидные пациенты .....	352	CD4 <sup>+</sup> Т-лимфоциты .....	207
иммунорегуляторный индекс		посттравматическое стрессовое		CD40L .....	134
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> .....	288	расстройство .....	344	COVID-19 .....	268, 323
иммуносупрессор FTY-720 .....	152	предотвращение суицида .....	330	ECP .....	214
иммуносупрессоры .....	330	препараты .....	227	FoxP3 <sup>+</sup> Т-регуляторные лимфоциты ..	244
иммунотерапия .....	294, 308	прогнозирование .....	188	G-1082A IL10 .....	323
иммунотропная терапия .....	176	протеомика .....	254	IgE .....	220
иммунофенотип .....	300	проточная цитометрия .....	207	IgM .....	370
иммунофенотипирование лимфоцитов ..	376	психические расстройства .....	330	IL-21 .....	134
ингаляционные антигены .....	232	пуповинная кровь .....	300	ImmunoCAP .....	232
индекс системного воспалительного		расщелина верхней челюсти .....	392	KRAS .....	384
ответа .....	288	редукционизм .....	398	LPS .....	146
интервальная гипокситерапия .....	274	рецептор конечных продуктов		NK-клетки .....	244
интерфероны .....	308	гликозилирования .....	238	NK-лимфоциты .....	300
инфекция .....	227	сахарный диабет 2-го типа .....	358	NLRP3 .....	220
клетки куриного эмбриона .....	182	сахарный диабет .....	254, 352, 364	NRAS .....	384
клетки памяти .....	207	семиаридный регион .....	288	<i>Opisthorchis felineus</i> .....	182
клеточный иммунитет .....	358	сердечно-сосудистые заболевания ..	254	RORα .....	203
колоректальный рак .....	384	сигнальные пути .....	188	SARS-CoV-2 инфекция .....	352
кремний .....	157	силикаты .....	157	sIL-2R .....	214
лабораторные животные .....	176	симбиоз .....	398	Т-клетки .....	352
лиганд-рецепторные взаимодействия ..	203	система комплемента .....	370	Т-лимфоциты .....	268
лимфома .....	376	системная воспалительная реакция ..	214	Т-хелперы .....	203
лимфоциты .....	197	системное воспаление .....	214	Th17.1 .....	203
липопротеины низкой плотности .....	254	сконструированная реальность .....	398	Th17 .....	203
лицевой дисморфизм .....	392	содержание железа .....	282	TLR4 .....	220
макрофаги .....	260	соотношение лимфопрлиферации		β2-микроглобулин .....	214
маркеры активации лимфоцитов .....	358	и апоптоза .....	288		
масса митохондрий .....	207	соотношение лимфоцитов к моноцитам ..	288		
матриксные металлопротеиназы .....	318	соотношение нейтрофилов к лимфоцитам ..	288		
медиаторы воспаления .....	274	статины .....	260		

**ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА У МЫШЕЙ, ИНДУЦИРОВАННАЯ ПОСРЕДСТВОМ АЭРОЗОЛЬНОЙ ДОСТАВКИ LPS» (АВТОРЫ: НАМАКАНОВА О.А., ГУБЕРНАТОРОВА Е.О., ЧИЧЕРИНА Н.Р., ЗВАРЦЕВ Р.В., ДРУЦКАЯ М.С. [с. 145-150])**

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE «EXPERIMENTAL MOUSE MODEL OF PULMONARY FIBROSIS INDUCED BY NEBULIZED LPS ADMINISTRATION» (AUTHORS: NAMAKANOVA O.A., GUBERNATOROVA E.O., CHICHERINA N.R., ZVARTSEV R.V., DRUTSKAYA M.S. [pp. 145-150])



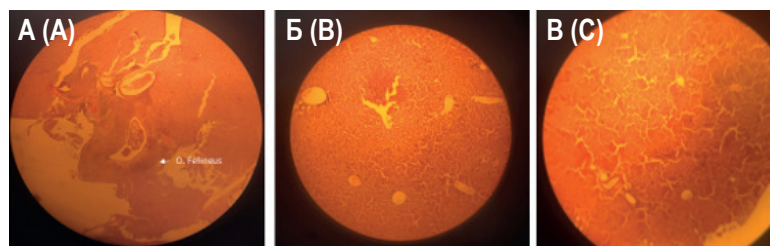
**Рисунок 2. Введение LPS в виде аэрозоля через 5 недель приводит к увеличению экспрессии ключевых медиаторов, ассоциированных с фиброзом**

Примечание. А – уровень продукции IL-10 (пг/мл) в БАЛ после аэрозольного введения LPS. Б – уровень относительной экспрессии генов, ассоциированных с фиброзом (*Tgfb1*, *Il13*, *Col1a1*, *Acta2*) в тканях легких мышей через 24 ч и 5 недель после аэрозольного введения LPS. В – репрезентативное фото гистологического окрашивания методом Массона срезов легких мышей после воздействия LPS, а также физраствора в качестве контроля. Области интенсивного синего окрашивания демонстрируют наличие коллагена в легочной ткани. Увеличение 5× (Контроль), 10× (LPS 24 ч), 20× (LPS 5 недель). Статистический анализ проведен с помощью one-way ANOVA теста, \* –  $p < 0,05$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ ; ns – нет разницы.

Figure 2. 5 weeks after aerosolized LPS administration leads to increased expression of key mediators associated with fibrosis  
 Note. A, protein levels of IL-10 (pg/mL) in BALF after aerosolized LPS administration. B, quantitative RT-PCR analysis of fibrosis-associated genes (*Tgfb1*, *Il13*, *Col1a1*, *Acta2*), normalized to *Actb* in the lungs caused by nebulized LPS and saline. C, representative Masson's trichrome stained lung tissue sections of mice exposed to LPS and saline as a control. Areas of intense blue staining demonstrate the presence of collagen in lung tissue. Original magnification 5× (control), 10× (LPS 24 h), 20× (LPS 5 weeks). One-way ANOVA test revealed: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ; ns, non-significant.

**ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СУПЕРНАТАНТОВ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* И КЛЕТОК КУРИНОГО ЭМБРИОНА НА МОДЕЛИ ОПИСТОРХОЗНОЙ ИНВАЗИИ» (АВТОРЫ: КОСТОЛОВОВА Е.Г., ЛОЗОВАЯ П.Б., ПОЛЯНСКИХ Е.Д., ТИМОХИНА Т.Х., ПАРОМОВА Я.И. [с. 181-186])**

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "STUDYING THE ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* SUPERNATANTS AND CHICKEN EMBRYO CELLS ON A MODEL OF OPISTHOCHIC INVASION" (AUTHORS: KOSTOLOMOVA E.G., LOZOVAYA P.B., POLYANSKIKH E.D., TIMOKHINA T.KH., PAROMOVA YA.I. [pp. 181-186])



**Рисунок 1. Патоморфологическое изменение печени в изучаемых группах при заражении *Opisthorchis felineus***

Примечание. Гистологические срезы печени. Толщина 5 мм. Исходное увеличение, ×1000, масштабная линейка 10 мкм. А – контрольная группа. Б – экспериментальная группа 1. В – экспериментальная группа 2. Взрослый червь (стрелка) в печени контрольной группы. При исследовании печени экспериментальных групп заражения не наблюдалось.

Figure 1. Pathomorphological changes in the liver in the studied groups during infection with *Opisthorchis felineus*  
 Note. Histological sections of the liver. Thickness 5 mm. Original magnification, ×1000, scale bar 10 μm. A, control group. B, Experimental group 1. C, Experimental group 2. Adult worm (arrow) in the liver of the control group. When examining the livers of the experimental groups, no contamination was observed.

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:  
ПРЕССА РОССИИ – 15590**

ISSN 1028-7221



9 771234 567898